

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA SELIČ

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA SELIČ

**OCENA LEDVIČNE FUNKCIJE S POMOČJO KONTRASTNEGA  
SREDSTVA JOHEKSOLA PRI BOLNIKI S KRONIČNIM SRČNIM  
POPUŠČANJEM**

ASSESSMENT OF RENAL FUNCTION WITH CONTRAST MEDIA  
AGENT IOHEXOL IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

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**

Za strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Mojci Kerec Kos, mag. farm.

Najlepša hvala Katji Trobec, mag. farm., ki mi je med izdelavo diplomskega dela pomagala s svojim znanjem in izkušnjami. Hvala tudi vsem članom Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko za strokovno pomoč in nasvete.

Hvala vsem, ki so mi v času študija in pri nastajanju te diplome stali ob strani, še zlasti moji družini, prijateljem in Mateju.

### **Izjava**

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

Monika Selič

Ljubljana, 2013

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

**VSEBINA**

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Ocenjevanje ledvične funkcije.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Kronična ledvična bolezen in razmerje ledvična funkcija – srčno popuščanje1</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Eksogeni označevalci .....</b>	<b>3</b>
1.3.1. Inulin.....	3
1.3.2. Radioaktivni označevalci.....	3
1.3.3. Joheksol .....	4
1.3.3.1. Farmakokinetika joheksola.....	5
1.3.3.2. Uporaba joheksola .....	5
1.3.3.3. Določanje hitrosti GF na osnovi očistka joheksola .....	6
<b>1.4. Endogeni označevalci .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5. Enačbe za oceno GF na osnovi serumskega kreatinina .....</b>	<b>10</b>
1.5.1. Cockroft-Gaultova enačba.....	10
1.5.2. Cockroft-Gaultova enačba z vpeljavo puste telesne mase.....	11
1.5.3. Ocena GF z enačbo MDRD.....	12
1.5.4. Ocena GF z enačbo CKD-EPI.....	13
<b>1.6. Vpliv telesne sestave na ledvično funkcijo.....</b>	<b>15</b>
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Materiali .....</b>	<b>17</b>
3.1.1. Biološki material – plazma.....	17
3.1.2. Standardi.....	17
3.1.3. Reagenti in topila.....	17
3.1.4. Naprave in pribor.....	18
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>19</b>
3.2.1. Priprava vzorcev in analiza na HPLC.....	19
3.2.2. Določanje plazemske koncentracije joheksola .....	21
3.2.3. Izračun očistka joheksola.....	22
3.2.4. Ocena GF na osnovi serumskih koncentracijah kreatinina .....	23
3.2.5. Statistično vrednotenje rezultatov .....	23

<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Določanje plazemske koncentracije joheksola .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Izračun očistka joheksola.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3. Ocena GF na osnovi serumskih koncentracijah kreatinina .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4. Statistično vrednotenje rezultatov .....</b>	<b>35</b>
<b>5. RAZPRAVA.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Določanje plazemske koncentracije joheksola .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2. Izračun očistka joheksola.....</b>	<b>46</b>
<b>5.3. Ocena GF na osnovi serumskih koncentracijah kreatinina .....</b>	<b>47</b>
<b>5.4. Statistično vrednotenje rezultatov .....</b>	<b>48</b>
<b>6. SKLEP .....</b>	<b>54</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>55</b>

**POVZETEK**

Ledvično popuščanje se kaže z glomerulno filtracijo (GF) manjšo od  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . GF lahko določimo z eksogenim označevalcem, kot je rentgensko kontrastno sredstvo joheksol. V klinični praksi se za oceno ledvične funkcije najpogosteje uporabljajo enačbe, ki temeljijo na serumskih koncentracijah kreatinina – Cockroft-Gaultova enačba, Cockroft-Gaultova enačba z vpeljavo puste telesne mase, MDRD enačba s štirimi spremenljivkami, MDRD enačba s šestimi spremenljivkami in CKD-EPI enačba.

Osnovni namen diplomske naloge je ugotoviti katera izmed omenjenih enačb na osnovi serumskega kreatinina najbolje ocenjuje GF glede na izračunan očistek joheksola pri izbrani populaciji bolnikov s kroničnim srčnim popuščanjem. Zanimalo nas je tudi, ali parametri telesne sestave vplivajo na točnost ocene GF glede na izmerjen očistek joheksola.

Bolnikom ( $n=44$ ) smo z razvito in validirano HPLC-UV metodo določili plazemske koncentracije joheksola pred intravensko aplikacijo joheksola in 3 ter 4 ure po aplikaciji. Iz plazemskih koncentracij smo s poenostavljenim enoprostornim modelom izračunali očistke joheksola in jih popravili z Bröchner-Mortensenovim popravkom. Očistke joheksola smo določali bolnikom dvakrat, z razmikom približno šest mesecev. Poleg tega smo bolnikom ocenili GF z enačbami, ki temeljijo na serumskih koncentracijah kreatinina.

Izračunani očistki joheksola so pri izbranih bolnikih primerljivi z vrednostmi iz literature. Po približno šestih mesecih se je očistek joheksola v povprečju zmanjšal za  $11,3 \text{ ml/min}$ . Najboljšo korelacijo z očistkom joheksola dajejo ocene GF z enačbo CKD-EPI in MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami. V primeru GF pod  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  je najboljša ocena z enačbo CKD-EPI, pri GF nad  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  pa s Cockroft-Gaultovo in MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami. Telesna sestava najbolj vpliva na točnost ocene GF z enačbama Cockroft-Gault in CKD-EPI, najmanj pa na MDRD enačbi.

Na osnovi rezultatov lahko povzamemo, da se je očistek joheksola pri starostnikih s srčnim popuščanjem v pol leta v povprečju zmanjšal. Najboljša ocena GF je z enačbo CKD-EPI (predvsem pri bolnikih z ledvičnim popuščanjem) in z MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami (predvsem pri bolnikih z normalno ali blago zmanjšano GF). Telesna sestava pa najbolj vpliva na točnost ocene GF z enačbama Cockroft-Gault in CKD-EPI.

**ABSTRACT**

Renal failure is manifested with a glomerular filtration rate (GFR) lower than 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. GFR can be determined using an exogenous marker, such as the non-radiolabelled contrast media agent iohexol. In clinical practice, renal function is usually assessed using formulas based on serum creatinine – Cockcroft-Gault formula (C&G), lean body mass-adjusted Cockcroft-Gault formula (C&G-LBM), 4-variable MDRD (MDRD4), 6-variable MDRD (MDRD6) and the CKD-EPI formula.

The purpose of the thesis is to establish which of the above serum creatinine formulas is the best for assessing GFR in relation to the calculated iohexol clearance in heart failure patients. The goal was also to find out if body composition parameters have any impact on the accuracy of GFR assessment in relation with the measured iohexol clearance.

In 44 patients we used a developed and validated HPLC-UV method to determine plasma concentrations of iohexol before intravenous application of iohexol as well as 3 and 4 hours after the application. From these concentrations we calculated the iohexol clearances using a simplified one-compartment model and corrected them using the Bröchner-Mortensen correction. Iohexol clearances were determined two times with approximately 6 months difference. The patients' GFR was assessed using the formulas based on serum concentrations of creatinine.

The calculated clearances of iohexol in the selected patients corresponded with the literature value. After 6 months the iohexol clearance decreased on average by about 11.3 ml/min. The most accurate formulas to assess renal function are the CKD-EPI and MDRD4 formula, because they give the best correlations with the iohexol clearance. When GFR is below 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> the most accurate formula is the CKD-EPI, and when GFR is above 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, the best way to assess renal function is to use the C&G and the MDRD4 formula. Body composition has the most significant impact on the C&G and CKD-EPI formulas, while the least affected are the MDRD formulas.

Results show that iohexol clearance in elderly heart failure patients dropped over the course of 6 months. GFR is best assessed using the CKD-EPI (especially in patients with renal failure) and MDRD4 (especially in patients with normal or mildly reduced GFR). Body composition has the greatest impact on the C&G and CKD-EPI formulas.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

- $^{51}\text{Cr}$ -EDTA –  $^{51}$ Krom-etilendiamintetraocetna kislina
- $^{99}\text{Tc}$ -DTPA –  $^{99}$ Tehnicij-dietilentriaminpentaocetna kislina
- BIA – bioimpedanca
- BM – Bröchner-Mortensenov popravek
- BMI – indeks telesne mase ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )
- BSA – telesna površina ( $\text{m}^2$ )
- CKD-EPI – »Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration« enačba
- C&G – Cockroft-Gaultova enačba
- C&G-LBM – Cockroft-Gaultova enačba z vpeljavo puste telesne mase
- DEXA – dvoenergijska absorpciometrija z rentgenskimi žarki
- GF – glomerulna filtracija
- HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- KLB – kronična ledvična bolezen
- MAPE – povprečna absolutna napaka
- MDRD – »The Modification of Diet in Renal Disease« enačba
- MDRD4 – »The Modification of Diet in Renal Disease« enačba s štirimi spremenljivkami
- MDRD6 – »The Modification of Diet in Renal Disease« enačba s šestimi spremenljivkami
- MPE – povprečna relativna napaka
- oGF – ocenjena hitrost glomerulne filtracije
- PE – relativna napaka
- SE – napaka meritve
- SD – standardni odklon
- SP – srčno popuščanje

## 1. UVOD

### 1.1 OCENJEVANJE LEDVIČNE FUNKCIJE

Glavna funkcija ledvic je sestava in vzdrževanje telesnih tekočin. Ledvica so ena glavnih izločevalnih poti presnovnih produktov. Prvi korak v izločevalnem procesu se dogaja v glomerulih in obsega pasivno filtracijo plazme (1). Glomerulna filtracija (GF) se smatra za najboljši splošni indeks ledvične funkcije, zato je pomembno, da imamo razvito dostopno, točno, občutljivo in ponovljivo metodo za določitev GF. GF pa ne moremo določiti direktno, ampak jo določimo kot ledvični očišček določene snovi iz plazme, ki je izražen kot volumen plazme, ki se popolnoma očisti snovi v 1 minuti. GF merimo v absolutnih (ml/min) ali v relativnih vrednostih, po popravku na povprečno telesno površino ( $\text{ml/min}/1,73\text{m}^2$ ) (1, 2).

Na razlike v GF med bolniki vpliva velikost telesa (bolniki z večjo telesno površino imajo višjo GF), spol (moški imajo 8% višjo GF), rasa, starost (upadanje GF s starostjo je 0,75 do 1,0  $\text{ml/min}/1,73\text{m}^2$  na leto), nosečnost (GF se v prvem tromesečju poveča za 50%, na normalno vrednost se vrne 4 do 8 tednov po porodu), vnos proteinov (GF je višja pri bolnikih z visoko proteinsko dieto), antihipertenzivna terapija, vplivajo pa tudi dnevne spremembe (10% višje vrednosti so popoldne kot ponoči) in druga stanja s hiperfiltracijo (diabetes, debelost, akromegalija) (3).

Točnost ocene ledvične funkcije je izredno pomembna, ker imajo bolniki z ledvično boleznijo v začetnih fazah bolezni klinično izraženih malo znakov in simptomov. Laboratorijsko določanje je takrat edina pot za zgodnje odkrivanje, ustrezno zdravljenje in za spremljanje napredovanja kronične ledvične bolezni (KLB). Točnost ocene ledvične funkcije je pomembna tudi za določanje višine odmerka zdravil, ki se izločajo preko ledvic (3, 4).

### 1.2 KRONIČNA LEDVIČNA BOLEZEN IN RAZMERJE LEDVIČNA FUNKCIJA – SRČNO POPUŠČANJE

KLB je postala velik svetovni zdravstveni problem, saj narašča prevalenca, incidenca, umrljivost, obolevnost in stroški povezani s KLB. Posledice KLB se kažejo na skoraj vseh organskih sistemih. Neželeni izid bolezni je poleg ledvičnega popuščanja oz. ledvične odpovedi, tudi srčno-žilna bolezen. Zaradi pomanjkljive klasifikacije in opredelitve KLB,

večino bolnikov s KLB identificirajo ali zdravijo s precejšno zamudo (4, 5). KLB je splošno definirana z zmanjšano GF na manj kot  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  za 3 ali več mesecev ali z ledvično okvaro ne glede na GF za 3 ali več mesecev (2).

Da bi lažje identificirali in obravnavali bolnike s KLB, preden postanejo ti odvisni od dialize, je Kidney Disease Outcome Quality Initiative razvila smernice o klasifikaciji in vrednotenju KLB. Na podlagi ocene GF, laboratorijskih kazalcev ledvične okvare (hematurija, proteinurija...) ter s slikovnimi metodami, ki odkrivajo nenormalnosti ledvic, smernice definirajo in klasificirajo stopnje KLB, kot je prikazano v preglednici I. Smernice tudi povezujejo ledvično funkcijo z zapleti KLB in opredeljujejo tveganja izgube ledvične funkcije in razvoj srčno-žilnih bolezni (4).

Preglednica I: Stopnje KLB po Kidney Disease Outcome Quality Initiative smernicah (4)

Stopnje KLB	Ledvična funkcija	GF (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )
1.	Prisotna ledvična okvara z normalno ali povečano GF	$\geq 90$
2.	Ledvična okvara z blago zmanjšano GF	60–89
3.	Ledvična okvara z zmerno zmanjšano GF	30–59
4.	Ledvična okvara z zelo zmanjšano GF	15–29
5.	Končna ledvična odpoved	< 15

Srčno popuščanje (SP) oz. večje tveganje za razvoj SP je lahko vzrok za pojavnost ledvičnega popuščanja, ki se kaže pri GF manjši od  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  (6). Ledvično popuščanje je torej neodvisen napovedni dejavnik diastolične in sistolične disfunkcije. Pomembno je, da natančno definiramo napovedne dejavnike, saj s tem identificiramo posameznike z visokim tveganjem za SP, ki zahtevajo tesnejše spremljanje in intenzivnejšo intervencijo (7). SP pa je lahko tudi posledica ledvičnega popuščanja, saj so ugotovili, da imajo posamezniki z zmerno zmanjšano ledvično funkcijo večje tveganje za srčno-žilno obolevnost in umrljivost (2). Pri bolnikih s končno odpovedjo ledvic je umrljivost zaradi srčno-žilnih dogodkov 10- do 20-krat večja kot v splošni populaciji (8). Ledvično popuščanje je pogosteje prisotno pri ženskah in pri bolnikih, ki so starejši, ki imajo več simptomov SP, ki imajo koronarno arterijsko bolezen ali hipertenzijo in pri tistih, ki se ne zdravijo z zaviralci angiotenzin-konvertaze, beta-blokatorji ali spironolaktonom (7). Tveganje za kardiovaskularno smrt ali hospitalizacijo zaradi slabšanja kroničnega srčnega

popuščanja, kot tudi tveganje za umrljivost se poveča, ko se GF zniža pod 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (9).

### 1.3 EKSOGENI OZNAČEVALCI

GF najbolj točno določimo z merjenjem očistka nekega idealnega označevalca, ki se mora prosto filtrirati skozi glomerule in se pozneje v tubulih ne sme reabsorbirati, izločati ali presnavljati preko tubulov. Tak označevalec mora biti fiziološko inerten in varen, molekulska masa mora biti nizka, spojine se ne smejo vezati na plazemske proteine. Idealni označevalec mora biti sposoben doseči stabilno plazemsko koncentracijo, mora biti priročen, lahko dostopen, finančno sprejemljiv in ne sme spremeniti ledvične funkcije (3, 5).

#### 1.3.1 Inulin

Inulin je fruktozni polimer in se prosto filtrira preko glomerulov, se ne reabsorbira in izloča preko tubulov, se ne sintetizira oz. razgrajuje v telesu in je fiziološko inerten. Zaradi teh razlogov je očistek inulina postal zlati standard za merjenje GF. Očistek inulina se vseeno ne uporablja v redni klinični praksi (10). Zahteva namreč neprekinjeno intravensko infuzijo (klinično gledano je to nepraktično), zbiranje vzorcev krvi in urina (težava je točnost zbiranja urina, poleg tega je merjenje urina drago in rutinsko neprimerno) in pri bolnikih, ki ležijo v postelji, katetrizacijo sečnega mehurja v rednih časovnih razmikih (1, 5, 10, 11). Posledično je inulin uporabljen le v raziskovalnih študijah, kadar je potrebna zelo točna ocena ledvične funkcije (5).

#### 1.3.2 Radioaktivni označevalci

Zaradi vseh negativnih razlogov uporabe inulina so iskali ustrezne alternative in s tem namenom razvili radioaktivne označevalce (<sup>51</sup>Cr-EDTA, <sup>99</sup>Tc-DTPA), ki dajejo vrednosti GF primerljive s standardom – inulinskim očistkom. Radioaktivni označevalci so dokazani kot zanesljivi in točni za določanje GF, temeljijo na krvnih vzorcih in njihovo določanje je manj zahtevno kot inulinski test (10, 11). Prednost je tudi takojšnje določanje s štetjem radioaktivnosti (12). Metode z radioaktivnimi označevalci so torej enostavne in hitre, ampak imajo zaradi radioaktivnosti označevalcev kar nekaj negativnih lastnosti: za njihovo uporabo so zahtevane posebne licence, zapleteno je ravnanje z njimi, shranjevanje ter

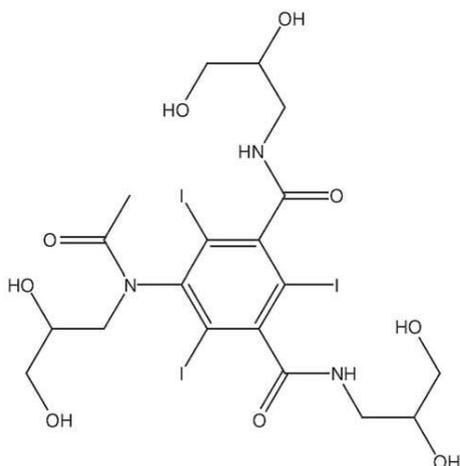
odstranjevanje odpadkov. Določene skupine bolnikov, kot na primer nosečnice, niso primerne za takšne raziskave (10).

### 1.3.3 Joheksol

Zaradi mnogih omejitev radioaktivnih označevalcev so razvili občutljivo metodo, ki omogoča določitev plazemskega očistka po enkratni injekciji majhnega odmerka neradioaktivne spojine. Ugotovili so, da sta kontrastna označevalca  $^{125}\text{I}$ -iotalamat in joheksol v odlični povezavi s plazemskim očistkom radioaktivnih označevalcev. Joheksol ima podoben farmakokinetični profil kot  $^{125}\text{I}$ -iotalamat, ampak je iz praktičnega vidika boljši joheksol, ker povzroča manj alergijskih reakcij. Kot možen vzrok za to navajajo, da joheksol manj vpliva na sproščanje histamina, serotonina in na aktivacijo kaskade komplementa kot pa  $^{125}\text{I}$ -iotalamat (10). Joheksol in  $^{125}\text{I}$ -iotalamat sta relativno draga in meritve z njima so časovno relativno zamudne, zato se v klinični praksi malo uporabljata (13).

Joheksol je kontrastno sredstvo, ki je v dobri korelaciji s standardnimi označevalci GF. Je relativno poceni, neradioaktiven in varen za uporabo in se zato lahko uporablja pri večini bolnikov, tudi pri nosečnicah, otrocih in starostnikih. Je enostaven za uporabo, ker za določanje GF ne potrebujemo urinskih vzorcev. Določitev GF z joheksolom je točna, varna in relativno lahka metoda (14, 15).

JOHEKSOL z lastniškim imenom OMNIPAQUE<sup>TM</sup> ima kemijsko ime 1-N, 3-N-bis (2,3-dihidroksipropil)-5-[N-(2,3-dihidroksipropil)-acetamido]-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid. Kemijska struktura joheksola je prikazana na sliki 1. Joheksol je neionsko, trijodno, monomerno in vodotopno rentgensko kontrastno sredstvo (11, 16). V primerjavi z ostalimi raztopinami rentgenskih kontrastnih sredstev je raztopina joheksola nizkoosmolarna. Glede na plazmo in cerebrospinalno tekočino pa je hiperosmolarna (17). Joheksol se uporablja za določanje GF v obliki raztopine za injiciranje, ki je bistra, sterilna, brezbarvna do blede rumena vodna raztopina. pH raztopine je od 6,8 do 7,6 (16). Molekulska masa joheksola je 821,14 Da (18).



Slika 1: Kemijska struktura joheksola (19).

### 1.3.3.1 Farmakokinetika joheksola

Po intravenski aplikaciji se joheksol porazdeli v zunajcelično tekočino in se izloča izključno z GF (18). Joheksol se ne presnavlja. Vezava joheksola na plazemske beljakovine je klinično nepomembna in jo lahko zanemarimo, saj se ga veže manj kot 2%. Pri bolnikih z normalno ledvično funkcijo je razpolovni čas porazdelitve 22 minut, volumen porazdelitve pa v povprečju 165 ml/kg. 90 % intravensko injiciranega joheksola se pri bolnikih z normalnim ledvičnim delovanjem izloči iz telesa nespremenjen preko ledvic v prvih 24 urah. Joheksol doseže največjo koncentracijo v urinu približno 1 uro po injiciranju. Pri bolnikih z normalno ledvično funkcijo je razpolovni čas izločanja 2,1 ure (16, 18).

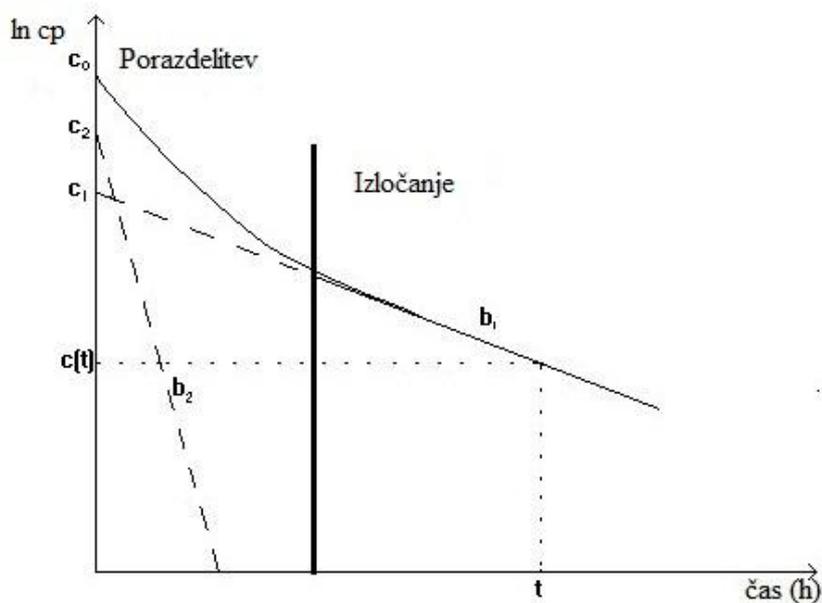
### 1.3.3.2 Uporaba joheksola

Kot rentgensko kontrastno sredstvo se joheksol uporablja pri odraslih in otrocih za različne diagnostične postopke. Radiološka nepropustnost joheksola temelji na dejstvu, da vsebuje jod, ki absorbira rentgenske žarke (16).

Tveganje za hujše neželene reakcije je pri uporabi joheksola majhno, ampak je potrebna posebna previdnost pri bolnikih z astmo, alergijo ali znanimi neželenimi reakcijami na jodirana kontrastna sredstva. Jodirana kontrastna sredstva lahko namreč sprožijo anafilaktoidno reakcijo ali druge oblike preobčutljivosti (16).

## 1.3.3.3 Določevanje hitrosti GF na osnovi očistka joheksola

Po aplikaciji intravenske injekcije lahko plazemski profil joheksola opišemo z dvoprostornim farmakokinetičnim modelom, kot ga vidimo na sliki 2. Začetni porazdelitveni fazi sledi faza izločanja. Linearnost funkcije  $\ln c_p = f(t)$  opazimo v fazi izločanja, vsaj 2 uri po injiciranju joheksola (10).



Slika 2: Plazemske koncentracije joheksola v odvisnosti od časa po aplikaciji intravenske injekcije (1).

Iz plazemskih koncentracij joheksola lahko izračunamo očistek joheksola na osnovi celotnega plazemskega profila, na osnovi 2-3 plazemskih vzorcev ali na osnovi enega plazemskega vzorca.

- **Očistek joheksola izračunan na osnovi celotnega plazemskega profila**

Očistek joheksola v tem primeru izračunamo na podlagi površine pod krivuljo iz plazemskega profila joheksola, kot je prikazano v enačbi 1 (10).

Očistek joheksola (enačba 1) (10):

$$Cl_{\text{joheksol}} = \frac{\text{odmerek}}{AUC} \quad (1)$$

*Cl<sub>joheksol</sub>...plazemski očistek joheksola; odmerek...odmerek joheksola; AUC...površina pod plazemsko krivuljo.*

Izračun očistka joheksola na podlagi celotnega plazemskega profila zagotavlja najbolj točne rezultate, vendar potrebujemo veliko število plazemskih vzorcev, vzetih po aplikaciji joheksola. Več potrebnih plazemskih vzorcev pa pomeni dražjo in bolj okorno metodo (10).

- **Očistek joheksola izračunan na osnovi 2-3 plazemskih vzorcev**

Vedno bolj se teži k temu, da se plazemski očistek joheksola določi na osnovi manjšega števila vzorcev (1-3 vzorci), kar je prednost tako za bolnike kot za medicinsko osebje. Zato za izračun očistka joheksola uporabimo poenostavljen enoprostorni model in ga izračunamo na podlagi vzorcev vzetih 2 do 4 ure po injiciranju odmerka joheksola, v fazi izločanja. Izračun očistka joheksola po enoprostornem modelu ne upošteva zgodnje porazdelitvene faze. To pomeni, da so očistki joheksola, izračunani po enoprostornem modelu, višji od očistkov joheksola, izračunanih iz površin pod krivuljo, zato jih popravimo z Bröchner-Mortensenovim popravkom (BM) (14, 20). Ta popravek je bil razvit na farmakokinetičnih podatkih za <sup>51</sup>Cr-EDTA in ne za joheksol (21). Ugotovili so odlične povezave med enoprostornim modelom, popravljenim z BM popravkom ter med dvoprostornim modelom (10). Plazemski očistek joheksola na osnovi enoprostornega modela lahko izračunamo s pomočjo enačbe 2 (22).

Očistek joheksola po enoprostornem modelu (enačba 2) (22):

$$Cl_{\text{joheksol}} = \left( \frac{\text{odmerek}}{C_0} \right) \times k_{el} \quad (2)$$

*Cl<sub>joheksol</sub>...plazemski očistek joheksola; odmerek...odmerek joheksola; C<sub>0</sub>...plazemska koncentracija joheksola ob času t = 0; k<sub>el</sub>...konstanta hitrosti eliminacije (min<sup>-1</sup>).*

Plazemske koncentracije joheksola ob času t=0 pri intravenski aplikaciji niso znane, zato je za izračun plazemskega očistka joheksola na osnovi enoprostornega modela uporabnejša

enačba 3, ko za izračun uporabimo konstanto hitrosti eliminacije in volumen porazdelitve. (23).

Očistek joheksola po enoprostornem modelu izračunan iz  $k_{el}$  in  $V_D$  (enačba 3) (23):

$$Cl_{joheksol} = V_D \times k_{el} \quad (3)$$

*Cl<sub>joheksol</sub>...plazemski očistek joheksola; k<sub>el</sub>...konstanta hitrosti eliminacije (min<sup>-1</sup>); V<sub>D</sub>...volumen porazdelitve (ml).*

Očistek joheksola, izračunan po enoprostornem modelom, popravimo z BM popravkom po enačbi 4 (10).

Očistek joheksola popravljen z BM popravkom (enačba 4) (10):

$$Cl_{joheksolBM} \left( \frac{ml}{min} \right) = (0,990778 \times Cl_{joheksol}) - (0,001218 \times Cl_{joheksol}^2) \quad (4)$$

*Cl<sub>joheksolBM</sub>...plazemski očistek joheksola popravljen z BM popravkom; Cl<sub>joheksol</sub>...plazemski očistek joheksola izračunan po enoprostornem modelu.*

- **Očistek joheksola izračunan na osnovi enega plazemskega vzorca**

Ugotovili so dobro korelacijo med očistkom joheksola, izračunanim iz več časovnih točk po aplikaciji joheksola, in med očistkom joheksola določenim iz ene časovne točke po aplikaciji joheksola. Očistek joheksola izračunamo iz enega časovnega vzorca po Jacobssonovi enačbi – enačba 5 (24, 25). Optimalni časi odvzema plazemskih vzorcev so pri GF pod 40 ml/min 10 ur po aplikaciji joheksola, pri GF od 40 do 99 ml/min po 4 urah in pri GF nad 100 ml/min po treh urah po aplikaciji joheksola (25).

Jacobssonova enačba (enačba 5) (25):

$$Cl_{joheksol} \left( \frac{ml}{min} \right) = \frac{\ln \frac{D}{ECV \times c_t}}{\frac{t}{ECV} + 0,0016} \quad (5)$$

*Cl<sub>joheksol</sub>...plazemski očistek joheksola; D...odmerek injiciranega joheksola (mg); t...časovni interval med injiciranjem in vzorčenjem (min); c<sub>t</sub>...plazemska koncentracija joheksola pri času t; ECV...ocena volumna porazdelitve (ml).*

Oceno volumna porazdelitve, ki jo potrebujemo za izračun Jacobssonove enačbe, izračunamo po enačbi 6 in 7 (26).

Ocena volumna porazdelitve za moške in ženske (enačbi 6 in 7) (26):

$$ECV_{moški} = 166 \times TM + 2590 \quad (6)$$

$$ECV_{ženske} = 95 \times TM + 6170 \quad (7)$$

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

Z enačbo 8 očistek joheksola pretvorimo iz absolutnih vrednosti (ml/min) v relativne vrednosti (ml/min/1,73m<sup>2</sup>), z upoštevanjem povprečne telesne površine. Telesno površino pa izračunamo po enačbi 9.

Prilagoditev očistka joheksola na povprečno telesno površino (enačba 8) (27):

$$Cl_{joheksolBM} \left( \frac{\frac{ml}{min}}{1,73m^2} \right) = Cl_{joheksolBM} \left( \frac{ml}{min} \right) \times \frac{1,73m^2}{BSA} \quad (8)$$

*Cl<sub>joheksolBM</sub>...očistek joheksola po Bröchner-Mortensenovem popravku; BSA...telesna površina (m<sup>2</sup>).*

Izračun telesne površine (enačba 9) (27):

$$BSA = 0,007184 \times TM^{0,425} \times TV^{0,72} \quad (9)$$

*BSA...telesna površina (m<sup>2</sup>); TM...telesna masa (kg); TV...telesna višina (cm).*

#### 1.4 ENDOGENI OZNAČEVALCI

Označevalci GF so tudi endogene snovi – serumski kreatinin, serumski cistatin C in kreatininski očistek (2). Idealna endogena snov za ocenitev GF se sprošča v krvni obtok s konstantno hitrostjo, se prosto filtrira preko glomerulov, se ne reabsorbira ali izloča preko ledvičnih tubulov in se izloča izključno preko ledvic (28).

Kreatininski očistek izračunamo iz koncentracije kreatinina v urinu, volumna urina in serumske koncentracije kreatinina in se smatra kot zlati standard v klinični praksi. Merjenje kreatininskega očistka zahteva 24-urno zbiranje urina, kar je neprijetno za bolnika, zahtevno in nagnjeno k napakam pri zbiranju, posebej pri otrocih in starejših (2, 3, 5).

Najpogosteje uporabljen serumski označevalec ledvične funkcije je serumski kreatinin, ki se za oceno ledvične funkcije ne uporablja sam, ampak v enačbah, ki ocenjujejo GF (29). Kreatinin nastaja v mišicah z neencimsko pretvorbo kreatina in fosfokreatinina (1, 28).

Določanje GF s serumskim kreatininom pa ima določene slabosti – serumske koncentracije kreatinina oz. stopnja proizvodnje kreatinina je odvisna od mišične mase in je zato manj točna za oceno ledvične funkcije pri starejših, ki imajo pogosto zmanjšano mišično maso (30). Na koncentracijo kreatinina vpliva tudi prehrana in spol (28). Serumske koncentracije so zmanjšane pri podhranjenosti, jetrni cirozi in pri amputaciji udov. Prav tako serumska koncentracija niha med dnevom – najvišje vrednosti so v zgodnjih večernih urah, najnižje v jutranjih urah (2).

Serumski kreatinin se prosto filtrira preko glomerulov, v tubulih se ne reabsorbira. Negativna lastnost določanja ledvične funkcije s serumskim kreatininom je ta, da se kreatinin v manjših količinah izloča tudi v ledvičnih tubulih. To izločanje kreatinina v tubulih se poveča pri povečani koncentraciji serumskega kreatinina. Tako se raven serumskega kreatinina ne zviša, dokler se zmerno ne zmanjša GF (na okoli 40 ml/min/1,73m<sup>2</sup>). To pomeni, da je serumski kreatinin neobčutljiv na zaznavanje majhnih znižanj GF, kar nakazuje na obstoj »sivega območja GF« (40-70 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) (28).

### 1.5 ENAČBE ZA OCENO GF NA OSNOVI SERUMSKEGA KREATININA

Da se izognemo praktičnim težavam očiščka kreatinina in da nadomestimo interindividualne razlike v nastajanju kreatinina, se je razvilo mnogo enačb, s katerimi izračunamo oGF. Te enačbe ocenjujejo GF z vključitvijo demografskih karakteristik – starost, spol, višina, teža, rasa in biokemičnih parametrov, ki vključujejo koncentracije serumskega kreatinina, sečnine in albumina (13, 15).

Vse te enačbe temeljijo na serumskem kreatininu in imajo zato omejitve zaradi uporabe serumskega kreatinina kot filtracijskega označevalca. Pri bolnikih z ekstremno mišično maso, z neobičajnimi dietami, s stanji povezanimi z zmanjšanim izločanjem kreatinina ali izvenledvičnim izločanjem kreatinina je lahko oGF na podlagi serumskega kreatinina netočna (31).

#### 1.5.1 Cockroft-Gaultova enačba

Cockroft-Gaultovo enačbo (C&G) so razvili leta 1976 na majhnem številu bolnikov, večinoma moških, z ledvično boleznijo nedefiniranega izvora. Enačba predstavlja oceno kreatininskega očiščka, ki ga izračunamo iz serumskega kreatinina, s popravkom za leta, mišično maso in spol – enačba predvidi, da imajo ženske 15% nižjo mišično maso (2, 28,

32). Predpostavka te enačbe je, da je mišična masa, ki se odraža z izločenim kreatininom, določen odstotek bolnikove telesne mase, ki pada linearno s starostjo (33). Enačba daje previsoke rezultate kreatininskega očistka pri vegetarijancih oz. ljudeh z nizko proteinsko dieto, pri bolnikih z debelostjo in pri podhranjenih. Nezanesljiva je tudi pri starejših in bolnikih z boleznijo jeter, obilnimi edemi in izgubo mišične mase (3, 4). C&G enačbo predstavlja enačba 10. Prilagoditev očistka kreatinina na povprečno telesno površino pa enačba 11.

Cockroft-Gaultova enačba (enačba 10) (34):

$$Cl_{Kr} \left( \frac{mL}{min} \right) = \frac{(140 - starost) \times TM}{0,814 \times S_{Kr}} \times (0,85 \text{ za ženske}) \quad (10)$$

$Cl_{Kr}$ ...očistek kreatinina; starost (leta);  $TM$ ...telesna masa (kg);  $S_{Kr}$ ...serumska koncentracija kreatinina ( $\mu mol/L$ ).

Prilagoditev očistka kreatinina na povprečno telesno površino (enačba 11) (33):

$$Cl_{Kr} \left( \frac{mL}{min \times 1,73m^2} \right) = Cl_{Kr} \left( \frac{mL}{min} \right) \times \frac{1,73m^2}{BSA} \quad (11)$$

$Cl_{Kr}$ ...očistek kreatinina;  $BSA$ ...telesna površina ( $m^2$ ).

Telesno površino izračunamo po enačbi 9.

### 1.5.2 Cockroft-Gaultova enačba z vpeljavo puste telesne mase (C&G-LBM)

Če je nastanek kreatinina manjši, je tudi serumska koncentracija kreatinina nižja, kar daje višje vrednosti kreatininskega očistka. Manjša proizvodnja kreatinina je lahko zaradi mišične atrofije, ascitesa ali izrazite debelosti. V teh abnormalnih primerih se priporoča, da namesto telesne mase v C&G enačbi uporabimo pusto telesno maso (LBM), ki jo izračunamo iz telesne mase po enačbi 13 in 14 (33, 34). Cockroft-Gaultovo enačbo z vpeljavo puste telesne mase pa izračunamo po enačbi 12.

Cockroft-Gaultova enačba z vpeljavo puste telesne mase (enačba 12) (35):

$$Cl_{Kr} \left( \frac{mL}{min} \right) = \frac{(140 - starost) \times LBM}{0,814 \times S_{Kr}} \times (0,85 \text{ za ženske}) \quad (12)$$

$Cl_{Kr}$ ...očistek kreatinina; starost (leta);  $S_{Kr}$ ...serumska koncentracija kreatinina ( $\mu mol/L$ );  $LBM$ ...pusta telesna masa (kg).

Pusta telesna masa (LBM) za izračun C&G-LBM (enačbi 13 in 14) (35):

$$\text{LBM (moški)} = 50 \text{ kg} + (0,9 \text{ kg za vsak cm nad } 150 \text{ cm telesne višine)} \quad (13)$$

$$\text{LBM (ženske)} = 45 \text{ kg} + (0,9 \text{ kg za vsak cm nad } 150 \text{ cm telesne višine)} \quad (14)$$

Prilagoditev  $Cl_{Kr}$  na povprečno telesno površino (enačba 15) (35):

$$Cl_{Kr} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min} \times 1,73 \text{m}^2} \right) = Cl_{Kr} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) \times \frac{1,73 \text{m}^2}{BSA} \quad (15)$$

$Cl_{Kr}$ ...očistek kreatinina;  $BSA$ ...telesna površina ( $\text{m}^2$ ).

Telesno površino izračunamo po enačbi 9.

### 1.5.3 Ocena GF z enačbo MDRD

The Modification of Diet in Renal Disease enačba s šestimi spremenljivkami (MDRD6) (enačba 16) je bila razvita leta 1999 na večjem številu bolnikov z ledvično boleznijo (1070) (32). Enačba ocenjuje GF z uporabo starosti, spola, rase, serumskega kreatinina, serumske sečnine in serumskega albumina. Enačba ne vključuje telesne mase, zato je manj nagnjena k napakam pri bolnikih s prekomerno telesno težo in pri hipervolemičnih (5).

MDRD enačba s šestimi spremenljivkami (enačba 16) (15):

$$GF \left( \frac{\frac{\text{ml}}{\text{min}}}{1,73 \text{m}^2} \right) = 170 \times (S_{Kr} \times 0,0011312)^{-0,999} \times \text{starost}^{-0,176} \times (0,762 \text{ za ženske})$$

$$\times (1,180 \text{ za črno raso}) \times (S_{sečnina} \times 2,801)^{-0,170} \times (S_{albumin} \times 0,1)^{0,318} \quad (16)$$

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

Leta 2000 so predstavili poenostavljeno verzijo originalne MDRD enačbe, ki za razliko od prvotne zahteva le 4 spremenljivke – serumski kreatinin, starost, spol in raso. Te spremenljivke zlahka pridobimo od bolnika (5). Vidimo jo v enačbi 17.

MDRD enačba s štirimi spremenljivkami (MDRD4) (enačba 17) (36):

$$GF \left( \frac{\frac{\text{ml}}{\text{min}}}{1,73 \text{m}^2} \right) = 175 \times \left( \frac{S_{Kr}}{88,4} \right)^{-1,154} \times \text{starost}^{-0,203} \times (0,742 \text{ za ženske}) \times$$

$$\times (1,180 \text{ za črno raso}) \quad (17)$$

$GF$ ...glomerulna filtracija;  $S_{Kr}$ ...serumska koncentracija kreatinina ( $\mu\text{mol/L}$ );  $\text{starost}$  (leta).

Določene skupine bolnikov niso bile dobro zastopane v MDRD študiji, ki je pretežno vključevala kavkazijce, nediabetične bolnike s stabilno GF okoli 40 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Problematični so bolniki z ekstremno telesno površino, starejši od 60 let ali mlajši od 18 let, močno podhranjeni ali z debelostjo, bolniki z boleznimi skeletnega mišičevja, vegetarijanci in tisti s hitro spreminjajočo ledvično funkcijo kot pri akutni ledvični poškodbi (5). Na začetni študiji, ki so jo izvajali za razvoj enačbe so ugotovili, da več kot 10% rezultatov odstopa za več kot 30% od podatkov pridobljenih z referenčno metodo <sup>125</sup>I-<sup>125</sup>Iotalamatom (33).

MDRD in C&G enačbi sta neprimerni za določanje oGF pri zdravih posameznikih. Pri bolnikih s KLB podcenjujeta GF nad približno 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (v 1. fazi kronične ledvične bolezni) in izrazito precenjujeta GF pod približno 20 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (v 4. in 5. fazi kronične ledvične bolezni). Nekatere študije kažejo na večjo točnost MDRD enačbe, medtem ko druge poročajo podobno uspešnost obeh enačb (5).

Vrednosti izračunane z MDRD enačbo so v relativnih enotah. Za prilagoditev oGF na absolutne enote uporabimo enačbo 18.

Prilagoditev GF na povprečno telesno površino (enačba 18) (33):

$$GF \left( \frac{ml}{min} \right) = GF \left( \frac{\frac{ml}{min}}{1,73m^2} \right) \times \frac{BSA}{1,73m^2} \quad (18)$$

*GF...glomerulna filtracija; BSA...telesna površina (m<sup>2</sup>).*

Telesno površino izračunamo po enačbi 9.

#### 1.5.4 Ocena GF z enačbo CKD-EPI

Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration enačba (CKD-EPI) je bila razvita leta 2009 na ogromnem številu prostovoljcev (5504) in je vključevala zdrave ljudi in bolnike z različnimi boleznimi, ki bi lahko vodile v okvaro ledvične funkcije. CKD-EPI enačba napoveduje GF pri odraslih iz serumskega kreatinina. Enačba uporablja različne korekcijske faktorje v specifičnih območjih plazemskih koncentracij kreatinina. Ne vključuje pa podatkov o telesni teži in višini bolnika. Ta enačba kaže izboljšano točnost v primerjavi z MDRD enačbo za oceno ledvične funkcije, pri GF višjem od 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (33). CKD-EPI enačba je kompleksnejša kot MDRD4, ampak je lahko zlahka vključena v klinični laboratorij, saj zahteva enake spremenljivke kot MDRD4 enačba. Posameznike bolj primerno kategorizira glede na dolgoročna klinična tveganja za

ledvično odpoved, koronarno srčno bolezen, kap in umrljivost zaradi vseh vzrokov, kot pa MDRD enačba (37, 38). Omejitve CKD-EPI študije so bile, da je malo udeležencev imelo GF v normalnem območju, malo je bilo starejših od 70 let in bilo je omejeno število rasnih in etičnih manjšin, zato je v teh primerih CKD-EPI enačba manj točna (5, 37). Določeni bolniki so imeli nepopolne podatke o kliničnem stanju in o zdravlilih, ki lahko vplivajo na serumski kreatinin neodvisno od GF (5). V primerjavi z MDRD in C&G enačbo je bila CKD-EPI predlagana kot najboljša enačba za ocenitev GF pri odločitvah glede odmerka zdravila (33).

CKD-EPI enačbo so razvili za črno in za belo raso. Enačbe 19-22 predstavljajo enačbe za moške in ženske bele rase.

CKD-EPI enačbe (enačbe 19-22) (37):

Ženske – serumski kreatinin  $\leq 62 \mu\text{mol/L}$  oz.  $\leq 0,7 \text{ mg/dl}$ :

$$GF = 144 \times \left(\frac{SKr}{0,7}\right)^{-0,329} \times (0,993)^{starost} \quad (19)$$

Ženske – serumski kreatinin  $> 62 \mu\text{mol/L}$  oz.  $> 0,7 \text{ mg/dl}$

$$GF = 144 \times \left(\frac{SKr}{0,7}\right)^{-1,209} \times (0,993)^{starost} \quad (20)$$

Moški – serumski kreatinin  $\leq 80 \mu\text{mol/L}$  oz.  $\leq 0,9 \text{ mg/dl}$

$$GF = 141 \times \left(\frac{SKr}{0,9}\right)^{-0,411} \times (0,993)^{starost} \quad (21)$$

Moški – serumski kreatinin  $> 80 \mu\text{mol/L}$  oz.  $> 0,9 \text{ mg/dl}$

$$GF = 141 \times \left(\frac{SKr}{0,9}\right)^{-1,209} \times (0,993)^{starost} \quad (22)$$

*GF...glomerulna filtracija; SKr...serumska koncentracija kreatinina ( $\mu\text{mol/L}$ ); starost (leta).*

Prilagoditev CKD-EPI enačbe iz relativnih v absolutne vrednosti predstavlja enačba 23.

Prilagoditev GF na povprečno telesno površino (enačba 23) (37):

$$GF \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}}\right) = GF \left(\frac{\frac{\text{ml}}{\text{min}}}{1,73\text{m}^2}\right) \times \frac{BSA}{1,73\text{m}^2} \quad (23)$$

*GF...glomerulna filtracija; BSA...telesna površina ( $\text{m}^2$ ).*

Telesno površino izračunamo po enačbi 9.

## 1.6 VPLIV TELESNE SESTAVE NA LEDVIČNO FUNKCIJO

Telesna sestava kot celota je pomembna informacija pri identifikaciji obsega motenj v uremiji, ki se pojavi pri kronični odpovedi ledvic. Pri ledvičnem popuščanju sta pogosto prizadeti dve pomembni funkciji ledvic – nadzor metabolizma vode in natrija. Izgubljajo se tudi proteini, kar vodi v hipoproteinemijo. Pri tem nastanejo edemi, ki še poslabšajo stanje zadrževanja vode in natrija (39). Posledica je, da imajo bolniki s KLB moteno tekočinsko ravnovesje. Pri bolnikih s preveliko količino tekočine pa pride do hipertenzije oz. srčno-žilnega obolenja (40). Bolniki v napredovalih stopnjah KLB trpijo zaradi podhranjenosti, saj je vnos hranil mnogokrat nižji od prehranskih potreb, kar vodi v različne presnovne motnje, zmanjšano delovanje tkiva in izgubo telesne mase. Telesna masa je sestavljena iz maščobne mase in puste telesne mase. Pusta telesna masa lahko služi kot indeks mišične mase in somatsko skladiščenje beljakovin, medtem ko maščobna masa bolj neposredno odraža shranjevanje energije (41). Zelo je pomembno, da imamo celovit pogled na sestavo telesa, ker to omogoča preprečevanje srčno-žilnih in presnovnih bolezni, klinična upravljanja različnih kroničnih bolezni in spremljanje učinkov zdravljenja na tkivih (42).

## 2. NAMEN DELA

Bolniki s SP imajo večjo pojavnost ledvičnega popuščanja, zato je točnost ocene ledvične funkcije izredno pomembna. Oceno GF, ki je merilo za ledvično funkcijo določimo z merjenjem očistka nekega idealnega označevalca, ki se izključno filtrira skozi glomerule.

Joheksol je kontrastno sredstvo in je odličen eksogeni označevalec, s katerim lahko točno, razmeroma lahko in varno določimo GF. Na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik so bolnikom s kroničnim srčnim popuščanjem (n=44) intravensko aplicirali joheksol. Vzetim plazemskim vzorcem bomo z metodo HPLC-UV, ki je bila predhodno razvita in validirana, določili koncentracije joheksola. Plazemske koncentracije joheksola bomo določili tik pred intravensko aplikacijo joheksola in 3 ter 4 ure po aplikaciji. Na podlagi plazemskih koncentracij bomo določili očistke joheksola.

Očistke joheksola bomo bolnikom določili na dveh obiskih s približno 6 mesečnim zamikom in ugotavljali ali se je očistek joheksola v tem času kaj spremenil.

Očistke joheksola na prvem obisku bomo primerjali z oGF na osnovi enačb, ki predvidijo GF na podlagi serumskega kreatinina (MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM, CKD-EPI). Določili bomo katera od enačb najboljše ocenjuje ledvično funkcijo pri bolnikih s SP.

Pri analizi bomo bolnike s prvega obiska dodatno razdelili v dve skupini glede na očistek joheksola – nad in pod  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , ko so definirane zgodnje faze KLB.

Dodatno bomo ugotavljali kateri parametri telesne sestave so pri bolnikih s SP povezani s točnostjo oGF s pomočjo omenjenih enačb glede na izmerjen očistek joheksola.

Namen naloge je torej ugotoviti katera enačba na osnovi serumskega kreatinina najboljše ocenjuje GF glede na izračunan očistek joheksola pri izbrani populaciji bolnikov s kroničnim srčnim popuščanjem.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Biološki material – plazma

Na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, Ljubljana smo pridobili humano plazmo, ki ji je bil dodan antikoagulant EDTA. Plazmo smo hranili v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Potrebovali smo jo za pripravo umeritvene premice pri analizni metodi.

Realne vzorce 44 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 na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik in ima odobritev Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko. Bolnikom so z intravensko injekcijo aplicirali 5 ml zdravila Omnipaque 300, kar ustreza 1500 mg joda oz. 3235 mg joheksola. Po aplikaciji zdravila so bolnika opazovali še 15 minut. Vzorci krvi so bili odvzeti tik pred aplikaciji joheksola in približno 3 in 4 ure po aplikaciji zdravila.

##### 3.1.2 Standardi

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

##### 3.1.3 Reagenti in topila

- 70% perklorna kislina, Chromasol V® ( $\text{HClO}_4$ );  $M=100,46$  g/mol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 85% ortofosforna kislina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ );  $M=98$  g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- Ultra čista voda, pridobljena z aparatom Mili-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA), specifična upornost  $18,2$  M $\Omega$ cm, celokupni organski ogljik (TOC) 5, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

- Acetonitril Chromasol V® (CH<sub>3</sub>CN); M=41,05 g/mol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 25% amonijak (NH<sub>3</sub>); M=17,03 g/mol (Panreac Quimica S.A.U., Barcelona, Španija)
- Kalijev dihidrogen fosfat, p. a. (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); M=136,08 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- Puferski raztopini pH=2 in pH=3 (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- Puferska raztopina pH=4 (Panreac Quimica S.A.U., Barcelona, Španija)

### 3.1.4 Naprave in pribor

- HLADILNIK (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- ZAMRZOVALNIK – 20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- ZAMRZOVALNIK – 70 °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 2-20μL, 20-200 μL in 200-1000 μL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- PLASTIČNE EPICE oz. MIKROCENTRIFUGIRKE - PLASTIBRAND® (Brand, Nemčija)
- HPLC KOLONA: SNYNERGI Hydro, 250 x 4,60 mm, 4 μm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- HPLC PREDKOLONA: C<sub>18</sub>, 4 x 2,0 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija)
- 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

#### 3.2.1 Priprava vzorcev in analiza na HPLC

Meritve standardnih plazemskih raztopin in realnih plazemskih vzorcev smo izvajali na HPLC-UV. Optimizacijo in validacijo te metode so izvedli leta 2012 v Ljubljani na Fakulteti za farmacijo v okviru diplomske naloge Nike Marđetko, z naslovom Določanje plazemskih koncentracij kontrastnega sredstva joheksola za oceno hitrosti glomerulne filtracije (43). Zato smo osnovne raztopine, topila, pufre, standardne plazemske vzorce za umeritveno premico in realne plazemske vzorce pripravljali po postopkih opisanih v omenjeni diplomski nalogi (43).

#### Priprava osnovnih raztopin, topil in pufrov

- Osnovno raztopino naše učinkovine joheksola v koncentraciji 10 mg/ml smo pripravili v 1,5 ml epicah. Učinkovino smo najprej natehtali v epico (mase natehte so bile od 9,96 do 10,12 mg), nato pa glede na točno zatehto dodali toliko ultra čiste vode, da smo dobili točno koncentracijo osnovne raztopine, 10 mg/ml. Osnovno raztopino smo hranili v hladilniku pri 4 °C največ en mesec (43).
- 50 mM fosfatni pufer s pH=3 za mobilno fazo: Na tehtič smo natehtali 6,804 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in ga kvantitativno prenesli v 1000 ml bučko ter bučko z ultra čisto vodo dopolnili do oznake. S pomočjo predhodno umerjenega pH metra smo z 85 % ortofosforno kislino pripravljeno raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  umerili na pH=3, jo nato filtrirali s pomočjo presesalne buče in razplinili v ultrazvočni kadički. Pripravljen pufer smo uporabljali za mobilno fazo pri HPLC metodi. Pripravljali smo ga pred vsako analizo, tako da je bil pufer vedno sveže pripravljen (43).
- 2,5% raztopina amonijaka: V digestoriju smo v 1,5 ml epico odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  25% amonijaka in dodali 900  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode. Pripravljeno raztopino smo

približno 20 sekund vorteksirali. 2,5% raztopino amonijaka smo pripravljali sproti, pri vsaki pripravi plazemskih vzorcev (43).

#### Priprava standardnih raztopin joheksola za umeritveno krivuljo

Iz osnovne raztopine joheksola s koncentracijo 10 mg/ml smo z redčenjem z vodo pripravili standardne raztopine. Pripravili smo 8 standardnih raztopin in slepi vzorec za umeritveno premico. Preglednica II prikazuje pripravo standardnih raztopin joheksola iz osnovne raztopine (43).

Preglednica II: Priprava standardnih raztopin joheksola (z redčitvijo osnovne raztopine s koncentracijo 10 µg/ml) za umeritveno krivuljo:

Volumen osnovne raztopine (µL)	Volumen vode (µL)	Koncentracija joheksola (µg/ml)
0	1000	0
2,5*	997,5	25
5*	995	50
10*	990	100
25	975	250
25	475	500
60	540	1000
100	300	2500
200	200	5000

\*Nizke koncentracije joheksola pripravimo z dvostopenjskim redčenjem.

#### Priprava standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo in realnih plazemskih vzorcev

Za pripravo standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo smo v epice odpipetirali 225 µL slepe plazme in 25 µL ustrezne standardne raztopine s koncentracijami navedenimi v preglednici II. Na ta način smo pripravili standardne plazemske vzorce s koncentracijami 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 in 5000 µg/ml ter slepi vzorec. Standardni plazemski vzorec smo vorteksirali 15 sekund in ga 100 µL odpipetirali v novo epico. Prav tako smo v epice odpipetirali 100 µL realnega plazemskega vzorca.

Nadaljnji postopek priprave standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo in realnih plazemskih vzorcev je bil enak. Vzorcem smo dodali 200 µL 5 % perklorne kisline in jih 3 minute vorteksirali. Sledila je 5 minutna sonifikacija v ultrazvočni kadički in centrifugiranje (10 min, 10000g in 4 °C). V novo epico smo odpipetirali 100 µL supernatanta in mu dodali 70 µL 2,5 % amonijaka ter nastalo raztopino vorteksirali 30

sekund. 150  $\mu\text{L}$  raztopine smo nato odpipetirali v inserte in te vstavili v vialo za HPLC analizo (43).

#### Analiza vzorcev na HPLC

Vzorci smo analizirali s HPLC-UV detekcijo pod enakimi pogoji kot v diplomski nalogi Nike Mardetko, kjer so metodo razvili in tudi validirali v skladu s FDA smernicami (44).

Uporabili smo sledeče pogoje HPLC analize (43):

- kolona: Synergi Hydro  $\text{C}_{18}$  250 x 4,60 mm 4  $\mu\text{m}$  (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  $^{\circ}\text{C}$
- valovna dolžina detekcije: 254 nm
- volumen injiciranja: 50  $\mu\text{L}$
- čas analize: 7 minut

### **3.2.2 Določanje plazemske koncentracije joheksola**

Joheksol ima zaradi kirlnih centrov in omejene rotacije več izomernih oblik (45). Z navedeno analizo metodo smo pri določanju plazemskih koncentracij joheksola dobili dva kromatografska vrha, ki ustrezata endo- in ekso-izomeroma joheksola (19). Literatura navaja, da se razmerje med površinama obeh vrhov s koncentracijo joheksola v območju metode ne spreminja, zato smo za izračun plazemskih koncentracij joheksola uporabili le površino pod večjim, to je drugim vrhom (10).

Iz odzivov standardnih plazemskih vzorcev smo v programu Microsoft Excel 2010 z metodo linearne regresije določili enačbo umeritvene premice v obliki  $y = kx + n$ .  $y$  predstavlja površino pod drugim kromatografskim vrhom analita,  $x$  je koncentracija analita v vzorcu,  $k$  je naklon premice,  $n$  pa je odsek na ordinati. Korelacijo med koncentracijo analita v vzorcu in odzivom smo ovrednotili z deteminacijskim koeficientom ( $r^2$ ). Iz umeritvene krivulje smo z vstavljanjem površin pod krivuljo posameznih standardnih vzorcev izračunali koncentracijo joheksola. Iz te izračunane koncentracije in nominalne koncentracije joheksola v posamezni standardni raztopini smo določili točnost po enačbi 24, ki je lahko odstopala za največ 15% od prave koncentracije.

Točnost (enačba 24):

$$Točnost (\%) = 100 \times \frac{c_i}{c_n} \quad (24)$$

$c_i$ ...koncentracija joheksola izračunana iz umeritvene premice;  $c_n$ ...nominalna koncentracija joheksola.

Iz dobljene umeritvene krivulje in odzivov posameznih plazemskih vzorcev smo določili plazemske koncentracije joheksola v realnih vzorcih, ki so bili odvzeti 3 in 4 ure po aplikaciji zdravila. Bolniki, ki niso imeli vzorcev odvzetih ali po 3 urah ali po 4 urah, smo plazemske koncentracije joheksola določili z vzorcem odvzetim 2 uri po aplikaciji joheksola. Prav tako smo s HPLC analizirali tudi vzorce, ki so bili odvzeti tik pred aplikacijo joheksola. S temi vzorci smo pri posameznih bolnikih dokazali, da v plazemskih vzorcih ni prisotnih snovi, ki bi se izločale iz HPLC kolone sočasno z joheksolom.

### 3.2.3 Izračun očistka joheksola

Na podlagi plazemskih koncentracij joheksola, odvzetih posameznemu bolniku ob času  $t=3h$  in  $t=4h$  smo izračunali konstanto hitrosti eliminacije po enačbi 25 in z enačbo 26 ocenili volumen porazdelitve joheksola ( $V_D$ ). Po enačbi 3 smo nato določili plazemski očistek joheksola izračunan na osnovi dveh vzorcev.

Konstanta hitrosti eliminacije ( $k_{el}$ ) (enačba 25):

$$k_{el} = \frac{\ln c_1 - \ln c_2}{t_2 - t_1} \quad (25)$$

$c_1$ ...koncentracija joheksola ob času  $t_1$ ;  $c_2$ ...koncentracija joheksola ob času  $t_2$ ;  $t_1$ ...čas 1 od aplikacije joheksola (min);  $t_2$ ...čas 2 od aplikacije joheksola (min).

Volumen porazdelitve joheksola ( $V_D$ ) (enačba 26):

$$V_D = \frac{D \times e^{-k_{el} \times t}}{c} \quad (26)$$

$D$ ...odmerek joheksola;  $k_{el}$ ...konstanta hitrosti eliminacije ( $\text{min}^{-1}$ ),  $c$ ...koncentracija joheksola ob času  $t$ ;  $t$ ...čas od aplikacije joheksola (min).

Ker smo na ta način izračunali očistek joheksola na osnovi enoprostornega modela, smo upoštevali še BM popravek (enačba 4). Izračunane očistke joheksola smo prilagodili tudi na povprečno telesno površino odraslega človeka (enačba 8).

Enemu bolniku je bil odvzet vzorec krvi le v eni časovni točki po aplikaciji joheksola. Temu bolniku smo očistek joheksola izračunali na podlagi Jacobssonove enačbe (po enačbi 5), ki velja za en vzorec, ki je vzet po aplikaciji joheksola.

### 3.2.4 Ocena GF na osnovi serumskih koncentracijah kreatinina

Uporabili smo enačbe, ki za oceno ledvične funkcije napovedujejo GF z vključitvijo demografskih karakteristik – starost, spol, višina, teža, rasa in biokemičnih indeksov, ki vključujejo serumski kreatinin, sečnino in albumin. Oceno ledvične funkcije smo določili s C&G enačbo (enačba 10), C&G enačbo z vpeljavo LBM (enačba 12), MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami (enačba 17), MDRD enačbo s šestimi spremenljivkami (enačba 16) in CKD-EPI enačbami (enačbe 19-22).

Vrednosti oGF s posameznimi enačbami smo primerjali v absolutnih vrednostih (ml/min). Pri primerjavi dveh skupin bolnikov glede na očistek joheksola – nad in pod 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, pa smo podali oGF glede na povprečno telesno površino odraslega človeka. Zato smo vse oGF preračunali še v relativne enote.

### 3.2.5 Statistično vrednotenje rezultatov

Rezultate izračunanih očistkov joheksola in ocen ledvične funkcije po različnih enačbah smo obdelali s programom Microsoft Excel 2010.

- a) Korelacija med očistki joheksola in ocenami ledvične funkcije z enačbami MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI pri bolnikih s SP na 1. obisku

Najprej nas je zanimalo, katera enačba najbolje ocenjuje ledvično funkcijo pri bolnikih s SP, zato smo določali korelacijo očistka joheksola in ocen ledvične funkcije oz. določali smo determinacijski koeficient ( $r^2$ ) in Pearsonov korelacijski koeficient ( $r$ ). Za izračune smo uporabili absolutne vrednosti očistkov in ocen ledvične funkcije (ml/min) bolnikov s prvega obiska. V programu Microsoft Excel 2010 smo narisali raztreseni grafikon očistka joheksola v odvisnosti od ocen ledvične funkcije z različnimi enačbami. V programu SPSS (Statistics Version 21) pa smo določali, če so razlike med očistkom joheksola in oGF na osnovi serumskega kreatinina statistično značilne. Izračunali smo tudi napako meritve (SE), relativno napako (PE), povprečno relativno napako (MPE) in povprečno absolutno napako (MAPE) (32). Napake so prikazane v enačbah 27-30.

Napaka meritve, relativna napaka, povprečna relativna napaka in povprečna absolutna napaka (enačbe 27 – 30) (32):

$$SE = iGF - jGF \quad (\text{enačba 27}) \quad (27)$$

$$PE = \frac{(iGF - jGF)}{jGF} \times 100\% \quad (\text{enačba 28}) \quad (28)$$

$$MPE = \frac{1}{N} \times \sum \frac{(iGF - jGF)}{jGF} \times 100\% \quad (\text{enačba 29}) \quad (29)$$

$$MAPE = \frac{1}{N} \times \sum \frac{|iGF - jGF|}{jGF} \times 100\% \quad (\text{enačba 30}) \quad (30)$$

*N...število bolnikov; iGF...izračunana vrednost GF na osnovi enačb; jGF...očistek joheksola; SE...napaka meritve; PE...relativna napaka; MPE...povprečna relativna napaka; MAPE...povprečna absolutna napaka.*

b) Primerjava dveh skupin bolnikov iz prvega obiska – nad in pod 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>

Na prvem obisku smo bolnike razdelili glede na očistek joheksola nad in pod 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. Ocenam ledvične funkcije po enačbah MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI smo določili SE (enačba 27), MPE (enačba 29) in MAPE (enačba 30).

c) Primerjava očistka joheksola na prvem in drugem obisku

V programu SPSS (Statistics Version 21) smo s parnim Studentovim t-testom primerjali očistek joheksola pri posameznih bolnikih v absolutnih vrednostih (ml/min) na prvem obisku in na drugem obisku – po približno šestih mesecih.

Najprej smo predpostavili ničelno hipotezo  $H_0$  in alternativno hipotezo  $H_1$ :

$H_0$ : Vrednosti očistka joheksola s 1. in 2. obiska so enake ( $H_0: \rho=0$ )

$H_1$ : Vrednosti očistka joheksola s 1. in 2. obiska niso enake ( $H_1: \rho \neq 0$ )

Pri stopnji tveganja  $\alpha=0,05$  in dvostranskem testu smo s parnim Studentovim t-testom določili p-vrednost.

d) Vpliv telesne sestave na ledvično funkcijo

Vpliv telesne sestave na ledvično funkcijo smo določali z linearno regresijo v programu SPSS (Statistics Version 21). Ugotavljali smo korelacijo razlik med očistki joheksola in oGF z enačbami MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI s posameznimi

parametri telesne sestave, ki so bili na kliniki predhodno določeni bolnikom na prvem obisku z metodama bioimpedanca (BIA) in dvoenergijska absorpciometrija z rentgenskimi žarki (DEXA).

BIA omogoča oceno telesne sestave z merjenjem impedance človeškega telesa pri prehodu električnega toka (40). Mišice, cerebrospinalna tekočina in kri so dobro prevodni, saj vsebujejo veliko vode in elektrolitov. Kostni, maščobni in z zrakom napolnjeni organi pa slabo prevajajo električni tok (46). Prednost te metode je, da omogoča hitro, varno, neinvazivno merjenje telesne sestave in je zato primerna metoda v rutinski klinični praksi (40). DEXA je bila prvotno razvita predvsem za diagnozo osteoporoze, kasneje so jo razširili in danes z njo zlahka merimo tri glavne telesne komponente – maščobno maso, čisto mišično maso in mineralno kostno maso (42). Bolnika obsevamo z x-žarki in merimo spremembo v intenziteti žarka, ki je prešel merjenca (46). DEXA je hitra, neinvazivna metoda z nizko izpostavljenostjo sevanju za določanje telesne sestave (42).

Izmerjeni in izračunani parametri telesne sestave so bili: odstotek telesnega maščevja (%), masa maščevja (kg), odstotek puste telesne mase (%), pusta telesna masa (kg), odstotek puste telesne mase brez vode (%), pusta telesna masa brez vode (kg), odstotek vode v telesu (%), voda v telesu (L), telesna masa (kg), indeks brezmaščobne mase ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) in brezmaščobna masa (kg). Za izračun PE smo uporabili absolutne vrednosti (ml/min) očistka joheksola in ocen ledvične funkcije po različnih enačbah.

## 4. REZULTATI

Realne vzorce bolnikov s SP smo pridobili v okviru raziskave, ki se izvaja na Kliniki Golnik. V preglednici III so podane karakteristike bolnikov na 1. obisku.

Preglednica III: Karakteristike bolnikov s SP

Karakteristike	n	mediana (območje)	delež (%)
Število bolnikov	44		100
spol:			
moški	26		59,1
ženski	18		40,9
starost (leta)		74 (54 - 87)	
teža (kg)		82,5 (41 - 116)	
višina (cm)		165,5 (148 - 188)	
BMI:			
BMI<18,5	1		2,3
18,5<BMI<25	8		18,2
25<BMI<30	15		34,1
BMI>30	20		45,5
BSA (m <sup>2</sup> )		1,93 (1,30 - 2,21)	

*n...število bolnikov v posamezni karakteristiki; BSA...telesna površina (m<sup>2</sup>); BMI...indeks telesne mase (kg/m<sup>2</sup>)*

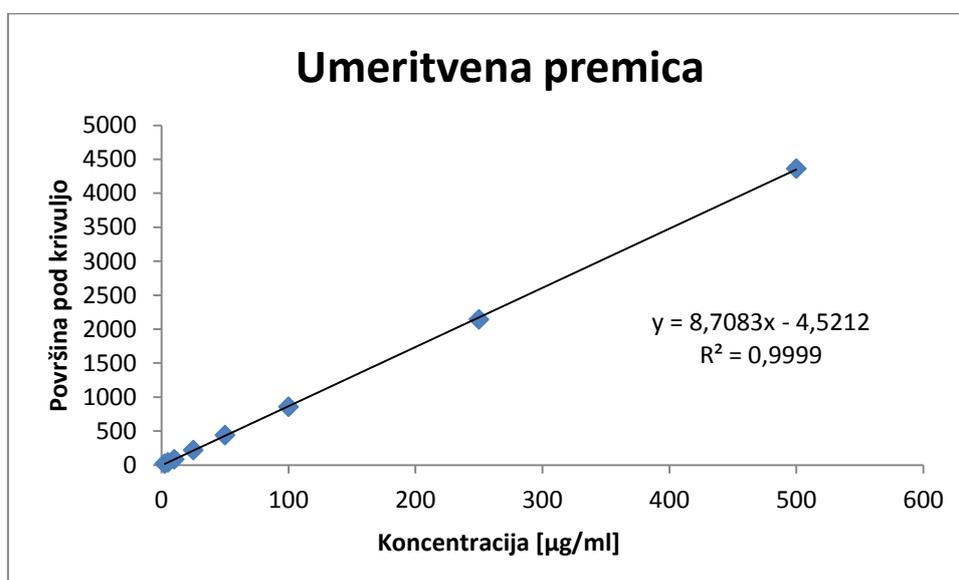
### 4.1 Določanje plazemske koncentracije joheksola

Pri analizi plazemskih vzorcev na HPLC smo dobili kromatogram z dvema vrhovoma. Pri nadaljnjih izračunih smo upoštevali le površino pod drugim kromatografskim vrhom. Na podlagi standardnih plazemskih vzorcev smo določili umeritveno krivuljo, s pomočjo katere smo izračunali koncentracije joheksola v vzorcih bolnikov s SP.

Preglednica IV prikazuje površine pod krivuljo pri posameznih koncentracijah standardnih plazemskih vzorcev. Z linearno regresijo smo določili umeritveno premico  $y = 8,7083x - 4,5212$ , ki jo vidimo na sliki 3. Determinacijski koeficient ( $r^2$ ) je 0,9999. Po enačbi 24 smo izračunali točnost, ki je podana v preglednici IV.

Preglednica IV: Točnost standardnih plazemskih vzorcev

Koncentracija (µg/ml)	Površina pod krivuljo	Izračunana koncentracija (µg/ml)	Točnost (%)
2,5	20,5	2,9	114,9
5	39,6	5,1	101,3
10	84,9	10,3	102,7
25	219,9	25,8	103,1
50	440,5	51,1	102,2
100	857,5	99,0	99,0
250	2144,4	246,8	98,7
500	4364,1	501,7	100,3



Slika 3: Umeritvena premica standardnih plazemskih vzorcev joheksola.

V preglednici V so posamezni odzivi in izračunane plazemske koncentracije joheksola v vzorcih odvzetih 3 in 4 ure po aplikaciji joheksola pri bolnikih s prvega obiska.

Preglednica V: Odzivi in izračunane plazemske koncentracije joheksola 3 in 4 ure po aplikaciji joheksola

Številka bolnika	Odziv t=3h	Koncentracija (µg/ml) t=3h	Odziv t=4h	Koncentracija (µg/ml) t=4h
1	1066,5	92,0	772,3	66,5
2	983,8	89,7	644	58,6
3	748,1	68,1	600,1	54,6
4	823,1	75,0	654,1	59,5

Nadaljevanje preglednice V:

5	1603	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	92,8
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*	1386,7	159,8	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	114,3	1033,6	88,9
18	699,3	60,2	531,6	45,7
19	916,2	79,0	782	67,4
20*	1279,3	147,4	830,3	71,3
21	1020,7	95,4	807,8	75,3
22	417,1	40,2	334,15	32,1
23	1060,2	99,1	704,6	65,6
24*	896,5	103,5	697,5	65,0
25	1336	125,0	1050,6	98,2
26	1223,4	114,4	1017,4	95,0
27*	1993,2	229,4	1600,9	154,5
28	1001,8	96,9	811,8	78,6
29	922,4	89,3	733,2	71,1
30	940,3	91,0	790	76,5
31	781,1	75,7	644,7	62,5
32*	1464,7	141,5	/	/
33	708	68,6	509,3	49,5
34	601,4	58,4	470,8	45,8
35*	902	104,1	467,7	45,5
36	1307	126,3	1157,6	111,9
37	289,8	29,2	218,8	22,2
38	490,6	49,1	356,2	35,8
39	1369,8	136,1	1076,8	107,1
40	794,7	79,2	586,1	58,5
41	985,5	95,4	792,9	76,8
42	645,1	62,6	395,9	38,6
43*	1260,3	145,2	984,1	95,2
44	1242,8	120,1	1078,5	104,3

\*Pri bolnikih številka 12 in 24 smo plazemske koncentracije joheksola izračunali iz

vzorcev odvzetih dve in tri ure po aplikaciji joheksola, pri bolnikih številka 20, 27, 35, 43 pa iz vzorcev vzetih dve in štiri ure po aplikaciji.

V preglednici VI so posamezni odzivi in izračunane plazemske koncentracije joheksola v vzorcih odvzetih 3 in 4 ure po aplikaciji joheksola pri bolnikih z drugega obiska.

Preglednica VI: Odzivi in izračunane plazemske koncentracije joheksola 3 in 4 ure po aplikaciji joheksola

Številka bolnika	Odziv t=3h	Koncentracija t=3h	Odziv t=4h	Koncentracija t=4h
1	1089,8	125,7	811,2	93,7
2	830,1	95,8	654,5	75,7
3	1031,2	118,9	576,1	66,7
4	1361,3	156,8	1204,9	138,9
5	984	113,5	856,6	98,9
6	986,5	113,8	801,5	92,6
7	1577,3	181,6	1465	168,7
8	1890,7	217,6	1577,7	181,7
9	1214,5	140,0	898,3	103,7
10	915	105,6	724,2	83,7
11	1254,5	144,6	980,8	113,1
12	1488	171,4	1209,2	139,4
13	907,7	104,8	725,9	83,9
14	1486,8	171,3	1320,2	152,1
15	678,6	78,4	484,8	56,2
16	412,6	47,9	253,8	29,7
17	578,3	66,9	424,3	49,2
18	1086,6	125,3	919,6	106,1
19*	2159	190,7	1741,9	153,8
20*	933,3	107,7	603,4	69,8
21	997,4	115,1	831,9	96,0
22	1351,2	119,3	1158,1	102,2
23*	1612,1	142,3	1218,5	107,5
24	518,2	60,0	390,8	45,4
25	841,9	97,2	685,3	79,2
26	706,8	81,7	544,4	63,0
27	1442,9	127,4	1379,8	121,8
28	584,4	51,4	526,6	46,3
29	502,8	44,2	379,9	33,3
30	1634,8	144,3	1521,1	134,3

Nadaljevanje preglednice VI:

31	1182,6	104,3	882,1	77,8
32	659,7	58,1	503,6	44,31
33	1079,4	95,2	937,2	82,61

\*Pri bolniku številka 23 smo plazemski koncentraciji joheksola izračunali iz vzorcev odvzetih dve in tri ure po aplikaciji, pri bolnikih številka 19 in 20 pa iz vzorcev vzetih pri dveh in štirih urah po aplikaciji joheksola.

#### 4.2 Izračun očistka joheksola

Iz izračunanih plazemskih koncentracij joheksola smo na predpostavki enoprostornega modela za posameznega bolnika izračunali konstanto hitrosti eliminacije ( $k_{el}$ ) (enačba 25), volumen porazdelitve ( $V_D$ ) (enačba 26) ter očistek joheksola (enačba 3). Očistek joheksola smo popravili še z BM popravkom (enačba 4) ter rezultat popravili na povprečno telesno površino (enačba 8). Rezultati za bolnike iz prvega obiska so predstavljeni v preglednici VII, iz drugega obiska pa v preglednici VIII.

Preglednica VII: Izračunana konstanta hitrosti eliminacije ( $k_{el}$ ), volumen porazdelitve  $V_D$ , očistek joheksola, očistek joheksola z BM popravkom ter očistek joheksola s popravkom na povprečno telesno površino za bolnike iz prvega obiska

Številka bolnika	$k_{el}(h^{-1})$	$V_D$ (ml)	$Cl_{joheksol}$ (ml/min)	$Cl_{joheksolBM}$ (ml/min)	$Cl_{joheksolBM}$ (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )
1	0,256	16814	71,81	64,87	67,76
2	0,354	11647	68,80	62,40	82,79
3	0,260	19704	85,54	75,84	62,31
4	0,330	14407	79,15	70,79	61,90
5	0,217	11139	40,27	37,92	42,87
6	0,164	20183	55,15	50,94	50,91
7	0,181	18272	55,08	50,87	47,92
8	0,170	16801	47,50	44,31	37,21
9	0,205	12691	43,35	40,66	46,00
10	0,279	15318	71,23	64,39	51,58
11	0,187	11725	36,56	34,60	37,02
12	0,331	9953	54,94	50,75	53,46
13	0,132	20734	45,71	42,74	38,37
14	0,176	17351	50,79	47,18	46,35
15	0,304	16975	86,06	76,24	67,43
16	0,099	28439	47,04	43,91	34,46

Nadaljevanje preglednice VII:

17	0,189	15349	48,27	44,98	40,10
18	0,212	24990	88,27	77,97	70,29
19	0,156	24854	64,70	59,01	47,50
20	0,411	8827	60,45	55,45	56,87
21	0,253	15324	64,49	58,83	61,23
22	0,285	30026	142,83	116,66	97,95
23	0,412	14041	96,37	84,17	68,03
24	0,558	9135	85,03	75,44	62,68
25	0,223	12235	45,49	42,55	37,86
26	0,182	15404	46,85	43,74	41,87
27	0,214	8699	30,97	29,51	31,99
28	0,209	17098	59,62	54,74	57,10
29	0,178	19919	59,05	54,26	43,14
30	0,179	19691	58,81	54,06	46,26
31	0,179	23644	70,44	63,75	53,77
32*	/	/	37,13	37,13	43,34
33	0,302	17238	86,69	76,73	60,71
34	0,28	21758	101,55	88,05	89,78
35	0,323	15303	82,27	73,26	57,51
36	0,101	18926	31,79	30,26	23,69
37	0,197	58241	190,99	144,8	121,04
38	0,339	20528	115,94	98,50	93,69
39	0,137	14356	32,77	31,16	34,8
40	0,318	14777	78,35	70,15	61,33
41	0,115	21818	41,77	39,26	33,25
42	0,306	19750	100,56	87,32	78,39
43	0,305	7692	39,13	36,91	34,75
44	0,109	18438	33,38	31,72	28,27
<b>Povprečje</b>	0,240	17912	66,70	59,52	54,67
<b>SD</b>	±0,0952	±8111	±31,20	±23,81	±20,21

\*Bolniku številka 32 smo očistek joheksola izračunali po Jacobssonovi enačbi za eno točko (enačba 5).

Preglednica VIII: Izračunana konstanta hitrosti eliminacije ( $k_{el}$ ), volumen porazdelitve  $V_D$ , očistek joheksola, očistek joheksola z BM popravkom ter očistek joheksola s popravkom na povprečno telesno površino za bolnike iz drugega obiska

Številka bolnika	$k_{el}(h^{-1})$	$V_D(ml)$	$Cl_{joheksol}(ml/min)$	$Cl_{joheksolBM}(ml/min)$	$Cl_{joheksolBM}(ml/min/1,73m^2)$
1	0,294	9381	45,94	42,94	44,11
2	0,157	20514	53,84	49,81	41,65
3	0,518	4945	42,72	40,10	35,05

Nadaljevanje preglednice VIII:

4	0,149	12770	31,69	30,18	33,84
5	0,166	17325	47,81	44,58	46,08
6	0,207	14680	50,55	46,98	36,84
7	0,068	14072	15,94	15,49	17,46
8	0,201	7848	26,23	25,15	25,93
9	0,254	10577	44,73	41,88	43,02
10	0,241	14014	56,19	51,83	45,81
11	0,134	14073	31,36	29,87	21,78
12	0,210	8495	29,77	28,42	25,16
13	0,171	18119	51,63	47,91	36,92
14	0,173	10660	30,80	29,36	30,06
15	0,323	14772	79,50	71,07	67,38
16	0,309	25645	132,13	109,65	88,27
17	0,263	19539	85,65	75,92	59,56
18	0,142	16310	38,71	36,52	29,86
19	0,116	12822	24,84	23,86	25,13
20	0,173	19697	56,93	52,45	40,18
21	0,197	14479	47,53	44,34	34,93
22	0,136	17575	39,96	37,65	30,64
23	0,177	19101	56,41	52,02	61,89
24	0,266	20812	92,28	81,06	61,28
25	0,227	15345	58,14	53,48	51,16
26	0,207	19989	69,07	62,62	46,91
27	0,077	19514	24,99	24,00	17,66
28	0,084	46629	65,12	59,36	46,73
29	0,308	26629	136,71	112,68	101,47
30	0,096	15678	25,17	24,16	26,83
31	0,153	18979	48,54	45,22	35,96
32	0,259	24486	105,53	90,99	77,15
33	0,131	20836	45,43	42,50	39,27
<b>Povprečje</b>	0,200	17161	54,30	49,21	43,21
<b>SD</b>	±0,0896	±7300	±28,99	±23,54	±19,44

#### 4.3 Ocena GF na osnovi serumskih koncentracijah kreatinina

GF smo ocenili na osnovi serumskega kreatinina s petimi različnimi enačbami. Vse ocene smo izrazili v absolutnih vrednostih (ml/min) in relativnih vrednostih (ml/min/1,73m<sup>2</sup>). V preglednici IX so izračunane oGF z enačbami MDRD4 (enačba 17), MDRD6 (enačba 16) in C&G enačbo (enačba 10). V preglednici X pa so izračunane oGF po enačbah C&G-LBM (enačba 12) in CKD-EPI (enačbe 19-22).

Preglednica IX: Izračunane oGF na osnovi enačb MDRD4, MDRD6, in C&G v absolutnih in relativnih vrednostih

Številka bolnika	MDRD4 (ml/min)	MDRD4 (ml/min/1,73m2)	MDRD6 (ml/min)	MDRD6 (ml/min/173m2)	C&G (ml/min)	C&G (ml/min/1,73m2)
1	66,85	69,84	69,53	72,63	56,39	58,91
2	78,10	103,6	76,93	102,1	46,31	61,44
3	66,60	54,72	68,16	56,00	58,57	48,12
4	85,31	74,60	92,27	80,69	76,08	66,53
5	49,11	55,51	53,91	60,94	46,36	52,40
6	71,60	71,56	72,47	72,43	46,91	46,88
7	61,61	58,03	65,05	61,27	62,36	58,74
8	56,23	47,22	55,86	46,91	59,08	49,62
9	38,85	43,95	40,33	45,62	37,06	41,93
10	75,24	60,27	73,81	59,12	72,28	57,90
11	44,09	47,18	46,05	49,27	43,19	46,21
12	42,89	45,18	43,56	45,89	36,68	38,64
13	48,41	43,46	49,17	44,14	47,91	43,01
14	47,08	46,24	49,66	48,78	41,14	40,41
15	80,66	71,34	85,20	75,35	66,26	58,60
16	49,01	38,46	/	/	67,18	52,72
17	46,00	41,00	52,58	46,86	50,77	45,25
18	67,79	61,11	70,13	63,22	57,31	51,66
19	54,43	43,81	61,84	49,78	57,86	46,57
20	63,09	64,70	65,69	67,38	65,36	67,04
21	75,15	78,21	92,29	96,06	87,16	90,71
22	98,65	82,83	102,0	85,61	116,7	97,99
23	80,67	65,21	88,21	71,30	78,18	63,19
24	80,78	67,11	80,42	66,81	117,2	97,39
25	38,13	33,93	37,78	33,62	44,41	39,52
26	62,06	59,41	65,00	62,22	52,48	50,24
27	29,58	32,06	31,08	33,68	31,45	34,08
28	60,95	63,58	70,00	73,02	62,33	65,02
29	82,79	65,83	88,79	70,60	78,60	62,50
30	59,16	50,63	60,75	51,99	73,39	62,81
31	77,17	65,10	77,48	65,35	73,49	61,99
32	40,18	46,90	38,93	45,44	28,34	33,09
33	56,14	44,41	62,77	49,66	71,65	56,69
34	67,75	69,08	73,04	74,47	58,41	59,56

Nadaljevanje preglednice IX:

35	76,79	60,28	82,97	65,13	102,5	80,49
36	40,75	31,90	38,87	30,43	52,63	41,20
37	115,5	96,58	119,3	99,76	131,10	109,6
38	121,10	115,2	115,5	109,9	131,6	125,20
39	39,02	43,58	40,61	45,36	29,82	33,31
40	79,00	69,07	88,69	77,54	83,91	73,36
41	44,05	37,30	44,75	37,90	47,39	40,13
42	91,15	81,83	98,56	88,48	116,0	104,10
43	45,01	42,39	47,72	44,94	41,26	38,86
44	47,44	42,28	46,97	41,86	48,69	43,39
<b>Povprečje</b>	63,68	58,78	67,09	62,08	64,86	59,02
<b>SD</b>	±20,60	±18,69	±21,66	±19,37	±26,34	±21,51
<b>KV</b>	32,35	31,80	32,28	31,21	40,61	36,45

Preglednica X: Izračunane oGF z enačbami C&G-LBM in CKD-EPI v absolutnih in relativnih vrednostih

Številka bolnika	C&G-LBM (ml/min)	C&G-LBM (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	CKD-EPI (ml/min)	CKD-EPI (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )
1	48,33	50,49	67,70	70,73
2	48,79	64,74	63,60	84,39
3	51,86	42,61	47,75	39,23
4	60,62	53,01	62,62	54,76
5	38,56	43,59	50,89	57,52
6	56,68	56,65	51,09	51,06
7	38,54	36,31	61,57	58,00
8	43,31	36,37	41,07	34,49
9	30,43	34,43	39,48	44,67
10	51,88	41,56	54,20	43,41
11	31,10	33,27	44,40	47,50
12	28,66	30,19	41,61	43,83
13	43,98	39,48	35,80	32,14
14	43,60	42,84	34,64	34,02
15	60,04	53,11	58,57	51,80
16	34,40	27,00	49,49	38,84
17	44,30	39,49	34,84	31,05
18	51,94	46,83	49,07	44,24

Nadaljevanje preglednice X:

19	44,85	36,10	39,78	32,02
20	43,91	45,04	65,58	67,26
21	67,15	69,89	84,48	87,93
22	83,54	70,14	78,90	66,25
23	75,23	60,81	61,30	49,55
24	58,61	48,70	88,08	73,17
25	22,66	20,17	36,82	32,76
26	48,80	46,71	45,25	43,32
27	24,42	26,47	29,86	32,36
28	46,79	48,81	46,79	48,81
29	53,03	42,16	59,37	47,20
30	41,53	35,54	60,78	52,02
31	55,69	46,98	56,52	47,68
32	33,30	38,87	39,22	45,78
33	53,35	42,21	43,44	34,37
34	53,01	54,05	50,60	51,60
35	67,12	52,69	60,88	47,79
36	31,95	25,02	29,69	23,25
37	82,40	68,88	101,0	84,41
38	88,92	84,58	97,86	93,09
39	28,30	31,61	37,62	42,01
40	72,38	63,29	61,78	54,02
41	26,87	22,75	42,15	35,70
42	69,60	62,48	100,3	90,07
43	36,91	34,76	32,44	30,55
44	33,87	30,18	34,03	30,33
<b>Povprečje</b>	48,89	45,02	53,93	50,11
<b>SD</b>	±16,42	±14,27	±18,68	±17,74
<b>KV</b>	33,59	31,69	34,64	35,40

#### 4.4 Statistično vrednotenje rezultatov

- a) Korelacija med očitki joheksola in ocenami ledvične funkcije z enačbami MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI pri bolnikih s SP na 1. obisku

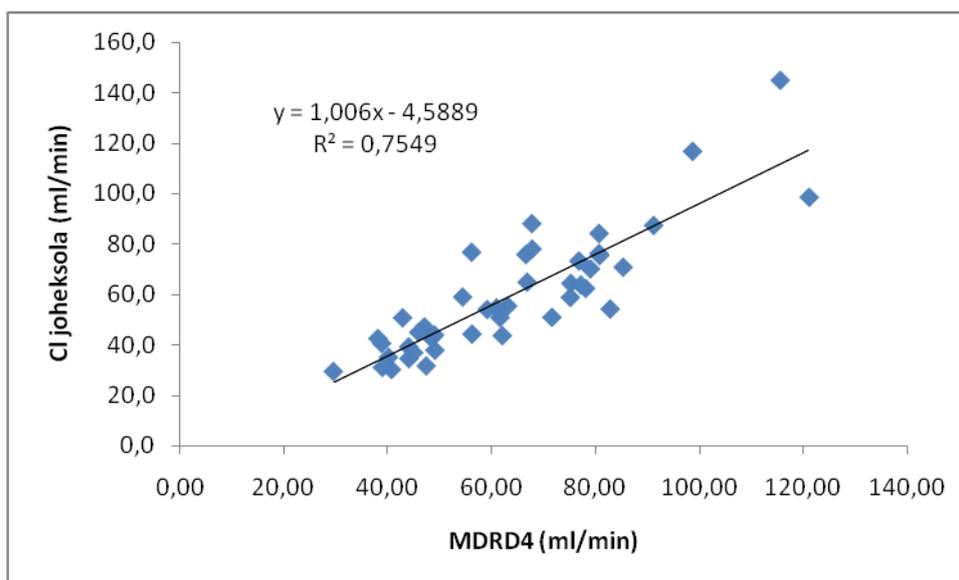
V absolutnih vrednostih (ml/min) smo ugotavljali korelacijo očistka joheksola in oGF na podlagi posameznih enačb. Določili smo determinacijski koeficient ( $r^2$ ), Pearsonov korelacijski koeficient ( $r$ ) in p-vrednost, ki nam pove če gre za statistično značilno razliko ali neznačilno razliko. Rezultati so zbrani v preglednici XI.

Preglednica XI: Vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $r$ ), determinacijskega koeficienta ( $r^2$ ) in  $p$ -vrednosti ( $p$ ) ( $\alpha = 0,01$ , dvostranski test)

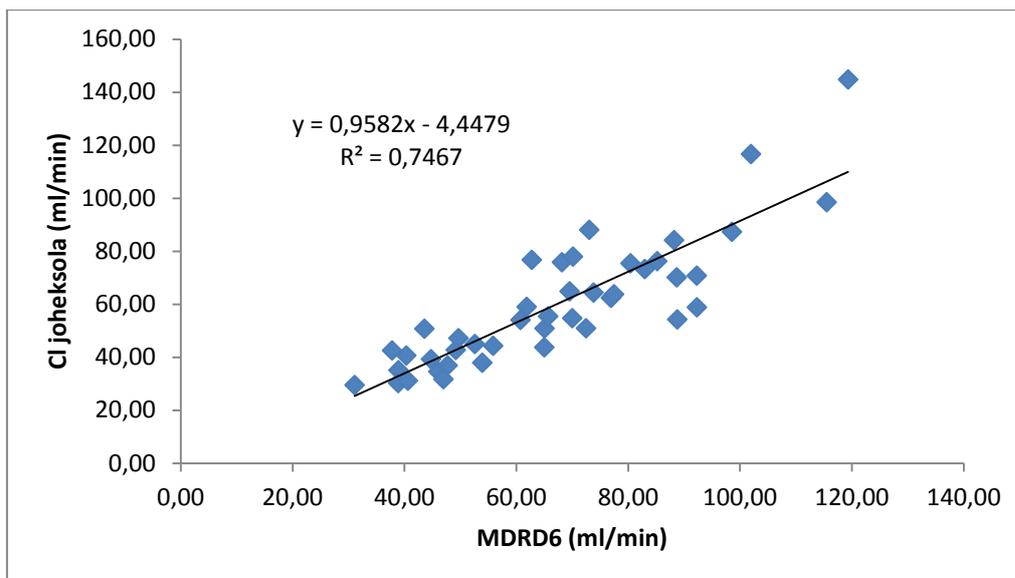
	$r$	$r^2$	$p$	SZ/SN
<b>Cljoheksol - MDRD4 (ml/min)</b>	0,869	0,755	<0,001	SZ
<b>Cljoheksol - MDRD6 (ml/min)</b>	0,864	0,747	<0,001	SZ
<b>Cljoheksol - C&amp;G (ml/min)</b>	0,816	0,666	<0,001	SZ
<b>Cljoheksol - C&amp;G LBM(ml/min)</b>	0,86	0,74	<0,001	SZ
<b>Cljoheksol - CKD-EPI (ml/min)</b>	0,77	0,593	<0,001	SZ

*Cljoheksol...očistek joheksola; MDRD4...oGF z MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami; MDRD6...oGF z MDRD enačbo s šestimi spremenljivkami; C&G...oGF z Cockroft-Gaultovo enačbo; C&G-LBM...oGF z Cockroft-Gaultovo enačbo z vpeljavo puste telesne mase; CKD-EPI...oGF s CKD-EPI enačbo; SZ...statistično značilna razlika; SN...ni statistično značilne razlike.*

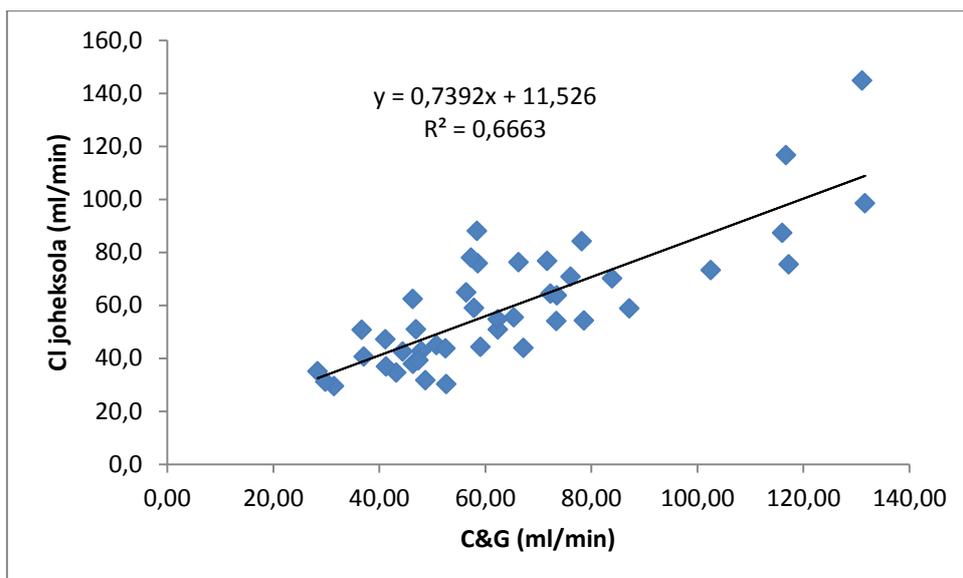
Korelacijo med očistkom joheksola in oGF z enačbami smo podali tudi grafično (slike 4 – 8) z razsevnim grafikonom, ki ponazarja linearno povezavo med očistki joheksola in ocenami ledvične funkcije v absolutnih vrednostih (ml/min).



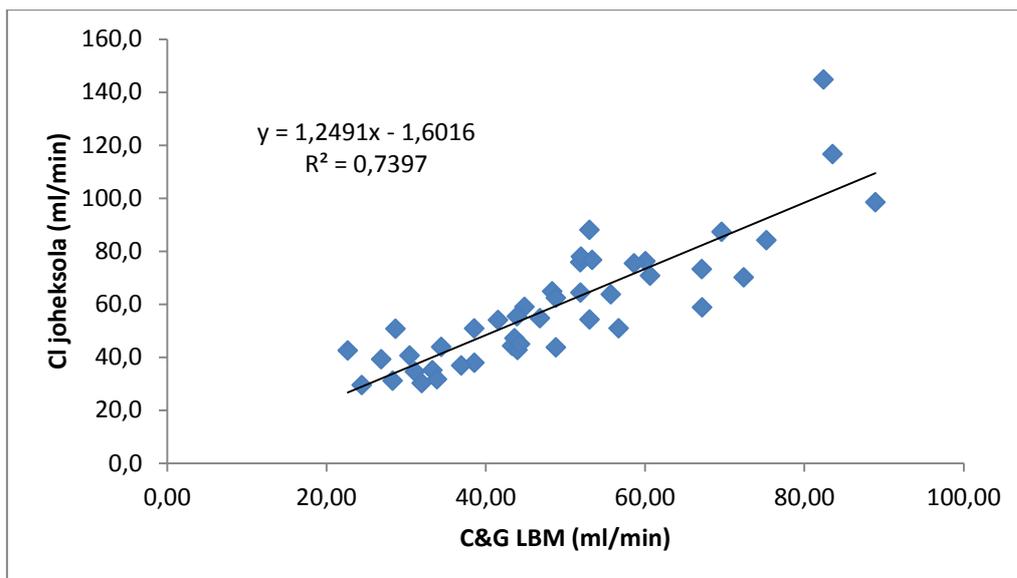
Slika 4: Korelacija med očistki joheksola in oGF na osnovi MDRD4 enačbe.



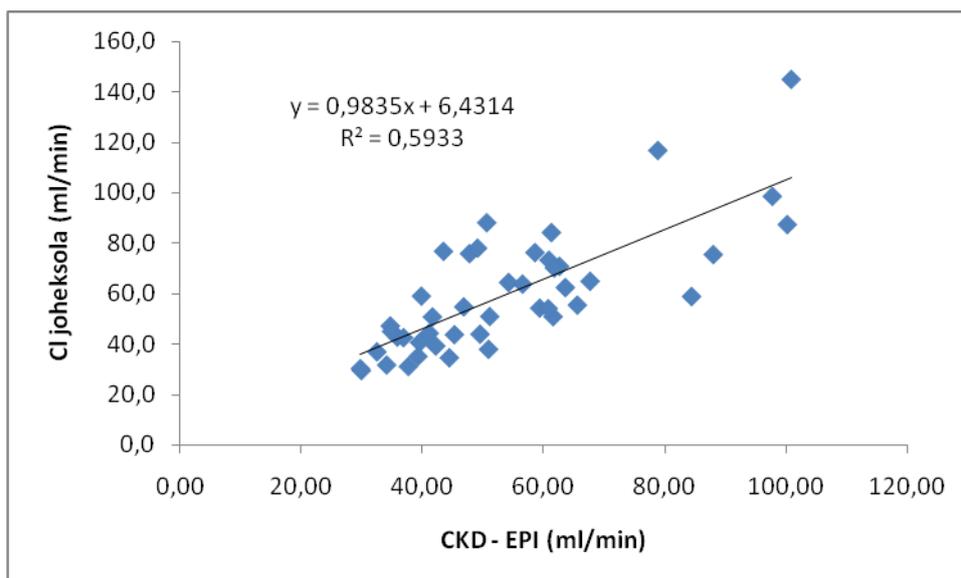
Slika 5: Korelacija med oĉistki joheksola in oGF na osnovi MDRD6 enaĉbe.



Slika 6: Korelacija med oĉistki joheksola in oGF na osnovi C&amp;G enaĉbe.



Slika 7: Korelacija med očistki joheksola in oGF na osnovi C&G-LBM enačbe.



Slika 8: Korelacija med očistki joheksola in oGF na osnovi CKD-EPI enačbe.

V preglednici XII so izračunane napake povprečne SE (enačba 27), MPE (enačba 29) in MAPE (enačba 30) med očistki joheksola in oGF z enačbami MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI.

Preglednica XII: Izračunana povprečna napaka meritve (SE), povprečna relativna napaka (MPE) in povprečna absolutna napaka (MAPE) med očistki joheksola in oGF z enačbami

	<b>Povprečje</b>	<b>SD</b>
<b>MDRD4</b>		
SE (ml/min)	4,21	±11,81
MPE (%)	10,88	±19,07
MAPE (%)	17,84	±12,61
<b>MDRD6</b>		
SE (ml/min)	-7,25	±12,12
MPE (%)	15,95	±20,27
MAPE (%)	21,15	±14,61
<b>C&amp;G</b>		
SE (ml/min)	5,39	±15,40
MPE (%)	11,54	±25,60
MAPE (%)	22,49	±16,55
<b>C&amp;G-LBM</b>		
SE (ml/min)	-10,58	±12,84
MPE (%)	-15,15	±15,52
MAPE (%)	17,75	±12,39
<b>CKD-EPI</b>		
SE (ml/min)	-5,54	±15,22
MPE (%)	-5,44	±21,05
MAPE (%)	17,71	±12,34

*MDRD4...oGF z MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami; MDRD6...oGF z MDRD enačbo s šestimi spremenljivkami; C&G...oGF z Cockroft-Gaultovo enačbo; C&G-LBM...oGF z Cockroft-Gaultovo enačbo z vpeljavo puste telesne mase; CKD-EPI...oGF s CKD-EPI enačbo*

b) Primerjava dveh skupin bolnikov iz prvega obiska – nad in pod 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>

Bolnike s prvega obiska smo razdelili glede na očistek joheksola nad in pod 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. V preglednici XIII so izračunane napake povprečne SE (enačba 27), MPE (enačba 29) in MAPE (enačba 30) med očistki joheksola in oGF z enačbami MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI.

Preglednica XIII: Izračunana povprečna napaka meritve (SE), povprečna relativna napaka (MPE) in povprečna absolutna napaka (MAPE) med očistki joheksola in oGF z enačbami nad in pod 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

	CI joheksolBM <60ml/min/1,73m <sup>2</sup>		CI joheksolBM >60ml/min/1,73m <sup>2</sup>	
	POVPREČJE	SD	POVPREČJE	SD
število bolnikov	28 (63,64%)		16 (36,36%)	
<b>MDRD4</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	49,35	±11,14	75,29	±17,93
SE (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	6,55	±7,25	-0,16	±14,44
MPE (%)	16,36	±17,59	0,89	±17,97
MAPE (%)	19,1	±14,45	15,26	±8,67
<b>MDRD6</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	51,85	±12,25	79,35	±16,86
SE (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	8,75	±7,84	3,89	±15,25
MPE (%)	21,03	±18,34	6,99	±21,02
MAPE (%)	22,97	±15,73	17,69	±12,66
<b>C&amp;G</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	49,07	±11,71	76,44	±23,91
SE (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	6,27	±9,12	0,98	±20,21
MPE (%)	16,59	±23,53	2,44	±27,67
MAPE (%)	22,81	±17,29	22,2	±15,69
<b>C&amp;G-LBM</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	37,32	±8,94	58,49	±11,63
SE (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	-5,47	±6,74	-16,97	±14,18
MPE (%)	-12,02	±15,02	-20,95	±15
MAPE (%)	14,86	±12,1	23,12	±11,09
<b>CKD-EPI</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	41,98	±10,18	64,35	±19,39
SE (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	-0,82	±7,65	-11,11	±18,97
MPE (%)	-1,07	±17,04	-13,47	±25,13
MAPE (%)	14,09	±9,25	23,67	±15,09

*MDRD4...oGF z MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami; MDRD6...oGF z MDRD enačbo s šestimi spremenljivkami; C&G...oGF z Cockroft-Gaultovo enačbo; C&G-LBM...oGF z Cockroft-Gaultovo enačbo z vpeljavo puste telesne mase; CKD-EPI...oGF s CKD-EPI enačbo*

c) Primerjava očistka joheksola na prvem in drugem obisku

33-im bolnikom smo izmerili očistek joheksola na drugem obisku po približno šestih mesecih in ga primerjali z očistki joheksola iz prvega obiska. V preglednici XIV so zbrani izračunani očistki joheksola na obeh obiskih.

Preglednica XIV: Primerjava očistkov joheksola s prvega in drugega obiska

	1. obisk	2. obisk
Številka bolnika	CI <sub>joheksolBM</sub> (ml/min)	CI <sub>joheksolBM</sub> (ml/min)
1	64,87	42,94
2	75,84	49,81
3	70,79	40,10
4	37,92	30,18
5	50,94	44,58
6	44,31	46,98
7	40,66	15,49
8	34,60	25,15
9	50,75	41,88
10	76,24	51,83
11	43,91	29,87
12	44,98	28,42
13	59,01	47,91
14	55,45	29,36
15	58,83	71,07
16	116,66	109,65
17	84,17	75,92
18	42,55	36,52
19	29,51	23,86
20	54,26	52,45
21	54,06	44,34
22	63,75	37,65
23	37,13	52,02
24	76,73	81,06
25	88,05	53,48
26	73,26	62,62
27	30,26	24,00
28	144,8	59,36
29	98,50	112,68
30	31,16	24,16
31	39,26	45,22
32	87,32	90,99
33	36,91	42,50
<b>Povprečje</b>	<b>60,53</b>	<b>49,21</b>
<b>SD</b>	<b>±26,25</b>	<b>±23,54</b>

S parnim Studentovim t-testom (dvostranski test, stopnja tveganja je 0,05) smo ugotovili, da je p-vrednost manjša od 0,001. Torej gre za statistično značilno razliko med vrednostmi očistka joheksola s prvega in drugega obiska.

d) Vpliv telesne sestave na ledvično funkcijo

Pri bolnikih s prvega obiska smo ugotavljali korelacijo med parametri telesne sestave in napako PE, ki smo jo računali po enačbi 28, in sicer med očistki joheksola in oGF z enačbami (MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI). Za enačbe MDRD4, MDRD6 in C&G so rezultati prikazani v preglednici XV, za enačbi C&G-LBM in CKD-EPI pa v preglednici XVI. Parametri telesne sestave so bili predhodno določeni z metodama BIA in DEXA. Uporabili smo absolutne vrednosti (ml/min) očistka joheksola in ocen ledvične funkcije z enačbami.

Preglednica XV: Korelacija med parametri telesne sestave in napako PE (med očistki joheksola in oGF z enačbami MDRD4, MDRD6 in C&G)

	Parametri telesne sestave	MDRD4		MDRD6		C&G		
		PE	SZ/SN	PE	SZ/SN	PE	SZ/SN	
<b>BIA</b>	Odstotek telesnega maščevja (%)	r	0,088		0,018		0,328	
		p	0,587	SN	0,912	SN	0,039	<b>SZ</b>
	Masa maščevja (kg)	r	0,010		-0,065		0,576	
		p	0,951	SN	0,689	SN	<0,001	<b>SZ</b>
	Pusta telesna masa (kg)	r	-0,130		-0,119		0,281	
		p	0,423	SN	0,465	SN	0,079	SN
	Odstotek puste telesne mase (%)	r	-0,082		-0,015		-0,315	
		p	0,613	SN	0,926	SN	0,048	<b>SZ</b>
	Pusta telesna masa brez vode (kg)	r	0,032		0,064		0,142	
		p	0,847	SN	0,695	SN	0,381	SN
	Odstotek puste telesne mase brez vode (%)	r	0,049		0,092		0,055	
		p	0,762	SN	0,572	SN	0,738	SN
	Odstotek vode v telesu (%)	r	-0,073		-0,078		-0,440	
		p	0,656	SN	0,631	SN	0,005	<b>SZ</b>
	Voda v telesu (L)	r	-0,085		-0,094		0,206	
		p	0,603	SN	0,566	SN	0,202	SN

Nadaljevanje preglednice XV:

<b>DEXA</b>	Masa maščevja (kg)	r	0,118		0,018		0,470	
		p	0,451	SN	0,908	SN	0,001	<b>SZ</b>
	Odstotek telesnega maščevja (%)	r	0,205		0,192		0,704	
		p	0,187	SN	0,224	SN	<0,001	<b>SZ</b>
	Pusta telesna masa (kg)	r	-0,243		-0,245		0,151	
		p	0,117	SN	0,118	SN	0,335	SN
	Odstotek puste telesne mase (%)	r	-0,283		-0,262		-0,325	
		p	0,066	SN	0,094	SN	0,034	<b>SZ</b>
	Telesna masa (kg)	r	0,052		0,013		0,580	
		p	0,739	SN	0,932	SN	<0,001	<b>SZ</b>
	Indeks brezmaščobne mase (kg/m <sup>2</sup> )	r	-0,242		-0,264		0,315	
		p	0,118	SN	0,091	SN	0,039	<b>SZ</b>
Brezmaščobna masa (kg)	r	0,234		0,193		0,674		
	p	0,131	SN	0,222	SN	<0,001	<b>SZ</b>	

r...Pearsonov korelacijski koeficient, p...p-vrednost ( $\alpha=0,05$ , dvostranski test); MDRD4...oGF z MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami; MDRD6...oGF z MDRD enačbo s šestimi spremenljivkami C&G...oGF s Cockroft-Gaultovo enačbo; SZ...statistično značilna razlika; SN...ni statistično značilne razlike; BIA...bioimpedanca; DEXA...dvoenergijska absorpciometrija z rentgenskimi žarki; PE...relativna napaka

Preglednica XVI: Korelacija med parametri telesne sestave in napako PE (med očitki joheksola in oGF z enačbami C&G-LBM in CKD-EPI)

	Parametri telesne sestave		C&G-LBM		CKD-EPI	
			PE	SZ/SN	PE	SZ/SN
<b>BIA</b>	Odstotek telesnega maščevja (%)	r	-0,332		0,566	
		p	0,037	<b>SZ</b>	<0,001	<b>SZ</b>
	Masa maščevja (kg)	r	-0,302		0,263	
		p	0,058	SN	0,101	SN
	Pusta telesna masa (kg)	r	0,073		-0,538	
		p	0,655	SN	<0,001	<b>SZ</b>
	Odstotek puste telesne mase (%)	r	0,341		-0,568	
		p	0,031	<b>SZ</b>	<0,001	<b>SZ</b>
	Pusta telesna masa brez vode (kg)	r	0,200		-0,254	
		p	0,215	SN	0,114	SN
	Odstotek puste telesne mase brez vode (%)	r	0,218		-0,208	

Nadaljevanje preglednice XVI:

<b>BIA</b>		p	0,177	SN	0,197	SN
	Odstotek vode v telesu (%)	r	0,050		-0,220	
		p	0,762	SN	0,172	SN
	Voda v telesu (L)	r	0,065		-0,528	
		p	0,691	SN	<0,001	<b>SZ</b>
<b>DEXA</b>	Masa maščevja (kg)	r	-0,051		0,321	
		p	0,745	SN	0,036	<b>SZ</b>
	Odstotek telesnega maščevja (%)	r	-0,097		0,519	
		p	0,536	SN	<0,001	<b>SZ</b>
	Pusta telesna masa (kg)	r	-0,104		-0,589	
		p	0,506	SN	<0,001	<b>SZ</b>
	Odstotek puste telesne mase (%)	r	-0,231		-0,306	
		p	0,136	SN	0,046	<b>SZ</b>
	Telesna masa (kg)	r	-0,034		-0,038	
		p	0,828	SN	0,81	SN
	Indeks brezmaščobne mase (kg/m <sup>2</sup> )	r	-0,281		-0,371	
		p	0,068	SN	0,014	<b>SZ</b>
	Brezmaščobna masa (kg)	r	-0,009		0,429	
		p	0,952	SN	0,004	<b>SZ</b>

*C&G-LBM...oGF s Cockroft-Gaultovo enačbo z vpeljavo puste telesne mase; CKD-EPI...oGF s CKD-EPI enačbo.*

## 5. RAZPRAVA

Ledvično popuščanje, ki se kaže pri GF pod  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , je relativno pogosto pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem (9). GF se smatra kot najboljši skupni indeks za določevanje ledvične funkcije. Najbolj točne in natančne metode za določevanje GF vključujejo eksogene substance (2, 28). V diplomski nalogi smo določali očistke eksogenega označevalca – joheksola. Določanje GF z joheksolom je natančno in točno, priprava plazemskih vzorcev je enostavna in hitra in tudi analiza s HPLC metodo je razmeroma enostavna in hitra (10). Pogosteje kot joheksol se za ocenitev GF izvaja merjenje endogenih serumskih substanc, najpogosteje se kot označevalec ledvične funkcije uporablja serumski kreatinin (2, 28).

Plazemske vzorce smo pridobili od bolnikov s SP v okviru 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 na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Večina bolnikov je v raziskavi sodelovalo dvakrat s približno šest mesečnem zamikom. Na prvem obisku je bilo 44 bolnikov s SP (srednja starost 74 let, 59,1% moških; Preglednica III). Večji del bolnikov ima prekomerno telesno težo (BMI > 30 ima 45,5% bolnikov; Preglednica III). Prav tako je srednja telesna površina višja od standardizirane, ki je  $1,73 \text{ m}^2$  ( $1,93 \text{ m}^2$ , v območju od 1,30 do  $2,21 \text{ m}^2$ ; Preglednica III).

- Plazemskim vzorcem iz obeh obiskov smo določili koncentracije joheksola in izračunali očistke joheksola. Primerjali smo spremembo očistkov joheksola iz prvega in drugega obiska.
- Bolnikom s prvega obiska smo ugotavljali korelacijo med očistki joheksola in ocenami ledvične funkcije po enačbah MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI. Prav tako smo ugotavljali kateri parametri telesne sestave vplivajo na točnost ocene ledvične funkcije z navedenimi enačbami.
- Na prvem obisku smo tudi ločeno analizirali bolnike z očistkom joheksola nad oz. pod  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ .

### 5.1 Določanje plazemske koncentracije joheksola

Plazemske vzorce smo analizirali z metodo HPLC-UV, ki so jo predhodno razvili in validirali (43). Iz površin pod krivuljo drugega kromatografskega vrha smo določili umeritvene premice standardnih plazemskih vzorcev (kot je na sliki 3). Korelacija med koncentracijo analita v vzorcu in odzivom je skoraj popolna, saj je determinacijski koeficient 0,9999. Točnost standardnih plazemskih vzorcev sme odstopati za največ 15% od prave koncentracije. Iz preglednice IV vidimo, da v našem primeru točnost ustreza predpisom. Tudi ostale umeritvene krivulje standardnih plazemskih vzorcev so bile ustrezne, saj je znašal najnižji determinacijski koeficient 0,9989.

Iz umeritvene krivulje smo izračunali plazemske koncentracije joheksola pri dveh časovnih točkah. Plazemska vzorca bi morala biti vzeta približno 3 in 4 ure po injiciranju odmerka joheksola (20). Dejanski odvzemi plazemskih vzorcev naših bolnikov so bili 2 do 5,5 ure po aplikaciji joheksola. Spremenjeni časi odvzemov niso problematični in ne vplivajo na točnost izračuna očistka joheksola, ker je pomembno le, da vzorce vzamemo vsaj 2 uri po injiciranju joheksola, ko smo že v fazi izločanja spojine (10).

### 5.2 Izračun očistka joheksola

Očistke joheksola smo izračunali iz plazemskih koncentracij dveh vzorcev. Izjema je bil en bolnik, ki so mu po aplikaciji joheksola odvzeli le en plazemski vzorec. Temu smo določili očistek joheksola po Jacobssonovi enačbi – enačba 5. Glede na literaturo so očistki joheksola, izračunani s to enačbo, v dobri korelaciji z očistki joheksola, ki jih izračunamo iz več časovnih točk (24), vendar časi odvzema našega vzorca niso bili idealni, a smo imeli samo ta vzorec.

Potrebovali smo torej majhno število plazemskih vzorcev (večinoma dva), kar je prednost za bolnika in tudi za zdravstveno osebje. Prednost je tudi, da je bilo potrebno intravensko aplicirati enkratni in nizek odmerka joheksola. Za vsakega od 44 bolnikov iz prvega obiska smo po poenostavljenem enoprostornem modelu izračunali očistek joheksola v absolutnih vrednostih (ml/min) (enačba 3). Ker očistek joheksola izračunan po enoprostornem modelu ne upošteva zgodnje porazdelitvene faze, smo ga popravili z BM popravkom (enačba 4).

Plazemski očistki joheksola z BM popravkom se pri naših bolnikih gibajo od 29,51 do 144,80 ml/min, kar ustreza vrednostim v literaturi – 24 do 207 ml/min (20). Povprečna

vrednost in SD pa je bila  $59,52 \pm 23,81$  ml/min. Plazemski očistek joheksola z BM popravkom smo pretvorili iz absolutnih tudi v relativne vrednosti (enačba 8) in dobili vrednosti od 23,69 do 121,04 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Dobili smo ustrezne vrednosti, saj so v literaturi navedeni očistki joheksola od 12 do 150 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (47) oz. pri bolnikih s KLB od 18 do 205 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (15). Literatura navaja, da je pri bolnikih s KLB povprečni očistek joheksola z BM popravkom v relativnih vrednostih 50,4 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (47). Naš rezultat je bil blizu, in sicer  $54,67 \pm 20,21$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>. To pomeni, da ima večina bolnikov blago obliko ledvičnega popuščanja, ki se kaže pri GF manjši od 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Izračunani plazemski očistki joheksola naših bolnikov se torej dobro ujemajo z navedenimi rezultati iz različnih literaturnih virov (15, 20, 47).

### 5.3 Ocena GF na osnovi serumskih koncentracijah kreatinina

GF smo ocenili na osnovi serumskega kreatinina z enačbami MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI. Preglednica XVII prikazuje povprečne vrednosti ocen ledvične funkcije z omenjenimi enačbami v absolutnih in relativnih vrednostih. Najvišjo povprečno oGF daje MDRD6, najnižjo oceno pa C&G-LBM enačba. Ocene s C&G enačbo so pričakovano višje v primerjavi s C&G-LBM, saj le-ta namesto telesne mase vključuje pusto telesno maso in zato zniža oGF predvsem pri stanjih, ko je nastanek kreatinina manjši (34).

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti ocen ledvične funkcije v absolutnih in relativnih vrednostih.

	Povprečje $\pm$ SD v absolutnih vrednostih (ml/min)	Povprečje $\pm$ SD v relativnih vrednostih (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )
<b>MDRD4</b>	63,68 $\pm$ 20,60	58,78 $\pm$ 18,69
<b>MDRD6</b>	67,09 $\pm$ 21,66	62,08 $\pm$ 19,37
<b>C&amp;G</b>	64,86 $\pm$ 26,34	59,02 $\pm$ 21,51
<b>C&amp;G-LBM</b>	48,89 $\pm$ 16,42	45,02 $\pm$ 14,27
<b>CKD-EPI</b>	53,93 $\pm$ 18,68	50,11 $\pm$ 17,74

Pri naših bolnikih (starostniki z debelostjo in previsoko telesno površino) bi lahko bila ocena ledvične funkcije z določenimi enačbami manj zanesljiva. Vemo namreč, da je C&G enačba manj točna pri starejših in debelih. MDRD enačba ni bila testirana na starejših od 75 let, na osebkih z ekstremno velikostjo telesa ali ekstremno mišično maso, zato je v teh

primerih manj točna (2). Tudi CKD-EPI enačba je manj točna pri posameznikih starejših od 70 let, saj je le-teh malo sodelovalo v začetni študiji razvoja enačbe (5).

#### 5.4 Statistično vrednotenje rezultatov

##### a) Korelacija med očistki joheksola in ocenami ledvične funkcije z enačbami

##### MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI pri bolnikih s SP na 1. obisku

V klinični praksi se za oceno ledvične funkcije še vedno največ uporabljajo enačbe, ki temeljijo na serumskem kreatininu. Zato so nas zanimale korelacije med referenčno metodo – očistkom joheksola in med oGF na podlagi enačb (MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI). Naš namen je bil ugotoviti, katera enačba je optimalna za določanje ledvične funkcije pri bolnikih s SP.

V preglednici XI so zbrane vrednosti determinacijskih koeficientov ( $r^2$ ), ki meri moč povezave in Pearsonov korelacijskih koeficientov ( $r$ ), ki nam pove velikost linearne povezanosti. Determinacijski koeficienti med očistki joheksola in oGF s posameznimi enačbami se gibajo od 0,593 do 0,755. Najnižja moč povezave je med očistkom joheksola in med oceno z enačbo CKD-EPI ( $r^2$  je 0,593). Determinacijski koeficienti med ostalimi enačbami in med očistki joheksola so podobni. Največja moč povezave je med očistkom joheksola in med oGF s MDRD4, kjer je determinacijski koeficient 0,755. Pearsonov korelacijski koeficienti se gibajo od 0,770 do 0,869 (preglednica XI), torej gre pri vseh enačbah za oceno ledvične funkcije in očistkih joheksola za pozitivno linearno povezanost spremenljivk, kar je razvidno tudi iz raztresenih grafikonov (slike 4-8). Najvišji Pearsonov korelacijski koeficient je med očistkom joheksola in MDRD4, kjer je Pearsonov korelacijski koeficient 0,869 in gre za močno linearno povezavo, najnižji pa zopet pri CKD-EPI, ko je 0,770 in gre za srednje močno linearno povezavo. V tej fazi bi torej sklepali, da je za oceno ledvične funkcije pri bolnikih s SP optimalna MDRD4 enačba.

Določali smo tudi ali so korelacije med očistki joheksola in ocenami ledvične funkcije z enačbami statistično značilne. Pri dvostranskem testu in stopnji tveganja  $\alpha=0,01$  so bile vse korelacije statistično značilne, saj so bile p-vrednosti pri vseh enačbah manjše od 0,001 (preglednica XI).

Zanimalo nas je tudi, pri uporabi katere enačbe je oGF najbližje izračunanemu očistku joheksola. S tem namenom smo izračunali napake MPE in MAPE med očistkom joheksola in ocenami ledvične funkcije na podlagi enačb. MPE in MAPE sta merilo točnosti enačbe – nižja kot sta, bolj točna je enačba za oceno ledvične funkcije glede na očistek joheksola

(23, 32). V preglednici XVIII so zbrani podatki napak MAPE in MPE posameznih enačb. Glede na to ali je MPE pozitiven oz. negativen je v preglednici tudi podatek ali enačba podcenjuje oz. precenjuje GF glede na očistek joheksola.

Preglednica XVIII: Rezultati napak MAPE in MPE med očitki joheksola in oGF z enačbami ter podatki ali enačbe precenjujejo oz. podcenjujejo GF glede na očistek joheksola.

	MAPE	MPE	Enačba podcenjuje/precenjuje GF
<b>MDRD4</b>	17,84	10,88	Precenjuje
<b>MDRD6</b>	21,15	15,95	Precenjuje
<b>C&amp;G</b>	22,49	11,54	Precenjuje
<b>C&amp;G-LBM</b>	17,75	-15,15	Podcenjuje
<b>CKD-EPI</b>	17,71	-5,44	Podcenjuje

Najboljša in najbolj točna ocena ledvične funkcije glede na očistek joheksola je s CKD-EPI enačbo, ki ima najnižji MPE in MAPE.

Najboljšo oceno ledvične funkcije pri bolnikih s SP torej dajeta enačbi CKD-EPI, z najnižjima napakama MPE in MAPE in MDRD4, ki ima najvišje vrednosti determinacijskega koeficienta in Pearsonov korelacijskega koeficienta glede na očistek joheksola. Enačbi sicer različno odstopata od očitkov joheksola, saj CKD-EPI podcenjuje, MDRD4 enačba pa precenjuje GF glede na očistke joheksola. Pričakovali smo, da bosta ti dve enačbi najbolj ocenili ledvično funkcijo pri bolnikih s SP, saj ima 64% naših bolnikov GF pod  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , kar pomeni da imajo ti bolniki ledvično popuščanje – obe enačbi sta bili namreč pretežno razviti na bolnikih z ledvično boleznijo (32). Po smernicah SZKK (48) se MDRD4 enačba v klinični praksi ne bi smela uporabiti pri starejših od 75 let, saj na njih enačba do sedaj ni bila preizkušena. Čeprav so bili določeni naši bolniki s SP starejši od 75 let, se je glede na očistek joheksola MDRD4 enačba izkazala primerljiva z ostalimi enačbami oz. je celo v največji korelaciji z očitkom joheksola glede na ostale enačbe. Pri preučevani populaciji bolnikov se torej MDRD4 enačba dobro izkazuje.

Odločitev glede optimalne enačbe za oGF na osnovi serumskega kreatinina pri bolnikih s SP je omejena z analizo majhnega števila bolnikov. Ugotovitve diplomske naloge zato ni mogoče splošiti na vse bolnike s SP.

b) Primerjava dveh skupin bolnikov iz prvega obiska – nad in pod 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>

Ledvično popuščanje se kaže pri GF manjši od 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, ko se izgubi najmanj polovica normalne ledvične funkcije odrasle osebe. Prav tako se pri GF manjši od 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> poveča tveganje za srčno-žilno smrt ali hospitalizacijo zaradi slabšanja kroničnega srčnega popuščanja, poveča se tudi tveganje za umrljivost (4, 6, 9). Naše bolnike smo na prvem obisku razdelili glede na očistek joheksola nad in pod 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> in poskušali ugotoviti katera enačba najboljše ocenjuje GF v posamezni skupini bolnikov. Obema skupinama bolnikov smo določili MPE in MAPE med očistki joheksola in ocenami ledvične funkcije z enačbami (preglednica XIII). 28 bolnikov (63,64%) je imelo očistek joheksola pod 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> in v tej skupini je bil povprečni očistek joheksola 42,79 ± 8,98 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. 16 (36,36%) bolnikov pa je imelo očistek joheksola nad 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> in njihov povprečni očistek joheksola je bil 74,92 ± 18,22 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

V preglednici XIX so podane vrednosti MPE oGF s posameznimi enačbami glede na očistek joheksola pri bolnikih z očistkom joheksola pod oz. nad 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

Preglednica XIX: Rezultati MPE med očistki joheksola in oGF z enačbami pri bolnikih z očistkom joheksola pod oz. nad 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> ter podatki ali enačbe precenjujejo ali podcenjujejo GF glede na očistek joheksola.

MPE (%)	CI <sub>joheksolBM</sub> <60ml/min/1,73m <sup>2</sup>		CI <sub>joheksolBM</sub> >60ml/min/1,73m <sup>2</sup>	
MDRD4	16,36	precenjuje	0,89	precenjuje
MDRD6	21,03	precenjuje	6,99	precenjuje
C&G	16,59	precenjuje	2,44	precenjuje
C&G-LBM	-12,02	podcenjuje	-20,95	podcenjuje
CKD-EPI	-1,07	podcenjuje	-13,47	podcenjuje

Iz preglednice XIX vidimo, da enačbe MDRD4, MDRD6 in C&G precenjujejo GF nad in pod 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Enačbe C&G-LBM in CKD-EPI pa v obeh skupinah bolnikov podcenjujejo GF. Glede tega smo dobili enake rezultate, kot če smo imeli vse bolnike v eni skupini. Pri GF nad 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> daje najboljšo oGF enačba MDRD4, ki ima MPE in MAPE najnižji (Preglednica XIII). Zelo blizu ji je enačba C&G. Pod 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> pa očistek joheksola najboljše predstavlja CKD-EPI enačba.

Torej, če imamo bolnike s SP, ki imajo GF pod  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  je za oceno ledvične funkcije najbolje uporabiti enačbo CKD-EPI. Pri bolnikih s SP, ki imajo normalno oz. blago zmanjšano GF (GF nad  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), pa sta za oceno ledvične funkcije najbolj primerni enačbi MDRD4 in C&G. V literaturi (33) je navedeno, da je pri GF nad  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  enačba CKD-EPI bolj učinkovita in točna kot MDRD enačba. Vendar v našem primeru to ne drži. Res pa je, da smo imeli v skupini bolnikov z GF nad  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  samo 16 bolnikov, pri katerih so bile vrednosti GF zelo različne.

c) Primerjava očistka joheksola na prvem in drugem obisku

S parnim Studentovim t-testom smo primerjali očistek joheksola v absolutnih vrednostih (ml/min) pri bolnikih na prvem in drugem obisku – po približno šestih mesecih. Na drugem obisku smo imeli 11 bolnikov manj, ker so nekateri bolniki ali zavrnili sodelovanje v drugem delu raziskave ali so v vmesnem času umrli.

Vrednosti očistka joheksola na prvem in drugem obisku se značilno razlikujejo (preglednica XIV). Na drugem obisku se je povečal delež bolnikov, ki imajo GF nižjo od  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , kar pomeni, da so v napredovalih fazah KLB (preglednica XX). Po šestih mesecih se je samo sedmim bolnikom (21,2%) GF povečala.

Preglednica XX: Delež bolnikov s 1. in 2. obiska z GF manjšo od  $60,0 \text{ ml/min/1,73m}^2$  ter povprečni očistek joheksola iz obeh obiskov v absolutnih vrednostih (ml/min)

	<b>1. obisk</b>	<b>2. obisk</b>
GF manjša od $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ (%)	69,7	81,8
Povprečni očistek joheksola (ml/min)	60,53	49,21
SD	$\pm 26,25$	$\pm 23,54$

V povprečju se je očistek joheksola v šestih mesecih zmanjšal za približno 11,3 ml/min. Dobili smo pričakovane rezultate, saj so faktorji tveganja za razvoj KLB in tudi intenzivno napredovanje bolezni srčno-žilna bolezen in starost nad 60 let (2). Vemo pa, da so bili v našo raziskavo vključeni bolniki s SP, s srednjo starostjo 74 let. Na upadanje GF pa vpliva tudi staranje bolnikov, saj se GF zmanjša od 0,75 do  $1,0 \text{ ml/min/1,73m}^2$  na leto (3).

d) Vpliv telesne sestave na ledvično funkcijo

Na oceno ledvične funkcije z enačbami na osnovi serumskega kreatinina vpliva telesna sestava, ki je pri starejših že normalno spremenjena, saj s starostjo mišična masa pada. Vpliv telesne sestave na ledvično funkcijo v enačbah za oGF zmanjšamo z vključitvijo različnih parametrov – demografskih karakteristik (starost, spol, višina, teža) in biokemičnih parametrov (koncentracija serumskega kreatinina, sečnine in albumina).

Zanimalo nas je ali parametri telesne sestave vplivajo na točnost oGF s pomočjo enačb na osnovi serumskega kreatinina. V programu SPSS smo določali Pearsonov korelacijski koeficient in p-vrednost. V preglednici XXI so zbrani tisti parametri telesne sestave, ki so značilno vplivali na relativno napako (PE) pri posameznih enačbah glede na očistek joheksola. Na oGF z enačbama MDRD4 in MDRD6 ni značilno vplival noben parameter telesne sestave.

Preglednica XXI: Statistično značilne korelacije med parametri telesne sestave in PE enačb C&G, C&G-LBM in CKD-EPI glede na očistek joheksola

	<b>Parametri telesne sestave</b>	C&G PE	C&G-LBM PE	CKD-EPI PE
<b>BIA</b>	Odstotek telesnega maščevja (%)	<b>SZ</b>	<b>SZ</b>	<b>SZ</b>
	Masa maščevja (kg)	<b>SZ</b>		
	Pusta telesna masa (kg)			<b>SZ</b>
	Odstotek puste telesne mase (%)	<b>SZ</b>	<b>SZ</b>	<b>SZ</b>
	Odstotek vode v telesu (%)	<b>SZ</b>		
	Voda v telesu (L)			<b>SZ</b>
<b>DEXA</b>	Masa maščevja (kg)	<b>SZ</b>		<b>SZ</b>
	Odstotek telesnega maščevja (%)	<b>SZ</b>		<b>SZ</b>
	Pusta telesna masa (kg)			<b>SZ</b>
	Odstotek puste telesne mase (%)	<b>SZ</b>		<b>SZ</b>
	Telesna masa (kg)	<b>SZ</b>		
	Indeks brezmaščobne mase (kg/m <sup>2</sup> )	<b>SZ</b>		<b>SZ</b>
	Brezmaščobna masa (kg)	<b>SZ</b>		<b>SZ</b>

*SZ...statistično značilna razlika; SN...ni statistično značilne razlike.*

PE med očistki joheksola in oGF z enačbama CKD-EPI in C&G imajo torej značilne korelacije z večino parametrov telesne sestave. Hkrati je iz preglednice XI razvidno, da imata ravno enačbi CKD-EPI in C&G najnižjo korelacijo oGF z očistkom joheksola. CKD-EPI daje sicer dobro oceno ledvične funkcije pri bolnikih, ki imajo GF pod 60

ml/min/1,73m<sup>2</sup>, medtem ko enačba C&G ne daje tako dobre ocene kot CKD-EPI, ampak je primerljiva z ostalimi enačbami (MDRD4, MDRD6 in C&G-LBM). Telesna sestava ima torej največji vpliv na točnost oGF glede na očistek joheksola pri enačbah CKD-EPI in C&G, najmanjši pa pri enačbah MDRD4 in MDRD6. PE oGF z enačbama MDRD4 in MDRD6 nimajo značilnih razlik s parametri telesne sestave. To je lahko posledica tega, da tudi sami MDRD enačbi ne vključujeta parametrov telesne mase.

## 6. SKLEP

- Plazemske koncentracije joheksola smo določili s predhodno razvito in validirano HPLC-UV metodo, ki se je izkazala za točno in ustrezno.
- Za izračun očistka joheksola potrebujemo dva plazemska vzorca odvzeta vsaj 2 uri po aplikaciji enkratnega in nizkega odmerka joheksola, kar je prednost za bolnika in za zdravstveno osebje.
- Plazemske očistke joheksola smo izračunali po enoprostornem farmakokinetičnem modelu in jih popravili z BM popravkom. Izračunani očistki joheksola naših bolnikov s SP so primerljivi z rezultati iz literature. Večina bolnikov je imela blago obliko ledvičnega popuščanja.
- Dokazali smo pozitivne korelacije med očistki joheksola in ocenami ledvične funkcije z enačbami MDRD4, MDRD6, C&G, C&G-LBM in CKD-EPI. Najbolj optimalni enačbi za določanje ledvične funkcije pri bolnikih s SP sta CKD-EPI in MDRD4.
- Enačbe MDRD4, MDRD6 in C&G precenjujejo GF, enačbi C&G-LBM in CKD-EPI pa podcenjujeta GF ne glede na očistek joheksola.
- Pri bolnikih z ledvičnim popuščanjem ( $GF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) je za oceno ledvične funkcije najboljša enačba CKD-EPI. Pri bolnikih z normalno ledvično funkcijo oz. z blago zmanjšano GF ( $GF > 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ) pa sta za oceno ledvične funkcije najboljši enačbi MDRD4 in C&G.
- V povprečju se je očistek joheksola pri posameznih bolnikih v 6 mesecih pričakovano zmanjšal, in sicer v povprečju za 11,3 ml/min.
- Parametri telesne sestave najmanj vplivajo na točnost oGF z enačbama MDRD4 in MDRD6, ki v sami enačbi ne vključujeta parametrov telesne mase. Največji vpliv telesne sestave je na oGF z enačbama C&G in CKD-EPI. Slednja vseeno daje dobro oceno ledvične funkcije, posebno pri bolnikih z ledvičnim popuščanjem.
- oGF z MDRD4 enačbo se v klinični praksi naj ne bi uporabljala pri starostnikih nad 75 let, vendar se ta enačba pri preučevanih bolnikih s SP dobro izkazuje, saj je glede na očistek joheksola primerljiva ostalim enačbam.
- Omejitev diplomskega dela je bila majhno število vključenih bolnikov, kar omejuje posplošitev rezultatov na širšo populacijo bolnikov s SP.

## 7. LITERATURA

1. Gref M, Glomerular filtration rate in adults: A single sample plasma clearance method based on the mean sojourn time – disertacija diplomske naloge, Umeå, Švedska 2011.
2. Thomas L, Huber AR. Renal function-estimation of glomerular filtration rate. *Clin Chem Lab Med.* 2006; 44(11):1295-302.
3. Rosner MH, Bolton WK. Renal function testing. *Am J Kidney Dis.* 2006 Jan; 47(1):174-83.
4. Hojs R, Bevc S, Ekart R, et al. Ocena glomerulne filtracije – primerjava serumskega kreatinina, serumskega cistatina c in enačb za izračun očistka kreatinina. *Zdrav vestn* 2006; 75: 455-62.
5. Salgado JV, Neves FA, Bastos MG, et al. Monitoring renal function: measured and estimated glomerular filtration rates - a review. *Braz J Med Biol Res.* 2010 Jun; 43(6):528-36.
6. Luque M, de Rivas B, Divisón JA, et al. Relationship between renal function and heart failure in hypertensive patients. *Intern Med J* 2010; 40(1): 76-9.
7. McAlister FA, Ezekowitz J, Tonelli M, et al. Renal insufficiency and heart failure: prognostic and therapeutic implications from a prospective cohort study. *Circulation.* 2004 Mar 2; 109(8):1004-9.
8. Penko M, Bevc S, Kanič V, et al. Prevalenca kronične ledvične bolezni pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom. *Zdrav Vestn* 2007; 76: 151-7.
9. Hillege HL, Nitsch D, Pfeffer MA, et al. Renal function as a predictor of outcome in a broad spectrum of patients with heart failure. *Circulation* 2006; 113(5): 671-8.
10. Gaspari F, Perico N, Ruggenenti P, et al. Plasma clearance of nonradioactive iohexol as a measure of glomerular filtration rate. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6(2): 257-63.
11. Shihabi ZK, Constantinescu MS. Iohexol in serum determined by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 1992; 38(10): 2117-20.
12. Filler G, Yasin A, Medeiros M. Methods of assessing renal function. *Pediatr Nephrol.* 2013 Feb 17.

13. Gaspari F, Ferrari S, Stucchi N, et al. Performance of different prediction equations for estimating renal function in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4(11): 1826-35.
14. Van Pottelbergh G, Hoste L, Degryse J, et al. Measuring the glomerular filtration rate in different age groups using iohexol, the protocol from the Belgian iohexol study. *Clin Biochem*. 2013 Jan; 46(1-2):31-6.
15. Bostom AG, Kronenberg F, Ritz E. Predictive performance of renal function equations for patients with chronic kidney disease and normal serum creatinine levels. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Aug;13(8):2140-4.
16. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView), dostopano: 18. 5. 2013
17. <http://www.drugs.com/mmx/iohexol.html>, dostopano: 24. 9. 2013
18. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=442aed6e-6242-4a96-90aa-d988b62d55e8>, dostopano: 10. 7. 2013
19. 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 Feb 25; 816(1-2):339-43.
20. Krutzén E, Bäck SE, Nilsson-Ehle I, et al. 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.
21. Castagnet S, Blasco H, Vourc'h P, et al. Routine determination of GFR in renal transplant recipients by HPLC quantification of plasma iohexol concentrations and comparison with estimated GFR. *J Clin Lab Anal*. 2012 Sep; 26(5):376-83.
22. Marx MA, Shuler CL, Tattersall JE, et al. Plasma iohexol clearance as an alternative to creatinine clearance for CAPD adequacy studies. *Kidney Int*. 1995 Dec; 48(6):1994-7.
23. Benz-de Bretagne I, Le Guellec C, Halimi JM, et al. New sampling strategy using a bayesian approach to assess iohexol clearance in kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2012; 34(3): 289-97.
24. Sterner G, Frennby B, Hultberg B, et al. Iohexol clearance for GFR-determination in renal failure - single or multiple plasma sampling? *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(3): 521-5.

25. Gaspari F, Guerini E, Perico N, et al. 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.
26. Eriksson CG, Kallner A. Glomerular Filtration Rate: A Comparison Between Cr-EDTA Clearance and a Single Sample Technique with a Non-ionic Contrast Agent. *Clin Biochem.* 1991 Jun; 24(3):261-4.
27. James TJ, Lewis AV, Tan GD, et al. Validity of simplified protocols to estimate glomerular filtration rate using iohexol clearance. *Ann Clin Biochem.* 2007 Jul; 44(Pt 4):369-76.
28. Tanaka A, Suemaru K, Araki H. A new approach for evaluating renal function and its practical application. *J Pharmacol Sci.* 2007 Sep; 105(1):1-5.
29. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kidney Dis* 39:S1-S266, 2002 (suppl 1)
30. Odden MC, Tager IB, Gansevoort RT, et al. Hypertension and low HDL cholesterol were associated with reduced kidney function across the age spectrum: a collaborative study. *Ann Epidemiol.* 2013 Mar; 23(3):106-11.
31. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, et al. Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. *Am J Kidney Dis.* 2010 Sep; 56(3):486-95.
32. Trobec K, Knez L, Meško Brguljan P, et al. Estimation of renal function in lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2012 Jun; 76(3):397-402.
33. Jones GR. Estimating renal function for drug dosing decisions. *Clin Biochem Rev.* 2011 May; 32(2):81-8.
34. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16(1): 31-41.
35. Saleem M, Florkowski CM, George PM, et al. Comparison of two prediction equations with radionuclide glomerular filtration rate: validation in routine use. *Ann Clin Biochem.* 2006 Jul; 43(Pt 4):309-13.
36. Delanaye P. Basic Nephrology and Acute Kidney Injury - How measuring glomerular filtration rate? Comparison of reference methods. Sahay, Manisha, 2012:22.

37. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009 May 5; 150(9):604-12.
38. Anavekar N, Bais R, Carney S, et al. Chronic kidney disease and automatic reporting of estimated glomerular filtration rate: a position statement. *Clin Biochem Rev* 2005; 26(3): 81-6.
39. Blainey JD, Hilton DD. The composition of the body in renal failure. *Ann R Coll Surg Engl.* 1970 Jul;47(1):45-51.
40. Woodrow G, Oldroyd B, Turney JH, et al. Segmental bioelectrical impedance in patients with chronic renal failure. *Clin Nutr.* 1996 Oct; 15(5):275-9.
41. Kakiya R, Shoji T, Tsujimoto Y, et al. Body fat mass and lean mass as predictors of survival in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2006 Aug;70(3):549-56.
42. Albanese CV, Diessel E, Genant HK. Clinical applications of body composition measurements using DXA. *J Clin Densitom.* 2003 Summer; 6(2):75-85.
43. Marđetko N, Določanje plazemskih koncentracij kontrastnega sredstva joheksola za oceno hitrosti glomerulne filtracije – diplomaska naloga, Ljubljana 2012.
44. 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.
45. Meucci V, Gasperini A, Soldani G, et al. A new HPLC method to determine glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in conscious dogs by single intravenous administration of iohexol and p-aminohippuric acid. *J Chromatogr Sci.* 2004 Feb;42(2):107-11.
46. Jezernik D, Analiza sestave telesa vzorca odrasle ženske populacije z antropometrijo in z metodo merjenja bioelektrične prevodnosti – diplomaska naloga, Ljubljana 2007
47. Tidman M, Sjöström P, Jones I. A Comparison of GFR estimating formulae based upon s-cystatin C and s-creatinine and a combination of the two. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Jan;23(1):154-60.
48. Gorenjak M: Določitev kreatinina in ocena glomerulne filtracije, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2009: 19