

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LARA OPEKA

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LARA OPEKA

**OPTIMIZACIJA PROTOKOLA MERJENJA SERUMSKEGA OČISTKA
SINISTRINA S FARMAKOKINETIČNO SIMULACIJO**

**OPTIMIZATION OF THE PROTOCOL FOR MEASUREMENT OF SINISTRIN
CLEARANCE BY PHARMACOKINETIC SIMULATION**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Jerneja Pajka, dr. med. Na isti katedri sem opravljala tudi eksperimentalni del magistrskega dela.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju, mag. farm., za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se iskreno zahvaljujem somentorju, doc. dr. Jerneju Pajku, dr. med., za posredovanje strokovnega znanja.

Posebna zahvala gre mojim staršem, ki so mi nudili podporo tekom celotnega študija, tako s prevozi in kosili kot tudi s svojo potrpežljivostjo. Hvala tudi bratoma Vitu in Anžetu ter fantu Urbanu, ki so poskrbeli, da mi je bilo v času študija lepo in so ves čas verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Jerneja Pajka, dr. med.

Lara Opeka

Predsednik komisije: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Rok Dreu, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 LEDVIČNA FUNKCIJA	1
1.1.1 Kronična ledvična bolezen (KLB)	1
1.2 OCENJEVANJE LEDVIČNE FUNKCIJE	3
1.2.1 Merjenje hitrosti glomerulne filtracije	3
1.2.2 Ocenjevanje GFR z uporabo enačb	4
1.3 EKSOGENI OZNAČEVALCI GFR	7
1.3.1 Inulin	7
1.3.2 Radioizotopni označevalci	8
1.3.3 Ioheksol	8
1.3.4 Sinistrin	9
1.4 UPORABA SINISTRINA	10
1.5 FARMAKOKINETIKA SINISTRINA	11
2 NAMEN DELA	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 HIPOTETIČNI BOLNIKI S KLB	15
3.2 PROGRAMSKI PAKET ZA FARMAKOKINETIČNO POPULACIJSKO ANALIZO	16
3.2.1 Farmakokinetični modeli	17
3.2.2 Farmakokinetična simulacija	21
3.2.3 Načrtovanje režima vzorčenja	22
3.2.4 Standardna dvostopenjska analiza	23
3.2.5 Vrednotenje ustreznosti optimiziranega protokola vzorčenja	24
4 REZULTATI	25
4.1 Plazemski koncentracijski profili sinistrina pri hipotetičnih ledvičnih bolnikih	25
4.2 Načrtovanje režima vzorčenja	27
4.3 Ocenjevanje očistka sinistrina	32
4.4 Ocenjevanje očistka sinistrina z upoštevanjem interindividualne variabilnosti	35

5 RAZPRAVA.....	37
6 SKLEP.....	41
7 LITERATURA	42

POVZETEK

Sinistrin je polifruktozna molekula, ki dobro ustreza merilom idealnega označevalca hitrosti glomerulne filtracije. Ocenjevanje glomerulne filtracije s sinistrinom temelji na intravenski aplikaciji sinistrina in jemanju krvnih vzorcev po predpisanem protokolu iz navodila za uporabo sinistrina. Ker je pri ledvičnih bolnikih glomerulna filtracija pogosto zelo zmanjšana, to vpliva na podaljšanje razpolovnega časa sinistrina, s tem pa na zmanjšanje hitrosti izločanja iz telesa. K temu lahko zaradi zastajanja telesnih tekočin pripomore tudi povečan volumen porazdelitve. Pri takih bolnikih je potrebno vzorčenje podaljšati in tako izboljšati natančnost ocene očistka sinistrina. Namen magistrske naloge je bil preizkusiti različne sheme vzorčenja krvi za hipotetične paciente, ki se med seboj razlikujejo glede na očistek sinistrina in/ali volumen porazdelitve. Naš namen je bil ugotoviti, kako dolgo mora potekati vzorčenje pri posameznem pacientu, da kar najbolj natančno ocenimo njegovo ledvično funkcijo, še posebej pri hipervolemičnih bolnikih. Poleg tega smo želeli oceniti možno napako, ki jo lahko pri podani oceni naredimo.

V okviru eksperimentalnega dela naloge smo s farmakokinetičnim programskim orodjem simulirali plazemske koncentracije sinistrina za različne hipotetične klinične situacije in jih primerjali. Za te situacije smo glede na predpostavljeno rezidualno napako s kriterijem D-optimalnosti določili osem različnih optimiziranih protokolov vzorčenja. S farmakokinetično simulacijo in standardno dvostopenjsko analizo smo ocenili vrednosti očistkov sinistrina pri posameznem pacientu in izračunali natančnost ocen, pridobljenih z optimiziranim protokolom in protokolom iz navodila za uporabo sinistrina, ter jih med seboj primerjali.

S pomočjo optimiziranih protokolov vzorčenja v večini primerov dobimo bolj natančne ocene očistka sinistrina, poleg tega pa vsebujejo precej manjše število vzorcev, kar je prijaznejše tako za pacienta kot tudi za osebje. Kljub temu je v določenih primerih ocena očistka pridobljena s protokolom vzorčenja, navodila za uporabo pa bolj natančna, kar pripisujemo veliki razliki v količini krvnih vzorcev.

Zaključujemo, da so optimizirani protokoli vzorčenja kljub temu v vsakdanji klinični praksi dobrodošli. Katerega izmed osmih bomo izbrali je odvisno od približne ocene GFR, predvidenega volumna porazdelitve, ki ga dobimo bodisi po klinični presoji bodisi z

metodo bioelektrične impedance, in predvidene rezidualne napake, ki jo ocenimo bodisi na podlagi izkušenj bodisi na podlagi parametrov validacije analizne metode.

ABSTRACT

Sinistrin is a sugar polymer of the fructan group and is a suitable marker for estimation of glomerular filtration rate by means of plasma clearances. It is based on intravenous bolus injection of sinistrin solution and sampling protocol from instructions for the use of sinistrin. However, decreased glomerular filtration rate and/or retention of body fluids in patients with chronic kidney disease can change the pharmacokinetics of sinistrin. It can result in longer half-life of sinistrin and its slower elimination rate. In this case, it is necessary to prolong the time interval of sampling protocol in order to provide accurate estimation of glomerular filtration rate. The aim of this work was to examine different sampling protocols and to evaluate their impact on estimation of glomerular filtration rate accuracy. In order to do that we simulated cohorts of patients with different values of distribution volume and/or glomerular filtration rate and estimated their glomerular filtration. Our intention was to determine the duration of sampling protocol for individual patient to ensure the most accurate glomerular filtration rate estimation, especially in hypervolemic patients. Moreover, we wanted to evaluate the error in estimation of glomerular filtration rate.

Within our research work, we performed pharmacokinetic simulations of sinistrin plasma concentrations for different clinical situations by using pharmacokinetic software tool. For this simulated cohorts of patients we designed eight different optimized sampling protocols by using D-optimal design approach, depending on type and value of the predicted residual error. Together with pharmacokinetic simulation and standard two-stage analysis, we estimated clearance of sinistrin for individual patient and evaluated its accuracy. Furthermore, we compared accuracy of sinistrin clearance estimations derived from new optimized sampling protocols and standard sampling protocol from instructions.

In general, with new sampling protocol we estimated more accurate values of glomerular filtration rate than with standard sampling protocol from instructions. Reduced number of samplings is another advantage of new sampling protocol, especially for patients and medical personnel. It also results in costs reduction. However, in some cases standard

sampling protocol gives more accurate estimations of glomerular filtration rate than optimized sampling protocol, which is probably a result of higher number of samplings in standard protocol from instructions.

In conclusion, although the accuracy of estimation of glomerular filtration rate obtained by optimized sampling protocol did not increase in all the cases, we believe that it would still be welcome in everyday clinical practice. Which of the eight sampling schemes will be used depends on the estimation of patient's glomerular filtration rate, volume of distribution obtained either by clinical judgment or simple method of bioelectric impedance, and the predicted residual error, assessed either on the basis of experience, either on the basis of validation of analytical methods parameters.

Ključne besede

Sinistrin, farmakokinetika, hitrost glomerulne filtracije, ledvična funkcija, protokol vzorčenja.

Keywords

Sinistrin, pharmacokinetic, glomerular filtration rate, renal function, sampling protocol.

SEZNAM OKRAJŠAV

Cl	očistek
CG	Cockcroft-Gault
CKD-EPI	ang. <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
FD	farmakodinamičen
FK	farmakokinetičen
IIV	interindividualna variabilnost
KLB	kronična ledvična bolezen
LADME	sproščanje (ang. <i>Liberation</i>), absorpcija (ang. <i>Absorption</i>), porazdeljevanje (ang. <i>Distribution</i>), presnova (ang. <i>Metabolism</i>), izločanje (ang. <i>Elimination</i>)
MDRD	ang. <i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
ML	metoda največjega verjetja (ang. <i>Maximum Likelihood</i>)
STS	standardna dvostopenjska analiza (ang. <i>Standard Two Stage</i>)
WLS	metoda uteženih najmanjših kvadratov (ang. <i>Weighted Least Squares</i>)

1 UVOD

1.1 LEDVIČNA FUNKCIJA

Ledvice so eden najpomembnejših organov v našem telesu, saj opravljajo štiri osnovne fiziološke funkcije: uravnavajo acido-bazno ravnovesje ter ravnovesje vode in topljencev, izločajo presnovke telesu lastnih snovi, zdravil in drugih ksenobiotikov, presnavljajo hormon 1,25-dihidroksikalciferol in izločajo eritropoetin. Posledično imajo vpliv na tvorbo rdečih krvničk, na krvni pritisk, metabolizem in uravnavanje ostalih endokrinih funkcij. Zmanjšana funkcija ledvic lahko hitro privede do porušenega ravnovesja elektrolitov, zastajanja telesnih tekočin ter odpadnih snovi, srčno-žilnih zapletov, posledično pa tudi do smrti (1, 2).

1.1.1 Kronična ledvična bolezen (KLB)

Kronična ledvična bolezen je pešanje temeljnih ledvičnih funkcij zaradi progresivnega in ireverzibilnega propadanja nefronov. Bolnik ima kronično ledvično bolezen, če je pri njem vsaj tri mesece prisoten vsaj eden izmed naštetih znakov:

- glomerulna filtracija ledvic je manjša od 60 ml/min/1,73 m² telesne površine;
- patološka sestava seča ali povečana količina albuminov in
- ugotovljene morfološke ali patohistološke spremembe ledvic (3).

Glede na okvaro ledvične funkcije kronično ledvično bolezen delimo na pet stopenj. Na prvi stopnji glomerulna filtracija še ni zmanjšana, so pa že prisotne strukturne spremembe ledvic ali drugi znaki ledvičnega obolenja (npr. mikroalbuminurija). Dejstvo je, da ima lahko bolnik KLB kljub normalni vrednosti GFR. Na drugi stopnji je GFR že nekoliko zmanjšana, vendar pa bolnik ob normalnem vnosu hrane in tekočin nima težav. Kronično popuščanje ledvic se razvije, kadar propade več kot 75 % nefronov, kar se po navadi zgodi na tretji in četrti stopnji KLB. Opazen je porast serumske koncentracije snovi, ki se izločajo predvsem z glomerulno filtracijo in/ali tubulno sekrecijo. Možen je tudi pojav spremenjenega dnevnega ritma mikcij in nikturija. Obdobje končne odpovedi ledvic nastopi na peti stopnji KLB, ko propade 90 % odstotkov nefronov ali več. Na tej stopnji

ima bolnik hude težave, saj ledvice kljub uravnavanju vnosa z dieto niso več sposobne vzdrževati ničelne bilance vode in soli. Volumen urina je pri najhujših okvarah manjši od 500 ml/dan (oligurija), njegova osmolarnost pa je podobna plazemski (izostenurija). Na tej stopnji je običajno potrebno začeti zdravljenje z dializo. V preglednici I so navedene vrednosti GFR na posameznih stopnjah KLB (3).

Preglednica I: Hitrost glomerulne filtracije pri različnih stopnjah napredovanja KLB (3, 4)

	stopnje napredovanja KLB				
	1.	2.	3.	4.	5.
	poškodba ledvic ob normalni ali celo povišani GFR	poškodba ledvic ob blagemu znižanju GFR	kronično popuščanje z zmernim do hudim znižanjem GFR		dokončna odpoved ledvic
GFR [ml/min/1,73 m ²]	≥ 90	89–60	59–30	29–15	< 15

Ocena hitrosti glomerulne filtracije je zelo pomembna za diagnosticiranje kronične ledvične bolezni, spremljanje njenega napredovanja in ustrezno zdravljenje. Pomembno je, da je ocena GFR natančna, saj se uporablja za spremljanje poteka in zdravljenje ledvične bolezni, prilagajanje režimov odmerjanja zdravil, ki se izločajo skozi ledvice ter bodisi za uvedbo nadomestnega zdravljenja z dializo bodisi za presaditev ledvic. Natančna ocena je zlasti pomembna pri bolnikih blizu končne odpovedi ledvic, saj pri slednjih govorimo o očistkih manjših ali enakih od 15 ml/min, pri katerih lahko že majhna absolutna napaka v oceni predstavlja relativno veliko odstopanje. Nadomestno zdravljenje z dializo se običajno uvede, ko bolnik na peti stopnji KLB dobi uremične simptome in težave zaradi odpovedovanja ledvic, ali če se pri njem ugotovi slabšanje stanja prehranjenosti. Pri bolnikih z večjo GFR se zdravniki za omenjeno zdravljenje ne odločajo, saj bolniku ne koristi in lahko zanj predstavlja določeno tveganje, je pa tudi precej drago (5, 6).

1.2 OCENJEVANJE LEDVIČNE FUNKCIJE

1.2.1 Merjenje hitrosti glomerulne filtracije

V klinični praksi merjenje glomerulne filtracije običajno temelji na merjenju očistka kreatinina z določitvijo serumske koncentracije kreatinina in njegove količine, ki se izloči v urin v štiriindvajsetih urah. Zbiranje dnevnega vzorca urina zahteva veliko časa, podvrženo pa je lahko tudi mnogim napakam, saj je vzorec pogosto nepopoln ali prevelik. Hitrosti glomerulne filtracije sicer ne moremo izmeriti direktno, lahko pa jo določimo posredno, s pomočjo snovi, ki v telesu ves čas nastaja, se iz telesa izloča samo skozi ledvice in zgolj z glomerulno filtracijo, se v ledvicah ne presnavlja niti ne nastaja ter se v ledvičnih tubulih ne absorbira in ne izloča. Biti mora fiziološko inertna in se ne sme vezati na plazemske proteine. Takšna snov bi bila idealen označevalec hitrosti glomerulne filtracije, a je žal še niso odkrili. Kljub temu, da idealnega označevalca ne poznamo, se za merjenje glomerulne filtracije uporabljajo označevalci, ki sicer niso idealni, so pa precej dober približek. Lahko so endogenega ali eksogenega izvora. V primeru endogenega označevalca kreatinina test za določanje očistka izvedemo tako, da bolnik najprej izprazni mehur, nato pa ta urin zavržemo. Nato urin zbiramo naslednjih štiriindvajset ur. Pri tem moramo poskrbeti, da bolnik zaužije potrebno količino tekočine, da zagotovi večji pretok urina od 1 ml/min. Enkrat v času zbiranja urina bolniku odvzamemo kri in določimo serumsko koncentracijo kreatinina - S_{Cr} . V zbranem štiriindvajseturnem urinu določimo koncentracijo kreatinina - c_{Cr} . Nato iz nomograma odčitamo bolnikovo telesno površino - A glede na njegovo telesno višino in težo ter s pomočjo volumna urina, izločenega na minuto - V , izračunamo očistek kreatinina po enačbi 1 (7, 8, 9).

$$Cl \left[ml / min / 1,73m^2 \right] = \frac{c_{Cr} [\mu mol / l]}{S_{Cr} [\mu mol / l]} \cdot V [l] \cdot \frac{1,73}{A [m^2]} \quad \text{Enačba 1}$$

1.2.1.1 Endogeni označevalec GFR

Trenutno najbolj klinično uporabljan označevalec ledvične funkcije je kreatinin. Kreatinin je telesu lastna snov, ki nastaja zlasti pri metabolizmu kreatina in fosfokreatina v skeletnih mišicah. V telesu nastaja z relativno konstantno hitrostjo, njegova količina pa je

proporcionalna mišični masi, ki je odvisna od spola, starosti in v manjši meri od prehrane (proteini). Kreatinin se izloča z urinom. V ledvičnih glomerulih se prosto filtrira, v tubulih se ne reabsorbira, se pa v manjši meri (7–10 %) izloča tudi s sekrecijo v proksimalnih tubulih. Ta odstotek se pri zvišanih koncentracijah kreatinina v serumu poveča. Ugotovili so, da je bila ocena očistka kreatinina, ki so jo pridobili iz dnevnega vzorca urina pri zdravi populaciji, za približno 10–40 % višja od dejanske glomerulne filtracije, pri okrnjeni ledvični funkciji pa še višja. Koncentracija serumskega kreatinina je pomanjkljiva za oceno začetnih stopenj okvare ledvične funkcije, saj je lahko ob povišanju serumskega kreatinina nad zgornjo mejo referenčnega območja glomerulna filtracija znižana že za približno polovico. Kot že navedeno, se kreatinin poleg glomerulne filtracije izloča tudi s sekrecijo v proksimalnih tubulih in neledvično, upoštevati pa je potrebno, da je njegova koncentracija odvisna tudi od spola pacienta, njegove starosti, prehranjevalnih navad, pospešenega katabolizma in bolezni mišic (7, 9).

1.2.2 Ocenjevanje GFR z uporabo enačb

Ker je zbiranje dnevnega vzorca urina nepraktično in podvrženo možnosti za številne napake, se hitrost glomerulne filtracije za ocenjevanje GFR pogosto ocenjuje z uporabo empiričnih formul, ki običajno temeljijo na meritvi serumske koncentracije kreatinina ter demografskih značilnostih pacienta. Predpogoj uporabe enačb za oceno očistka kreatinina je stabilna ledvična funkcija, pri kateri se GFR ne spreminja zaradi akutnega bolezenskega procesa. Serumska koncentracija kreatinina je torej v stacionarnem stanju, kar pomeni, da sta hitrosti nastajanja in izločanja kreatinina v telesu enaki. Omenjene enačbe se v vsakdanji klinični praksi uporabljajo predvsem pri bolnikih s KLB, kjer je bolezenski proces počasen in se nastajanje in izločanje kreatinina v dnevih ne spreminja bistveno (10, 11).

1.2.2.1 Cockcroft-Gaultova enačba

Cockcroft-Gaultova (CG) enačba (enačba 2) iz leta 1976 je ena prvih in najpogosteje uporabljenih enačb za ocenjevanje očistka kreatinina in s tem posredno GFR. Razvita je bila na osnovi meritev količine v urin izločenega kreatinina v štiriindvajsetih urah pri 249 bolnikih (96 % moških). Vključuje serumsko koncentracijo kreatinina ter starost in telesno

maso, ki odražata količino mišične mase, katere produkt je kreatinin. Omenjena enačba nam poda oceno očistka kreatinina in ne oceno hitrosti glomerulne filtracije. Slabost te enačbe je, da ne upošteva korekcije za telesno površino in je bila razvita glede na meritve očistka kreatinina pri bolnikih in ne glede na zlati standard za hitrost glomerulne filtracije, na primer inulinski ali iotalamatni očistek. Kljub navedenim slabostim je več raziskav pokazalo, da lahko z omenjeno enačbo v večini primerov bolj točno ocenimo GFR kot z dejansko meritvijo očistka kreatinina, tekem dolgoletne uporabe CG enačbe pa se je izkazalo, da lahko napoved očistka kreatinina izboljšamo z uporabo prilagojene telesne mase pri debelih ljudeh, kar pomeni, da namesto dejanske telesne mase v enačbi uporabimo 20–40 % razlike med dejansko in idealno telesno maso. Slednjo izračunamo glede na spol in telesno višino preiskovanca. Pri starostnikih ali zelo suhih ljudeh je serumska koncentracija kreatinina zelo nizka ($< 88,4 \mu\text{mol/l}$) in lahko napoved očistka kreatinina izboljšamo z uporabo prilagojene serumske koncentracije s konstantno vrednostjo $88,4 \mu\text{mol/l}$ (7, 10, 11).

V CG enačbi (enačba 2) so prisotne naslednje spremenljivke: Cl_{Cr} , ki predstavlja očistek kreatinina, TM , ki predstavlja telesno maso, S_{Cr} , ki predstavlja serumsko koncentracijo kreatinina, ter starost.

$$Cl_{cr} \left[\frac{ml}{min} \right] = \frac{1,23 \cdot (140 - \text{starost} [\text{leta}]) \cdot TM [\text{kg}]}{Scr [\mu\text{mol} / l]} \cdot (0,85 \text{ za ženske}) \quad \text{Enačba 2}$$

1.2.2.2 Enačba raziskave »*Modification of Diet in Renal Disease*«

Naslednja je enačba na osnovi raziskave *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) iz leta 1999, ki je bila razvita na delu z 1628 bolniki s pomočjo meritve GFR z očistkom ^{125}I -iotalamata in nam podaja oceno GFR ter vključuje šest neodvisnih spremenljivk: serumsko koncentracijo kreatinina in albuminov, starost, koncentracijo sečnine v serumu, spol, raso ter telesno površino. Leta 2000 je nastala poenostavljena enačba raziskave MDRD_{4-var}, ki se pogosteje uporablja v klinični praksi, temelji pa na serumski koncentraciji kreatinina, starosti, spolu, rasi in telesni površini. Primerjava omenjene enačbe s CG enačbo je potrdila večjo diagnostično zanesljivost, in sicer zaradi bolj natančne enačbe MDRD za ocenjevanje GFR. Pristranost ocene GFR pa je pri enačbi MDRD večja kot pri enačbi CG. Prednosti enačbe MDRD so, da je bila razvita in

validirana na veliki populaciji bolnikov s KLB, da je primerna za belo in črno raso in da je bila validirana glede na iotalamatni očistek, ki daje boljšo oceno hitrosti glomerulne filtracije kot kreatininski očistek. Pri tej enačbi ne potrebujemo podatka o telesni masi ali višini, ker normalizira hitrost glomerulne filtracije glede na standardno telesno površino ($1,73 \text{ m}^2$). Poenostavljeno enačbo MDRD za moški spol prikazuje enačba 3, za ženski spol pa enačba 4 (4, 5, 7, 11, 12, 13).

$$GFR \left[\text{ml} / \text{min} / 1,73 \text{m}^2 \right] = \frac{30849 \cdot (1,212 \text{ za črno raso})}{Scr [\mu\text{mol} / \text{l}]^{1,154} \cdot \text{starost} [\text{leta}]^{0,203}} \quad \text{Enačba 3}$$

$$GFR \left[\text{ml} / \text{min} / 1,73 \text{m}^2 \right] = \frac{22890 \cdot (0,742 \text{ za črno raso})}{Scr [\mu\text{mol} / \text{l}]^{1,154} \cdot \text{starost} [\text{leta}]^{0,203}} \quad \text{Enačba 4}$$

Zavedati pa se je potrebno, da so bile enačbe razvite na podlagi meritev na bolnikih in so zato manj primerne za oceno hitrosti glomerulne filtracije pri zdravih ljudeh. Ugotovili so, da z enačbo MDRD ocenimo prenizko hitrost glomerulne filtracije, zato velja priporočilo, da pri večjih vrednostih ocenjene GFR, kjer je nevarnost podcenjenosti največja, rezultat podajamo kot $>60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ in ne kot točne vrednosti. Uporaba enačb ni priporočljiva pri akutni ledvični odpovedi, pri osebah z ekstremnimi odstopanji od povprečja v telesni masi, višini in starosti, saj je ocena GFR pri takšnih osebah netočna. Za otroke uporabljamo druge enačbe (7, 13).

1.2.2.3 CKD-EPI enačba

CKD-EPI enačba je bila razvita s strani skupine kolaboracije za epidemiologijo KLB (ang. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) z namenom ohranitve natančnosti ocene GFR, pridobljene z enačbo MDRD pri vrednostih GFR manjših od $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ in izboljšanja natančnosti ocene pri vrednostih GFR višjih od $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. Enačba temelji na istih štirih spremenljivkah kot enačba MDRD_{4-var}, zaradi uporabe interpolacije z zlépki za opis odnosa med oceno GFR in serumskim kreatininom, starostjo, spolom in raso pa daje mnogo boljše rezultate, zlasti pri višjih vrednostih GFR in pri starostnikih, kar se odraža tudi v večji natančnosti (13, 14).

Poznane so 4 CKD-EPI enačbe za belo raso, in sicer enačbi za ženske, ob predpostavkah, da je njihova koncentracija serumskega kreatinina $S_{Cr} \leq 62 \mu\text{mol/l}$ (enačba 5) ali > 62

$\mu\text{mol/l}$ (enačba 6), in enačbi za moške, ob predpostavkah, da je njihova koncentracija serumskega kreatinina $S_{Cr} \leq 80 \mu\text{mol/l}$ (enačba 7) ali $> 80 \mu\text{mol/l}$ (enačba 8) (11, 12, 15).

$$GFR \left[\text{ml} / \text{min} / 1,73\text{m}^2 \right] = 144 \cdot \left(Scr \left[\mu\text{mol} / \text{l} \right] / 88,4 / 0,7 \right)^{-0,329} \cdot 0,993^{\text{starost}[\text{leta}]} \quad \text{Enačba 5}$$

$$GFR \left[\text{ml} / \text{min} / 1,73\text{m}^2 \right] = 144 \cdot \left(Scr \left[\mu\text{mol} / \text{l} \right] / 88,4 / 0,7 \right)^{-1,209} \cdot 0,993^{\text{starost}[\text{leta}]} \quad \text{Enačba 6}$$

$$GFR \left[\text{ml} / \text{min} / 1,73\text{m}^2 \right] = 141 \cdot \left(Scr \left[\mu\text{mol} / \text{l} \right] / 88,4 / 0,9 \right)^{-0,411} \cdot 0,993^{\text{starost}[\text{leta}]} \quad \text{Enačba 7}$$

$$GFR \left[\text{ml} / \text{min} / 1,73\text{m}^2 \right] = 141 \cdot \left(Scr \left[\mu\text{mol} / \text{l} \right] / 88,4 / 0,9 \right)^{-1,209} \cdot 0,993^{\text{starost}[\text{leta}]} \quad \text{Enačba 8}$$

Za razliko od CG enačbe, ki podaja absolutno vrednost očistka oziroma oceno GFR [ml/min], je GFR pri enačbah MDRD in CKD-EPI standardizirana na telesno površino [ml/min/1,73 m²]. Če želimo oceniti absolutno vrednost GFR, moramo dobljeno oceno pomnožiti z A/1,73 m², pri čemer A predstavlja telesno površino, ki jo na podlagi telesne mase in višine ocenimo z enačbo po Mostellerju ali DuBoisu (11).

1.3 EKSOGENI OZNAČEVALCI GFR

1.3.1 Inulin

Zaradi pomanjkljivosti kreatinina se v klinični praksi vse bolj uporabljajo eksogeni označevalci hitrosti glomerulne filtracije. Apliciramo jih intravensko, nato pa hitrost glomerulne filtracije določimo, tako da izračunamo hitrost eliminacije eksogenega kazalca v urin. Eden takih markerjev je inulin, polisaharid, ki se izloča izključno z glomerulno filtracijo v ledvicah, se v tubulih ne reabsorbira in se ne izloča s sekrecijo v proksimalnih tubulih. Te lastnosti omogočajo, da inulin uporabljamo za merjenje hitrosti glomerulne filtracije, njegov ledvični očistek pa velja za zlati standard. Z njegovo uporabo dobimo najtočnejšo vrednost hitrosti glomerulne filtracije, je pa omenjena metoda kompleksna in invazivna ter dolgotrajna. Zahteva namreč štiriindvajset urno zbiranje urina, po navadi z vstavljenim urinskim katetrom in stalno intravensko infuzijo. Zaradi navedenih slabosti se

ne uporablja v rutinski klinični praksi. Alternativna metoda, ki ne zahteva zbiranja urina, je določanje serumskega očistka inulina. Vseeno pa je omenjena metoda draga, zato je bilo pomembno najti primeren označevalec, ki bi zamenjal inulin (1, 16, 17).

1.3.2 Radioizotopni označevalci

Ocenjevanje GFR z očistkom radioizotopnega označevalca se je začelo uporabljati v zadnjih nekaj letih. Omenjeni označevalci so ^{99m}Tc - DTPA, ^{51}Cr -EDTA, ^{99m}Tc -MAG3 in ^{125}I -iotalamat in so za razliko od inulina, ki velja za zlati standard ocenjevanja GFR, validirani referenčni standardi. Ocenjevanje GFR z uporabo radioizotopnih označevalcev je dokaj enostavno in natančno. Prednost radioaktivno označenih označevalcev je majhna molekulska teža in minimalna vezava na plazemske beljakovine, pa tudi to, da se v ledvičnih tubulih ne izločajo in ne absorbirajo. Čeprav je merjenje GFR z omenjenimi označevalci hitro in enostavno, te metode vsebujejo radioaktivno označene označevalce, kar je obremenilno tako za bolnika kot za osebje. Njihova uporaba namreč zahteva posebno licenco in zapleteno rokovanje, shranjevanje ter odstranjevanje odpadkov. Zaradi radioaktivnosti teh označevalcev tudi ni mogoče uporabljati pri posebnih skupinah pacientov, na primer nosečnicah, pomemben faktor pa je tudi visoka cena (18, 19, 20).

Seveda pa ima vsak posamezen označevalec tako svoje prednosti kot tudi pomanjkljivosti. Uporaba ^{51}Cr -EDTA, na primer, daje za 5 do 15 % nižje rezultate kot inulinski očistek. Slabost tega označevalca je tudi, da z njegovo uporabo pri bolnikih s številnimi edemi določimo previsoke vrednosti GFR. Prednost ^{99m}Tc - DTPA pred ostalimi označevalci je kratek razpolovni čas (šest ur), ki zmanjša čas izpostavljenosti radioaktivnemu sevanju. ^{125}I -iotalamatni ledvični očistek, določen po enkratni subkutani injekciji, pa je enostavna in natančna metoda za merjenje GFR pri odraslih. Iotalamat se sicer lahko uporablja tudi kot rentgensko kontrastno sredstvo, prednost tega pa je, da ni radioaktivno označen (18, 19).

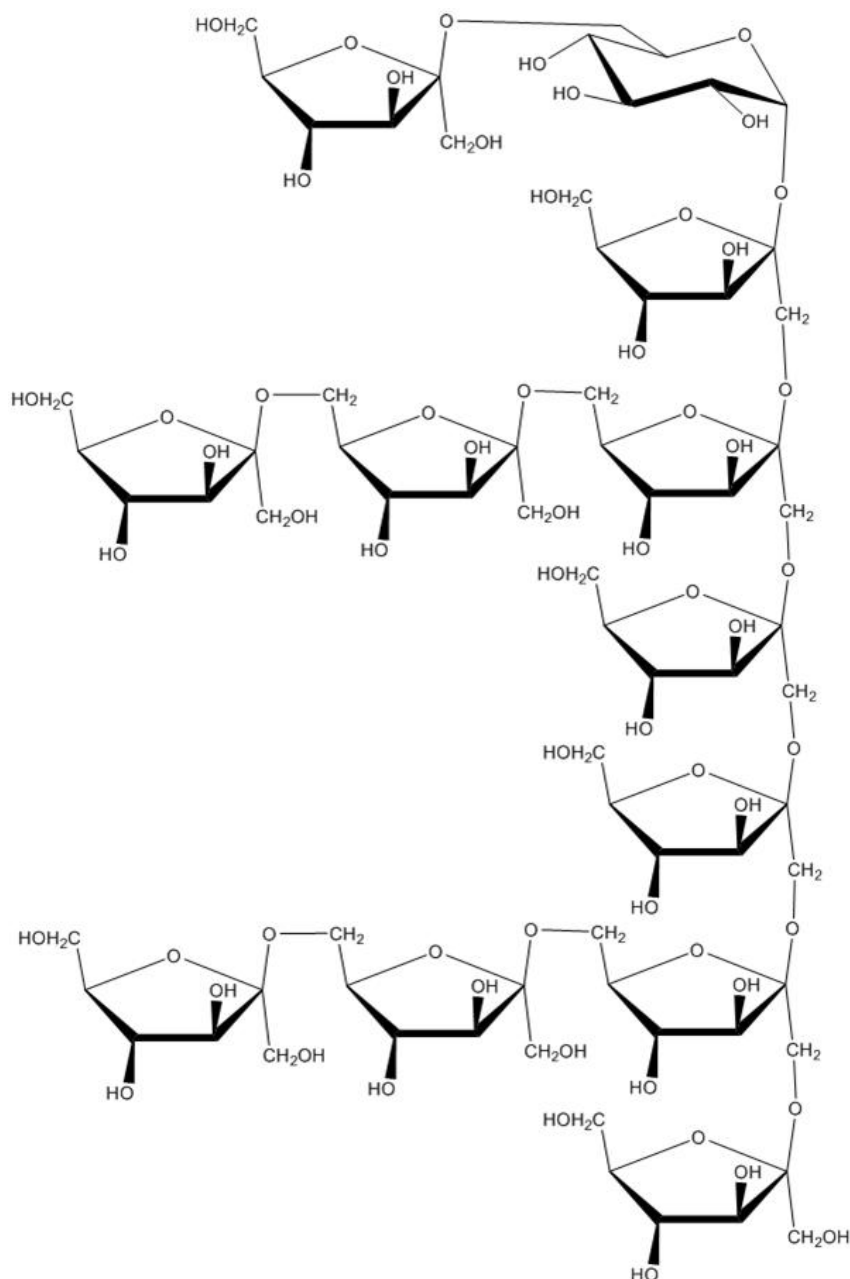
1.3.3 Ioheksol

Poleg iotalamata se kot rentgensko kontrastno sredstvo uporablja tudi ioheksol. Njegova prednost pred iotalamatom je predvsem v nizkem alergijskem potencialu. Plazemski

očistek po enkratni aplikaciji bolus injekcije ioheksola daje dobre ocene GFR. Obstaja tudi dokaj nova in enostavna metoda določanja ledvičnega očistka s pomočjo ioheksola na podlagi posušenih krvnih madežev kapilarne krvi, ki ima velik potencial v ocenjevanju GFR (20, 21).

1.3.4 Sinistrin

Sinistrin je tako kot inulin polifruktozna molekula, pridobljena iz čebulice primorske čebule (*Urginea maritima (L) Baker*) z ekstrakcijo in čiščenjem. Dobro ustreza merilom idealnega označevalca GFR. V zadnjem času nadomešča inulin, saj je molekula sinistrina bolj razvejana od molekule inulina in zato tudi mnogo bolj topna pri sobni temperaturi. Zaradi boljše topnosti je sinistrin lažje uporabljati za intravensko infuzijo kot inulin. Prednost sinistrina pred inulinom je tudi v izboljšani stabilnosti bazičnosti. V telesu se sinistrin porazdeljuje le po ekstracelularni tekočini in se ne akumulira ali metabolizira v telesnih tkivih, zato se lahko uporablja tudi za določanje volumna porazdelitve (intra in ekstravaskularni prostor, plodovnica). Strukturo sinistrina prikazuje slika 1 (22, 23, 24, 25).



Slika 1: Strukturna formula sinistrina

1.4 UPORABA SINISTRINA

V praksi se za določanje GFR uporablja ampulirana raztopina sinistrina, za zaščitenim imenom Inutest 25 %. Gre za brezbarvno do rahlo rumeno vodno raztopino sinistrina, zavarjeno v ampule. Ena ampula z 20 ml raztopine vsebuje 5000 mg sinistrina, ekvivalentnega vezanim fruktoznim enotam. Pacientu običajno vbrizgamo bolus injekcijo

2500–5000 mg sinistrina, kar ustreza 10–20 ml Inutesta 25 %. Pri otrocih se odmerek določi glede na telesno površino (24).

Pacient naj se, v primeru, ko je to mogoče, en do dva dni pred izvedbo testa drži diete z majhnim vnosom soli in proteinov in naj se izogiba ekstremni fizični aktivnosti. Pomembno je, da pacient na dan testa ne zajtrkuje, počiva vsaj eno uro in spi je 10 ml tekočine (vode ali sadnega čaja) na kilogram telesne teže. Pitje kave, črnega čaja ali sladkih napitkov ni dovoljeno. Tekom izvedbe celotnega testa je potrebno vzdrževati zadostno stopnjo hidracije (100 ml tekočine na uro, peroralno) (24).

Pacientu v obliki kratke bolus injekcije (0,5 min) intravensko injiciramo raztopino sinistrina. Temu sledi vzorčenje krvi v intervalih 0 (slepi vzorec), 5, 10, 15, 30, 60, 90 in 120 minut. V primeru posebnih zdravstvenih stanj (ascites, edemi) se lahko vzorčenje krvi nadaljuje še vsako uro. Vzorce moramo takoj centrifugirati, da ohranimo plazmo in v njej določimo koncentracijo sinistrina v vsakem od vzorcev (24).

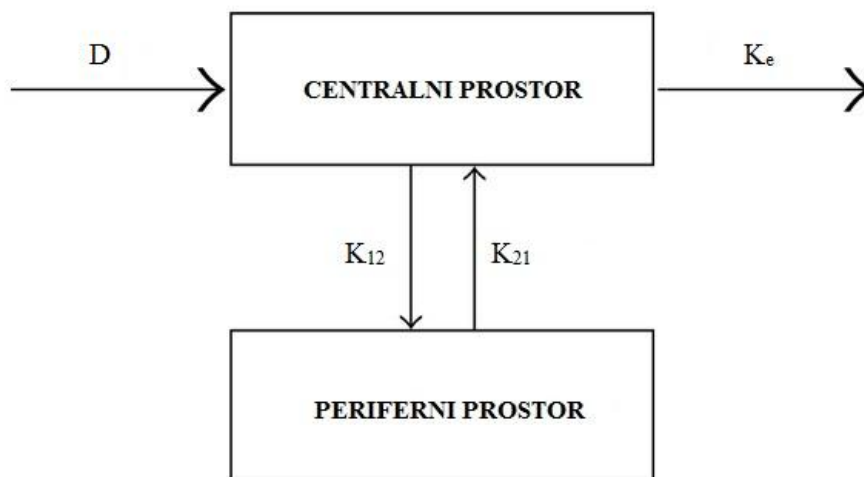
Zaradi polifruktozne strukture količino sinistrina v vzorcu določamo prek določanja količine fruktoze, in sicer v dveh stopnjah:

- najprej s pomočjo encima glukoza-oksidadaza z encimsko oksidacijo iz vzorca odstranimo glukozo in nato z encimoma inulinazo in β -fruktozidazo hidroliziramo polifruktozno strukturo sinistrina do fruktoze;
- v naslednji stopnji kvantificiramo količino fruktoze z uporabo občutljive visokoločljivostne tekočinske kromatografije (HPLC) z elektrokemično detekcijo ali spektrofotometrično prek pretvorbe fruktoze do 6-fosfoglukonata in NADH (26).

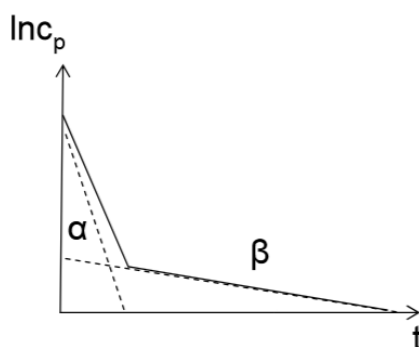
1.5 FARMAKOKINETIKA SINISTRINA

Kinetiko izločanja sinistrina po aplikaciji bolus injekcije najbolje opiše dvoprostorni farmakokinetični model (slika 2), kar je bilo ugotovljeno v različnih eksperimentih s sinistrinom. Po omenjenem modelu je sinistrin apliciran v dobro prekrvljen del ekstracelularne tekočine, centralni prostor modela, ki predstavlja kri, plazmo ali serum, ter dobro prekrvljene organe, od kjer se nato porazdeljuje v periferni prostor, ki predstavlja ostala tkiva. Eliminira se iz centralnega prostora preko ledvic. Dvoprostorni

farmakokinetični model vsebuje podatke hitrostnih konstant porazdeljevanja sinistrina med obema prostoroma (K_{12} , K_{21}), hitrostno konstanto eliminacije (K_e) in volumen centralnega prostora. S pomočjo teh sistemskih parametrov lahko določimo ostale parametre modela, kot so očistek (GFR), volumen perifernega prostora in retencijski čas sinistrina v perifernem prostoru. D na sliki dvoprostornega farmakokinetičnega modela (slika 2) predstavlja odmerek apliciranega sinistrina (23, 27).



Slika 2: Skica dvoprostornega farmakokinetičnega modela



Slika 3: Odvisnost logaritmskih vrednosti plazemskih koncentracij učinkovine od časa pri dvoprostornem FK modelu

Slika 3 prikazuje odvisnost logaritmskih vrednosti plazemskih koncentracij ($\ln c_p$) od časa (t) v primeru dvoprostornega FK modela. α ponazarja fazo porazdeljevanja, β pa fazo izločanja sinistrina. Če želimo čim bolj celostno zajeti obe fazi, moramo kri dovolj dolgo vzorčiti.

Pri določenih zdravstvenih stanjih je lahko volumen izvencelične tekočine oziroma volumen porazdelitve povečan; v tem primeru je farmakokinetika učinkovin spremenjena. Do tega lahko pride bodisi pri hudo opečenih osebah bodisi pri pacientih z odpovedjo jeter, kar se odraža v spremenjeni razporeditvi telesnih tekočin in spremenjeni vezavi na plazemske beljakovine (ascites). Zastajanje telesnih tekočin je zelo pogosto prisotno tudi pri ledvičnih bolnikih z zelo znižano GFR ali dokončno odpovedjo ledvic (22, 28, 29). Ker je sinistrin hidrofilna molekula, ki se v telesu porazdeljuje po izvencelični tekočini, se pri bolnikih z zastajanjem telesnih tekočin volumen distribucije sinistrina močno poveča. S tem se porazdelitvena faza sinistrina podaljša, kar se kaže v kasnejšem lomljenju plazemskega profila (slika 3). Poleg tega je razpolovni čas sinistrina ($t_{1/2}$) odvisen od volumna porazdelitve (V) in njegovega očistka (Cl), zato se v primeru povečanega volumna porazdelitve in/ali zmanjšanju ledvične funkcije (zmanjšanju očistka) podaljša (enačba 9). Podaljšan razpolovni čas sinistrina pa je tudi posledica zmanjšane hitrosti izločanja sinistrina (k_e), kar je razvidno iz enačbe 10.

$$t_{1/2}[h] = \frac{V[l] \cdot \ln 2}{Cl[l/h]} \quad \text{Enačba 9}$$

$$t_{1/2}[h] = \frac{\ln 2}{k_e[h^{-1}]} \quad \text{Enačba 10}$$

V takih primerih v navodilu predpisan protokol vzorčenja krvi ne daje natančnih rezultatov, saj je predpisan časovni interval vzorčenja prekratek in je hitrost izločanja sinistrina iz telesa podaljšana. V primeru majhne realne GFR pri prekratnem vzorčenju ne zajamemo dovolj velikega reprezentativnega dela počasnega linearne upada koncentracije (eliminativna faza), ki je predvsem odvisna od GFR in manj od volumna porazdelitve in so tako napake ocenjevanja GFR večje. Zato je pri skupinah pacientov z zelo zmanjšano GFR in/ali povečanim volumnom distribucije potrebno podaljšati interval vzorčenja krvi, dokler plazemska koncentracija sinistrina ne doseže »stacionarnega stanja« (22, 28, 29).

2 NAMEN DELA

Natančna ocena GFR je zelo pomembna z vidika spremljanja in zdravljenja KLB. Obstaja več načinov določanja GFR, med drugim tudi z merjenjem očistka sinistrina. Omejili smo se na enkratno bolus injekcijo raztopine sinistrina in merjenje očistka sinistrina iz plazme. V praksi se že uporablja tako imenovani Inutest® z navodili za vzorčenje krvnih vzorcev, in sicer v intervalih 0 (slepi vzorec), 5, 10, 15, 30, 60, 90 in 120 minut, v primeru zastajanja telesnih tekočin pa se vzorčenje nadaljuje še vsako uro. Zlasti pri skupini pacientov, kjer je volumen porazdelitve sinistrina povečan bodisi zaradi slabe ledvične funkcije bodisi zaradi hipervolemije, se izločanje sinistrina iz telesa upočasni in je zato smiselno vzorčenje krvi podaljšati. S tem namreč izboljšamo natančnost ocene očistka sinistrina oziroma ledvične funkcije (24).

Namen magistrske naloge je preizkusiti različne sheme jemanja vzorcev krvi za različne paciente, ki se med seboj razlikujejo glede na GFR in/ali volumen porazdelitve. Naš namen je ugotoviti, kako dolgo moramo vzorčiti kri pri posameznem pacientu, da kar najbolj natančno ocenimo njegovo ledvično funkcijo, še posebej pri bolnikih z zmerno ali visoko stopnjo hipervolemije. Poleg tega želimo oceniti možno napako, ki jo pri oceni lahko naredimo.

Za delo bomo uporabili programski paket ADAPT 5 in dvoprostorni farmakokinetični model, ki najbolje opiše farmakokinetiko sinistrina. Za hipotetične bolnike z različnimi stopnjami KLB in hipervolemije bomo najprej z uporabo farmakokinetične simulacije določili koncentracijske profile sinistrina v plazmi po intravenskem apliciranju bolus injekcije. Nato bomo z uporabo kriterijev D-optimalnosti določili časovne točke vzorčenja krvi, v kateri je ocena serumskega očistka sinistrina kar najbolj natančna. Nadalje bomo s simulacijo preverili, kako natančna in točna je ocena očistka pri določanju koncentracije sinistrina z upoštevanjem različne rezidualne napake, pa tudi z upoštevanjem interindividualnih razlik v farmakokinetičnih parametrih. Sledila bo primerjava natančnosti ocene očistka, pridobljenega z optimiziranim protokolom vzorčenja krvi, in ocena očistka, pridobljenega s standardnim oziroma podaljšanim protokolom vzorčenja, ki je predpisan v navodilu za uporabo sinistrina. Na osnovi dobljenih rezultatov bomo pripravili priporočila za vzorčenje krvi glede na različne klinične situacije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 HIPOTETIČNI BOLNIKI S KLB

Obravnavali smo deset hipotetičnih situacij, ki temeljijo na nekaj najbolj tipičnih primerih iz vsakodnevne klinične prakse (preglednica II). Gre za pacienta z normalno vrednostjo GFR in volumnom porazdelitve (P1) in pacienta z nefrotskim sindromom, ki ima sicer normalno vrednost GFR, vendar pa je precej hipervolemičen (P2). Ostali pacienti se razlikujejo glede na stopnjo KLB, in sicer osebi P3 in P4 sta v stanju zmerne KLB, pri čemer je pacient P4 za razliko od pacienta P3 močno hipervolemičen. Osebe P5, P6 in P7 so v stanju četrte stopnje KLB. Pri tem je oseba P5 normovolemična, P6 zmerno hipervolemična, P7 pa zelo hipervolemična. Zadnji trije pacienti imajo dokončno odpoved ledvic. Njihova GFR je zelo majhna, enako kot prej pa se razlikujejo še glede na volumen stranskega prostora. Vrednosti parametrov nekaterih tipičnih primerov pacientov so navedeni v preglednici II.

Preglednica II: Vrednosti farmakokinetičnih parametrov za deset hipotetičnih bolnikov

	normalen	nefrotski sindrom	zmerna KLB (3. stopnja)		KLB (4. stopnja)			odpoved ledvic		
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Cl [ml/min]	120	120	45	45	15	15	15	7	7	7
V ₁ [l]	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Q [ml/min]	139	139	139	139	139	139	139	139	139	139
V ₂ [l]	4	14	4	14	4	8	14	4	8	14
↑V [l]	0	10	0	10	0	4	10	0	4	10

Očistek sinistrina (Cl) je volumen plazme [ml], ki se v eni minuti popolnoma očisti sinistrina in predstavlja oceno GFR. Vrednosti očistka v preglednici II so predpostavljene glede na stopnjo ledvične bolezni. V₁ je volumen centralnega prostora. Predpostavili smo, da je V₁ pri vseh deseti hipotetičnih situacijah enak 7,5 l (22). Prav tako smo povsod predpostavili enako vrednost očistka med centralnim in perifernim prostorom Q (30). V₂ je volumen periferne prostora in skupaj z V₁ predstavlja volumen porazdelitve učinkovine.

V_2 je pri bolnikih s slabo ledvično funkcijo, pri katerih pogosto prihaja do zastajanja telesnih tekočin, večkrat povečan. 4 l predstavlja normalno vrednost perifernega volumna, 8 l predstavlja zmerno stopnjo hipervolemije, 14 l pa ponazarja hujšo stopnjo hipervolemije. S pomočjo omenjenih vrednosti hipotetičnih parametrov in farmakokinetične simulacije smo pridobili časovne poteke plazemskih koncentracij sinistrina po aplikaciji 2500 mg sinistrina v obliki bolus injekcije.

3.2 PROGRAMSKI PAKET ZA FARMAKOKINETIČNO POPULACIJSKO ANALIZO

Za farmakokinetično simulacijo in analizo podatkov smo uporabili programski paket ADAPT 5, ki je napisan v programskem jeziku Fortran. Sestavljen je iz podprogramov za simulacijo, oceno parametrov in načrtovanje režima vzorčenja, ki so namenjeni razvoju farmakokinetičnih/farmakodinamičnih (FK/FD) modelov. Omenjeno računalniško orodje je zasnovano tako, da nam olajša odkrivanje, raziskovanje in uporabo osnovnih FK/FD lastnosti zdravil. Vsebuje tudi zbirko osnovnih FK/FD modelov (30, 31).

Programska oprema ADAPT nam omogoča dve vrsti analiz:

- individualno analizo in
- populacijsko analizo (32).

V sklopu individualne analize vsebuje 3 različne module:

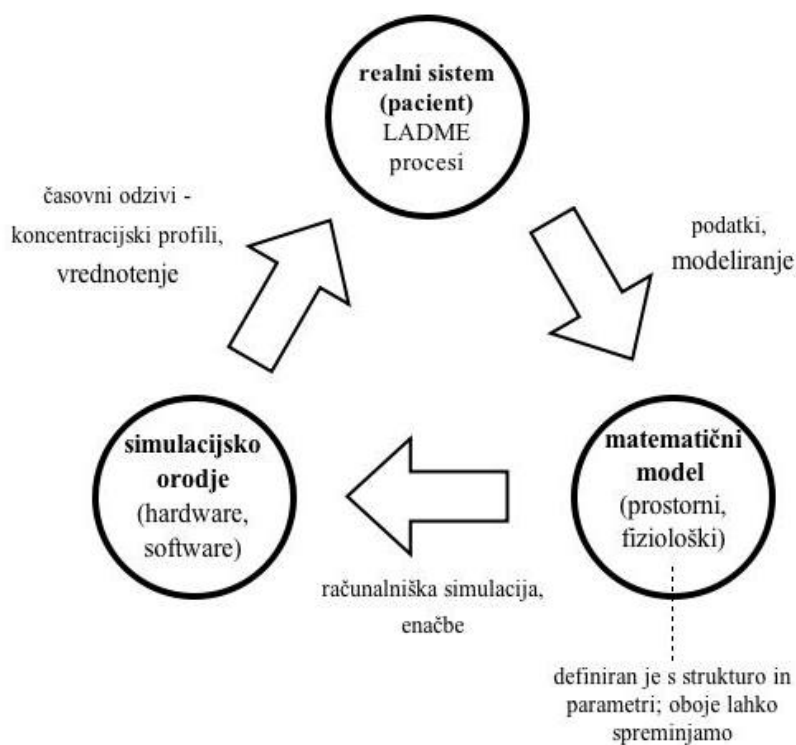
- modul za identifikacijo parametrov (ID), ki omogoča uporabo metod uteženih najmanjših kvadratov (WLS), največjega verjetja (ML), posplošenih najmanjših kvadratov (GLS) in najvišje posterione Bayesove verjetnosti (MAP);
- simulacijski modul (SIM) z možnostjo individualne ali populacijske simulacije z upoštevanjem rezidualne napake ali brez in
- modul načrtovanja režima vzorčenja (SAMPLE), ki omogoča izračun časov vzorčenja z uporabo D- in C- optimalnih kriterijev (32).

Populacijska analiza vsebuje:

- parametrično populacijsko FK/FD modeliranje z metodo največjega verjetja in EM algoritmom (MLEM);
- iterativno dvostopenjsko analizo (ITS) in
- standardno dvostopenjsko analizo (STS) ter naivno združevanje podatkov (NPD) z različnimi metodami ocenjevanja (WLS, ML ali MAP) (32).

3.2.1 Farmakokinetični modeli

Realni sistem je biološki sistem, ki ga opišemo z LADME procesi. To so sproščanje (ang. *Liberation*), absorpcija (ang. *Absorption*), porazdeljevanje (ang. *Distribution*), presnova (ang. *Metabolism*) in izločanje (ang. *Elimination*). Zaradi etičnih, časovnih in stroškovnih omejitev človeškega FK modela, se je razmahnila uporaba FK modelov, s katerimi se približamo realnim situacijam in lahko predvidimo določene spremembe pri pacientih. Takšni modeli so zelo uporabni, saj lahko z njimi izvajamo simulacije – postopke eksperimentiranja – s čimer nadomestimo eksperimentiranje na pacientih in zmanjšamo število eksperimentov za zapletene sisteme, takšno delo pa je tudi hitrejše in etično bolj sprejemljivo. Rezultat tega je optimizacija režima odmerjanja in časovni odziv modela – plazemski koncentracijski profil, čemur sledi ugotavljanje ustreznosti modela. Omenjeni proces ponazarja slika 4 (31, 33, 34).



Slika 4: Shema procesa ugotavljanja vpliva kinetike in LADME procesov na koncentracijske profile učinkovine z uporabo FK modelov

Prvi korak pri našem delu je bila določitev osnovnega strukturnega modela, ki smo ga izbrali v zbirki že navedenih prostornih modelov. Izbrali smo dvoprostorni farmakokinetični model, opisan z ledvičnim očistkom in volumnom porazdelitve, saj se je ta izkazal za najbolj primerne v farmakokinetičnih raziskavah s sinistrinom (27). Omenjen model predstavlja model 2COMPCL iz zbirke ADAPT, opišejo pa ga naslednje matematične enačbe:

$$k_e [h^{-1}] = \frac{Cl[l/h]}{V_1[l]} \quad \text{Enačba 11}$$

$$k_{13} [h^{-1}] = \frac{Q[l/h]}{V_1[l]} \quad \text{Enačba 12}$$

$$k_{31} [h^{-1}] = \frac{Q[l/h]}{V_3[l]} \quad \text{Enačba 13}$$

V zgornjih enačbah k_e predstavlja hitrostno konstanto izločanja sinistrina iz centralnega prostora z volumnom V_1 , Cl očistek sinistrina iz centralnega prostora, k_{13} in k_{31} hitrostni

konstanti prehajanja sinistrina iz centralnega v periferni prostor z volumnom V_3 in obratno, Q pa očistek sinistrina med centralnim in perifernim prostorom. Enačbe 14, 15 in 16 prikazujejo diferencialne enačbe dvoprostornega farmakokinetičnega modela. Pretvorjene so v programski jezik Fortran. $X(1)$ in $X(3)$ predstavljata količini sinistrina v centralnem in perifernem prostoru ob času (t), $P(1)$ hitrostno konstanto eliminacije, $P(4)$ hitrostno konstanto prehajanja sinistrina iz centralnega v periferni prostor, $P(2)$ in $P(5)$ volumen centralnega in perifernega prostora, vhod v model (odmerek sinistrina) pa je funkcija $R(1)$. Za primer ekstravaskularne aplikacije sinistrina omenjeni model iz zbirke vsebuje tudi prostor z volumnom V_2 , od koder se sinistrin s kinetiko prvega reda absorbira v centralni prostor. V tem primeru $X(2)$ ponazarja količino sinistrina v »absorpcijskem« prostoru ob času (t), $P(3)$ pa hitrostno konstanto absorpcije. Ker je v našem primeru sinistrin apliciran v obliki bolus injekcije, določeni členi iz enačb zato niso relevantni. Preglednica 1 prikazuje oznake spremenljivk v enačbah 14, 15 in 16 (32).

$$XP(1) = -(P(1)+P(4))/P(2)*X(1) + P(3)*X(2) + P(4)/P(5)*X(3) + R(1) \quad \text{Enačba 14}$$

$$XP(2) = -P(3)*X(2) \quad \text{Enačba 15}$$

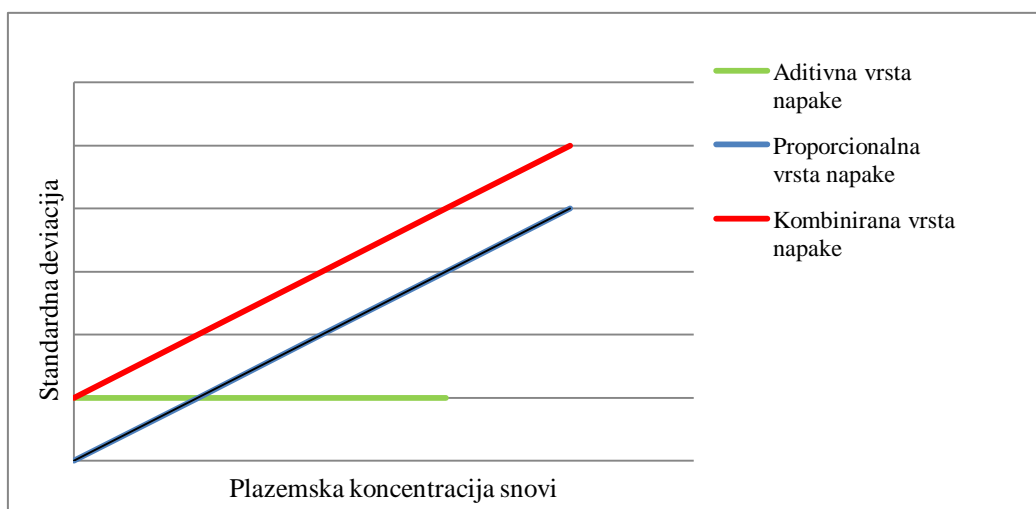
$$XP(3) = P(4)/P(2)*X(1) - P(4)/P(5)*X(3) \quad \text{Enačba 16}$$

Preglednica III: Oznake spremenljivk v enačbah dvoprostornega farmakokinetičnega modela

oznaka v jeziku Fortran	spremenljivka v enačbah modela
X(1)	$x_1(t)$
X(2)	$x_2(t)$
X(3)	$x_3(t)$
XP(1)	$dx_1(t)/dt$
XP(2)	$dx_2(t)/dt$
XP(3)	$dx_3(t)/dt$
P(1)	k_e
P(2)	V_1
P(3)	k_a
P(4)	k_{13}
P(5)	V_3
R(1)	$r(t)$

Po izbiri ustreznega modela smo določili farmakokinetične parametre hipotetičnih pacientov. Vrednosti GFR in V_2 smo določili glede na stopnjo ledvične funkcije bolnika in morebitno zastajanje telesnih tekočin, ostale parametre pa na podlagi podatkov iz literature (22).

Pri oceni interindividualne variabilnosti smo se odločili za proporcionalni in kombinirani model napake. Pri proporcionalnem modelu je ključno, da standardna deviacija (SD) narašča z večanjem koncentracije, kombiniran model pa je kombinacija proporcionalnega in aditivnega modela. Pri slednjem je SD konstantna ne glede na vrednost koncentracije. Slika 5 grafično ponazarja odvisnost standardne napake od koncentracije za posamezno vrsto napake (35).



Slika 5: Prikaz aditivne, proporcionalne in kombinirane rezidualne napake kot standardne deviacije v odvisnosti od plazemske koncentracije snovi

V programski opremi ADAPT 5 je proporcionalna vrsta napake poimenovana kot SD_{slope} , aditivna vrsta napake kot SD_{inter} , kombinirana vrsta napake pa je definirana s SD_{slope} in SD_{inter} hkrati. Definirali smo model variance (enačba 17), kjer $\text{var}\{e(t)\}$ predstavlja varianco normalno porazdeljene napake $e(t)$, narejene v času merjenja. Napaka ima srednjo vrednost 0, $y(t)$ je izmerjena koncentracija ob času t , σ_{inter} in σ_{slope} pa sta parametra modela napake. Model smo pretvorili v ustrezno Fortran obliko (enačba 18). Preglednica IV prikazuje oznake spremenljivk v enačbah 17 in 18 (32).

$$\text{var}\{e(t)\} = (\sigma_{inter} + \sigma_{slope} y(t))^2$$

Enačba 17

$$V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2$$

Enačba 18

Preglednica IV: Oznake spremenljivk v enačbah modela variance farmakokinetičnega modela

spremenljivka modela variance napake	oznaka v jeziku Fortran
$\text{var}\{e(t)\}$	V (1)
σ_{inter}	PV (1)
σ_{slope}	PV (2)

3.2.2 Farmakokinetična simulacija

S farmkokinetično simulacijo lahko dobro prikažemo, kako lahko sprememba v farmakokinetičnem parametru vpliva na koncentracijski profil učinkovine, kar lahko zelo pripomore k boljšemu razumevanju ključnih principov farmakokinetike (31).

S programom SIM smo izvedli več vrst simulacij, in sicer za začetek **individualno simulacijo**, ki jo definira izhodni vektor modela $y(\theta, t_j)$ za vsako posamezno situacijo, za katero določimo vrednosti vseh sistemskih parametrov θ , vključno z začetnimi pogoji. Vektor θ predstavlja zbirko parametrov v modelu α in začetne pogoje c . Da bi poudarili odvisnost izhoda modela od parametrov θ sta rešitvi enačb 19 in 20 predstavljeni z oznako $y(\theta, t_j)$. Predpostavka je namreč, da je sistem definiran z naslednjimi diferencialnimi in izhodnimi enačbami, pri čemer $r(t)$ predstavlja vhodni vektor in v našem primeru ponazarja odmerke oziroma bolus injekcije. Kot rezultat izvedenih simulacij smo dobili množico simuliranih koncentracij sinistrina ob različnih časih, iz katere smo s programom Microsoft Excel naredili grafični prikaz plazemskih koncentracijskih profilov za posamezne paciente. Primerjava dobljenih krivulj nam je nazorno pokazala razlike v kinetiki med različnimi ledvičnimi bolniki glede na vrednosti GFR in morebitno prisotnost hipervolemije (32).

$$\frac{dx}{dt} = f(x(t), \alpha, r(t), t), \quad x(0) = c$$

Enačba 19

$$y(t) = h(x(t), \alpha, r(t), t)$$

Enačba 20

V naslednji stopnji smo **izvedli individualno simulacijo z upoštevanom rezidualno napako**, in sicer prek simuliranja izhodnega vektorja ob novih (optimiziranih) časih $z(t_j)$, upoštevajoč napako, za podane vrednosti parametrov v modelu. Vektor $z(t_j)$ je definiran z enačbo 21, v kateri $y(\theta, t_j)$ predstavlja vektor izhoda iz modela ob času t_j , $e(t_j)$ pa vektor napake, ki jo običajno pripisujemo procesu meritev. Program je simulacijo večkrat ponovil (petstokrat za posamezno klinično situacijo), v vsaki od ponovitev pa je upošteval naključno deviacijo. Vse deviacije skupaj ustvarjajo predhodno določeno izhodno napako (32).

$$z(t_j) = y(\theta, t_j) + e(t_j), j = 1, \dots, m \quad \text{Enačba 21}$$

Da bi se čim bolj približali realnosti smo izvedli še **populacijske simulacije modela z upoštevanjem interindividualne variabilnosti sistemskih parametrov**. Program za simulacije uporablja naključno izbrane vrednosti sistemskih parametrov, ki so normalno ali lognormalno porazdeljeni, in matriko kovariance, upošteva pa tudi predpisano izhodno napako (32).

3.2.3 Načrtovanje režima vzorčenja

S programom SAMPLE smo določili optimalni protokol vzorčenja krvi, s katerim bi kar najbolj natančno ocenili GFR. Omenjeni program izračuna vektor časov vzorčenja $d = [t_1 \ t_2 \ \dots \ t_m]$, in sicer na osnovi kriterija D-optimalnosti, ki ga opiše enačba 22. Gre za minimiziranje determinante kovariančne matrike parametrov ali z drugimi besedami; išče se množico točk d (časi), za katero je determinanta matrike $\{-|M_\theta(d)|\}$ najmanjša (33, 36, 37).

$$d^* = \arg \min_d \{-|M_\theta(d)|\} \quad \text{Enačba 22}$$

Matrika $M_\theta(d) = \{m_{jk}\}$, $j = 1, \dots, p$, $k = 1, \dots, p$ (Fisherjeva informacijska matrika) je dimenzij $p \times p$ in je sestavljena iz naslednjih elementov: y_i predstavlja elemente vektorja $y(\theta)$, g_i elemente vektorja $g(\theta, \beta) = [g_1(y_1(\theta, t_1), \beta) \cdots g_1(y_1(\theta, t_m), \beta)]$, oba pa sta funkciji vektorja $d = [t_1 \ t_2 \ \dots \ t_m]$ in sta ovrednotena z nominalnimi vrednostmi

parametrov v osnovnem modelu (θ^*) in parametrov v modelu variance (β^*), ki smo jih že predhodno določili (enačba 23) (32, 36, 37).

$$m_{jk} = \sum_{i=1}^{n_r} \frac{1}{g_i} \left(\frac{\partial y_i}{\partial \theta_j} \right) \left(\frac{\partial y_i}{\partial \theta_k} \right) + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n_r} \frac{1}{g_i^2} \left(\frac{\partial g_i}{\partial \theta_j} \right) \left(\frac{\partial g_i}{\partial \theta_k} \right) \quad \text{Enačba 23}$$

Program na ta način določi čase vzorčenja, tako da je natančnost ocen parametrov največja, njihova standardna deviacija pa je tedaj najmanjša. Določili smo še spodnjo in zgornjo mejo časovnega intervala (pet minut in štiriindvajset ur po odmerjanju) (32, 37).

3.2.4 Standardna dvostopenjska analiza

Simulirane koncentracijske profile smo analizirali s programom standardne dvostopenjske analize (STS), ocenjevali pa smo vrednosti parametrov za različne protokole vzorčenja.

Program STS deluje na dveh stopnjah, in sicer na prvi stopnji ocenjuje vrednosti parametrov z ločenim prilaganjem parametrov modela za vsakega posameznika. Na drugi stopnji pa na osnovi ocenjenih parametrov posameznikov ocenjuje vrednosti populacijskih parametrov oziroma populacijsko sredino in kovarianco. Uporaben je za združevanje posameznih ocen FK parametrov iz eksperimentalnih FK študij (32, 38).

Uporabili smo dve metodi statističnega ocenjevanja, in sicer **metodo uteženih najmanjših kvadratov** (WLS) in **metodo največjega verjetja** (ML). Prva metoda ocenjuje parametre, tako da minimizira uteženo vsoto kvadratov razlik med izmerjenimi in ocenjenimi vrednostmi. Če je torej napaka oziroma varianca meritve ob določenem času velika, je točki ob tem istem času dodeljena manjša teža. In obratno, kadar je vrednost ob določenem času precizno izmerjena, in je torej varianca majhna, ji je dodeljena večja teža (35).

$$O_{WLS}(\theta) = \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^m w_{ij} \left[z_i(t_j) - y_i(\theta, t_j) \right]^2 \quad \text{Enačba 24}$$

Ocena uteženih najmanjših kvadratov je vrednost θ , ki minimizira $O_{WLS}(\theta)$. $y_i(\theta, t_j)$ v enačbi 24 predstavlja rešitev i -te enačbe modela ob času t_j , torej ocene parametrov ob

določenih časih, $z_i(t_j)$ pa predstavlja opažene vrednosti ob danih časih. Pri našem delu smo uporabili splošno metodo uteženih najmanjših kvadratov, kar pomeni, da so bile vse utežitve w_{ij} nastavljene na vrednost ena (32).

Metoda največjega verjetja ocenjuje parametre, tako da je njihova verjetnost največja. Verjetnost ujemanja izračunanih vrednosti z meritvami pa je definirana kot funkcija vseh določenih parametrov v modelu, tudi parametrov modela rezidualne napake. Ta način predvideva, da so najboljše ocene parametrov izražajo v napovedih, ki se najbolj ujemajo z meritvami.

3.2.5 Vrednotenje ustreznosti optimiziranega protokola vzorčenja

Za vrednotenje ocen parametrov modela smo računali efektivno napako – RMSE (ang. *Root Mean Square Error*). Služi nam kot merilo natančnosti naše metode, in sicer, tako da meri kvadrat razlike med dejanskimi simuliranimi vrednostmi parametrov in njihovimi ocenami (enačba 25). Dejansko predstavlja standardno deviacijo teh razlik (39).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\text{napoved}_i - \text{meritev}_i)^2} \quad \text{Enačba 25}$$

S pomočjo tega orodja smo primerjali natančnosti ocen parametrov, določenih z predpisanim in optimiziranim protokolom v navodilih vzorčenja in glede na izbrano metodo ocenjevanja parametrov (WLS ali ML).

4 REZULTATI

4.1 Plazemski koncentracijski profili sinistrina pri hipotetičnih ledvičnih bolnikih

Glede na dejanske primere v klinični praksi smo predpostavili deset različnih tipičnih primerov pacientov, in sicer osebo z normalnimi farmakokinetičnimi parametri, osebo z nefrotskim sindromom, dve osebi v stanju tretje stopnje KLB, tri osebe v stanju četrte stopnje KLB in tri osebe s končno odpovedjo ledvic. Pacienti znotraj iste stopnje KLB se razlikujejo glede na to, ali so normovolemični, rahlo hipervolemični ali zelo hipervolemični.

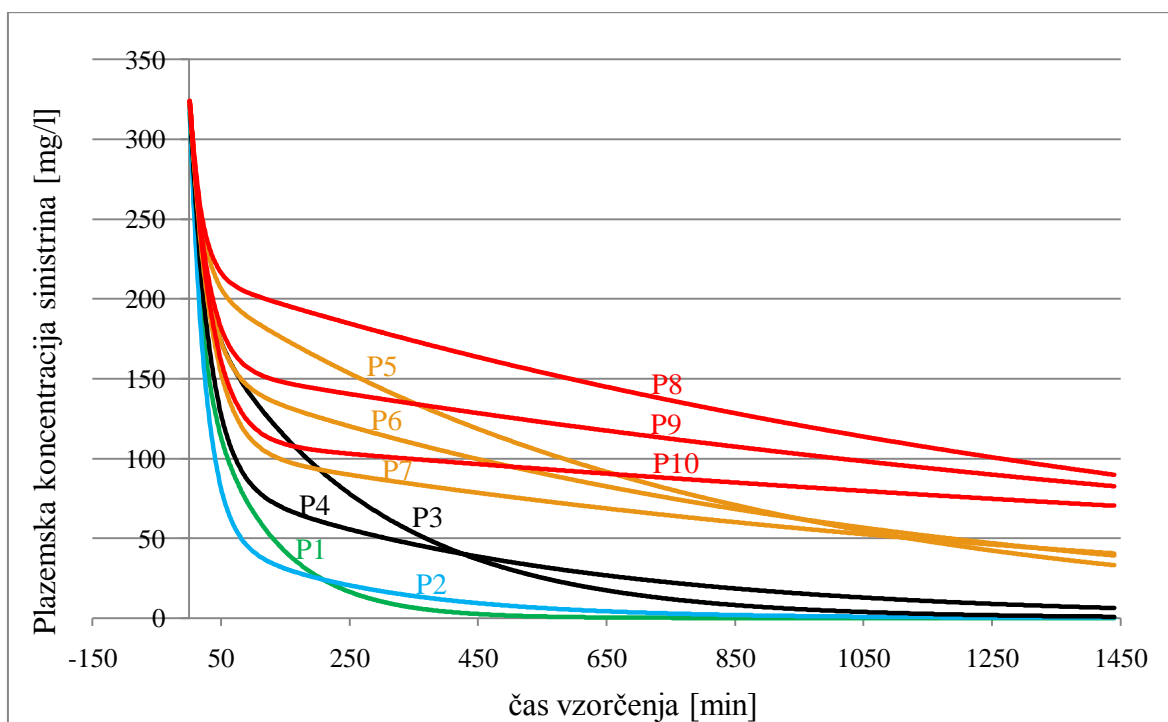
Za omenjene paciente smo s pomočjo programske opreme ADAPT 5 in programa SIM izvedli individualno simulacijo plazemskih koncentracij sinistrina [mg/l] v posameznih časovnih točkah po aplikaciji 2500 mg sinistrina v obliki bolus injekcije. Preglednica V prikazuje plazemske koncentracije sinistrina ob posameznih časih vzorčenja.

Preglednica V: Plazemska koncentracija sinistrina v odvisnosti od časa vzorčenja pri desetih hipotetičnih ledvičnih bolnikih

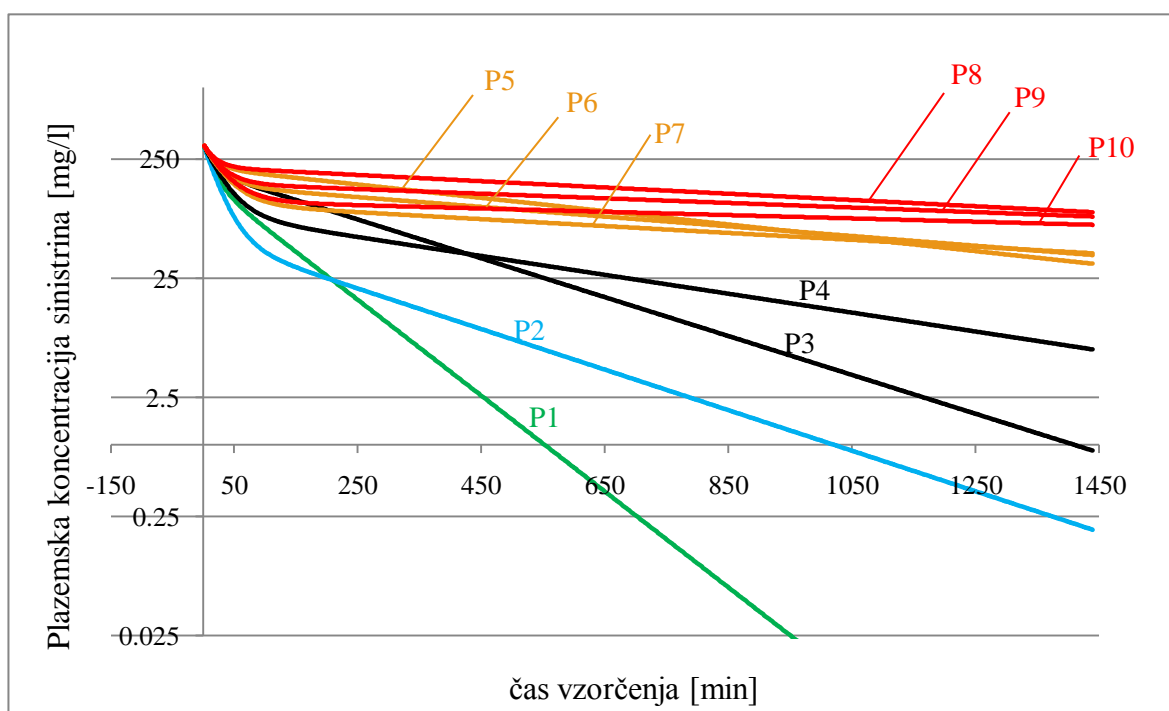
čas vzorčenja [min]	Plazemska koncentracija sinistrina [mg/l]									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	282,73	281,15	297,19	295,55	303,18	302,03	301,51	304,80	303,64	303,13
10	243,63	238,36	268,98	263,34	279,85	275,89	274,05	282,82	278,83	276,98
15	213,12	203,25	246,79	235,87	261,72	254,04	250,34	265,86	258,09	254,35
30	154,18	131,20	203,58	175,28	227,69	207,63	196,89	234,61	214,07	203,10
60	100,54	67,71	164,08	113,24	200,66	163,44	139,88	211,82	172,69	148,06
90	73,46	45,70	143,24	87,41	189,42	146,23	115,38	204,30	157,47	124,45
120	55,19	36,33	127,34	75,31	181,52	137,98	104,21	199,88	151,03	113,98
180	31,59	27,21	101,52	63,81	167,86	128,62	95,07	192,58	145,12	106,36
240	18,12	21,38	81,04	56,67	155,38	121,37	90,50	185,70	141,08	103,39
300	10,39	16,89	64,69	50,71	143,83	114,70	86,81	179,08	137,33	101,27
360	5,96	13,35	51,64	45,44	133,14	108,40	83,39	172,70	133,71	99,32
480	1,96	8,34	32,91	36,50	114,09	96,84	76,97	160,61	126,75	95,59
600	0,65	5,21	20,97	29,32	97,76	86,51	71,06	149,36	120,15	92,00
720	0,21	3,26	13,36	23,55	83,77	77,28	65,59	138,90	113,89	88,55
840	0,07	2,04	8,52	18,92	71,78	69,04	60,55	129,18	107,96	85,23
960	0,02	1,27	5,43	15,20	61,51	61,67	55,90	120,13	102,34	82,03
1080	0,01	0,79	3,46	12,21	52,70	55,09	51,60	111,72	97,01	78,95
1200	0,00	0,50	2,20	9,81	45,16	49,22	47,64	103,90	91,96	75,99

1320	0,00	0,31	1,40	7,88	38,70	43,97	43,98	96,62	87,17	73,14
1440	0,00	0,19	0,90	6,33	33,16	39,28	40,60	89,85	82,64	70,39

Simulirane koncentracijske profile prikazujeta sliki 6 in 7. Opazimo lahko velike razlike v oblikah koncentracijskih profilov med pacienti z različnimi ledvičnimi očitki ter med normo- in hipervolemičnimi pacienti.



Slika 6: Simulirane plazemske koncentracije sinistrina v odvisnosti od časov vzorčenja



Slika 7: Simulirane plazemske koncentracije sinistrina v odvisnosti od časov vzorčenja v semilogaritemski skali

4.2 Načrtovanje režima vzorčenja

S pomočjo kriterijev D-optimalnosti smo določili optimizirane protokole vzorčenja za različne klinične situacije, ki se razlikujejo v vrednostih očistka in/ali volumnu porazdelitve, pri tem pa smo upoštevali različne vrste in vrednosti rezidualne napake, ki so navedene v preglednici VI. Rezidualna napaka vključuje napako analizne metode, napako pri odmerjanju sinistrina ter napake pri jemanju krvnih vzorcev, saj časi odvzema krvi niso povsem identični predpisanim. Poleg tega predpostavljena rezidualna napaka vključuje še intraindividualno variabilnost – variabilnost v vrednostih FK parametrov znotraj posameznika, saj se lahko na primer GFR tekom izvajanja poskusa nekoliko spreminja – ter napako strukturnega modela in modela napake, saj sta to le dobra približka modela, ki opisuje realno stanje posameznika. Izmed vseh naštetih prispevkov k rezidualni napaki verjetno največ pripomore napaka analizne metode in je zato tudi najpomembnejša.

Preglednica VI: Vrste in vrednosti predpostavljenih rezidualnih napak pri ocenjevanju GFR z merjenjem očistka sinistrina

vrsta napake	vrednost napake
proporcionalna:	2 %
	5 %
	10 %
kombinirana:	$2,5 \text{ mg/l} + 0,005 \cdot S_{Cr} \text{ [mg/l]}$
	$10 \text{ mg/l} + 0,02 \cdot S_{Cr} \text{ [mg/l]}$

Za vsako od petdesetih situacij (deset pacientov in pet različnih napak) smo s programom določili po štiri optimalne čase vzorčenja za posameznega pacienta, in sicer v razponu od 5 do 1440 minut. Za vsako od petih napak smo združili optimalne čase glede na pacientov očistek sinistrina. Preglednica VII prikazuje optimizirane čase vzorčenja glede na pacientov očistek ob upoštevanju **2 % proporcionalne rezidualne napake**.

Preglednica VII: Optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju 2 % proporcionalne rezidualne napake

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	29	27	26	26
	52	54	40	40
	140	136	54	53
	194	217	134	134
	1440	1440	185	185
			223	225
			1440	1440

Preglednica VIII prikazuje optimizirane čase vzorčenja glede na pacientov očistek ob upoštevanju **5 % proporcionalne rezidualne napake**.

Preglednica VIII: Optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju 5 % proporcionalne rezidualne napake

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	29	27	26	26
	52	54	40	40
	140	136	54	53

	195	216	134	133
	1440	1440	184	185
			223	225
			1440	1440

Preglednica IX prikazuje optimizirane čase vzorčenja glede na pacientov očistek ob upoštevanju **10 % proporcionalne rezidualne napake**.

Preglednica IX: Optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju 10 % proporcionalne rezidualne napake

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	29	26	26	26
	52	54	40	40
	140	134	54	53
	195	216	134	133
	1440	1440	184	185
			223	225
			1440	1440

Preglednica X prikazuje optimizirane čase vzorčenja glede na pacientov očistek ob upoštevanju **kombinirane rezidualne napake z vrednostjo $2,5 \text{ mg/l} + 0,005 \cdot S_{Cr}$ [mg/l]**.

Preglednica X: Optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju kombinirane rezidualne napake vrednosti $2,5 \text{ mg/l} + 0,005 \cdot S_{Cr}$ [mg/l]

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	21	23	24	24
	30	37	34	34
	65	86	41	42
	105	148	110	122
	192	385	155	167
	381	732	190	202
			983	1440
			1319	
			1440	

Preglednica XI prikazuje optimizirane čase vzorčenja glede na pacientov očistek ob upoštevanju **kombinirane rezidualne napake z vrednostjo $10 \text{ mg/l} + 0,02 \cdot S_{Cr} [\text{mg/l}]$** .

Preglednica XI: Optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju kombinirane rezidualne napake vrednosti $10 \text{ mg/l} + 0,02 \cdot S_{Cr} [\text{mg/l}]$

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	21	23	24	24
	30	37	34	34
	65	86	41	42
	105	148	110	122
	192	385	155	167
	381	732	190	202
			983	1440
			1319	
			1440	

Poleg tega, da so bili časi že združeni glede na posamezno napako, smo po pregledu podatkov in premisleku čase vzorčenja združili še glede na isto vrsto rezidualne napake. V preglednici XII so vsi časi vzorčenja zbrani po posameznih vrednostih očistka ob predpostavki proporcionalne rezidualne napake, neodvisno od njene vrednosti. Enako predstavlja preglednica XIII, le da gre tu za upoštevanje kakršnekoli kombinirane rezidualne napake.

Preglednica XII: Optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju proporcionalne rezidualne napake

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	29	27	26	26
	52	54	40	40
	140	136	54	53
	194	216	134	134
	1440	1440	185	185
			223	225
			1440	1440

Preglednica XIII: Optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju kombinirane rezidualne napake

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	21	23	24	24
	30	37	34	34
	65	86	41	42
	105	148	110	122
	192	385	155	167
	381	732	190	202
			983	1440
			1319	
			1440	

Glede na naš cilj, optimizacijo obstoječega protokola vzorčenja krvi, smo skušali, kar se da zmanjšati število vzorčenj (na pet oziroma šest časovnih točk) in izvzeti vzorčenja predvsem v nočnih urah, ko je to še posebej obremenjujoče za pacienta. Preostale čase smo smiselno zaokrožili (na pet minut) in s tem dodatno olajšali delo osebju, ki bo izvajalo jemanje krvi. V preglednicah XIV in XV so končni optimizirani časi vzorčenja, združeni glede na pacientov očistek in predpostavljeno vrsto rezidualne napake.

Preglednica XIV: Končni optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju proporcionalne rezidualne napake

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	40	40	40	40
	140 (2 h 20 min)	135 (2 h 15 min)	135 (2 h 15 min)	135 (2 h 15 min)
	195 (3 h 15 min)	215 (3 h 35min)	200 (3 h 20 min)	200 (3 h 20 min)
	1440 (24 h)	1440 (24 h)	1440 (24 h)	1440 (24 h)

Preglednica XV: Končni optimizirani časi vzorčenja krvi glede na vrednost očistka sinistrina ob upoštevanju kombinirane rezidualne napake

	očistek sinistrina [ml/min]			
	120	45	15	7
optimizirani časi vzorčenja krvi [min]	5	5	5	5
	25	30	35	35
	60	85 (1 h 25 min)	120 (2 h)	120 (2 h)
	105 (1h 45 min)	150 (2 h 30 min)	180 (3 h)	160 (2 h 40 min)
	190 (3 h 10 min)	385 (6 h 25 min)	960 (16 h)	200 (3 h 20 min)
	380 (6 h 20 min)	730 (12 h 10 min)	1440 (24 h)	1440 (24 h)

4.3 Ocenjevanje očistka sinistrina

Za vsako od desetih tipičnih kliničnih situacij smo s programom izvedli po petsto individualnih simulacij z upoštevanjo slučajno rezidualno napako. Predpostavka je bila, da ima v osnovi znotraj ene klinične situacije vseh petsto pacientov enake farmakokinetične parametre, vendar pa so plazemski profili različni zaradi prisotnosti rezidualne napake. Tako smo za vsako klinično situacijo dobili po petsto koncentracijskih profilov, ki smo jih nadalje s pomočjo programskega orodja analizirali in ocenili očistek sinistrina za posameznega pacienta. Ocenjevanje očistka smo izvajali z dvema različnima statističnima metodama, in sicer z WLS in ML, in primerjali natančnost ocene, pridobljene na en in drug način. Tabeli prikazujeta primerjavo vrednosti RMSE ocene očistka, pridobljene z metodama WLS in ML, za vseh deset oseb s predpostavljeno 2 % proporcionalno napako. Nižja vrednost RMSE predstavlja večjo natančnost ocene parametra. Za ostale vrste in vrednosti napak je značilen isti trend kot za 2 % proporcionalno napako – z metodo ML dobimo natančnejše ocene očistka kot z metodo WLS. Preglednica XVI ponazarja natančnost ocen očistka za posamezne osebe, pridobljene z dvema različnima metodama z optimiziranim protokolom vzorčenja, preglednica XVII pa z protokolom vzorčenja, ki je predpisan v navodilu.

Preglednica XVI: Vrednosti RMSE ocen očištkov, pridobljene z dvema različnima metodama (WLS in ML) z uporabo optimiziranega protokola vzorčenja za deset hipotetičnih kliničnih situacij

		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
RMSE [ml/min]	WLS	1,518	5,409	1,903	0,909	0,205	0,212	0,291	0,156	0,224	0,345
	ML	1,291	1,192	0,471	0,444	0,168	0,203	0,287	0,154	0,224	0,344

Preglednica XVII: Vrednosti RMSE ocen očištkov, pridobljene z dvema različnima metodama (WLS in ML) z uporabo protokola vzorčenja iz navodil za uporabo sinistrina za deset hipotetičnih kliničnih situacij

		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
RMSE [ml/min]	WLS	5,802	2,391	8,814	2,447	7,997	1,433	2,837	6,182	1,578	2,957
	ML	4,254	1,06	8,328	1,683	7,853	1,316	2,394	6,096	1,492	2,642

Ocenjevanje očiščka smo izvedli tako za vzorčenje, predpisano v navodilu za uporabo sinistrina, kot tudi za naš optimiziran protokol vzorčenja. V obeh primerih smo za vsako situacijo izračunali natančnost ocene očiščka (RMSE) in ocene med seboj primerjali. Primerjavo natančnosti ocen očiščkov, pridobljenih z metodo ML, glede na vrsto in vrednost predpostavljene rezidualne napake in glede na protokol vzorčenja krvi za osebe P1, P2, P3, P4 in P5 prikazuje preglednica XVIII, za osebe P6, P7, P8, P9 in P10 pa preglednica XIX.

Preglednica XVIII: Vrednosti RMSE ocen očištkov, pridobljene z uporabo optimiziranega protokola vzorčenja in protokola vzorčenja iz navodil za uporabo sinistrina ob upoštevanju različnih rezidualnih napak pri hipotetičnih pacientih P1, P2, P3, P4 in P5

			P1	P2	P3	P4	P5
rezidualna napaka		časi vzorčenja	RMSE [ml/min]				
proporcionalna	2 %	optimizirani	1,2908	1,1922	0,4714	0,4435	0,1678
		iz navodila za uporabo	4,2544	1,0599	8,3282	1,6826	7,8534
	5 %	optimizirani	3,2482	2,9818	1,177	1,1098	0,4193
		iz navodila za uporabo	28,8093	2,6742	22,5969	4,4466	12,2655
	10 %	optimizirani	6,4396	6,0026	2,4727	2,2667	3,0223
		iz navodila za uporabo	56,404	2,6742	27,6741	11,3343	14,7239
kombinirana	2 mg/l + 0,005·S _{Cr} [mg/l]	optimizirani	3,7459	9,9403	1,2399	2,6336	0,3866
		iz navodila za uporabo	10,2787	6,4487	8,4882	4,0279	7,0124
	10 mg/l + 0,02·S _{Cr} [mg/l]	optimizirani	28,0900	54,9481	6,6897	14,3277	2,1622
		iz navodila za uporabo	59,3136	41,7438	27,264	19,2275	13,7834

Preglednica XIX: Vrednosti RMSE ocen očištkov, pridobljene z uporabo optimiziranega protokola vzorčenja in protokola vzorčenja iz navodil za uporabo sinistrina ob upoštevanju različnih rezidualnih napak pri hipotetičnih pacientih P6, P7, P8, P9 in P10

			P6	P7	P8	P9	P10
rezidualna napaka		časi vzorčenja	RMSE [ml/min]				
proporcionalna	2 %	optimizirani	0,2031	0,2874	0,1543	0,2237	0,3441
		iz navodila za uporabo	1,3156	2,3941	6,0957	1,4918	2,6415
	5 %	optimizirani	0,5066	0,7216	0,3860	0,5623	0,8798
		iz navodila za uporabo	3,6157	6,1546	9,6097	3,5951	5,3063
	10 %	optimizirani	1,8395	1,9062	1,7547	1,6885	2,2064
		iz navodila za uporabo	7,3582	9,9168	11,8136	5,6730	7,8317
kombinirana	2 mg/l + 0,005·S _{Cr} [mg/l]	optimizirani	0,5072	0,7816	0,2653	0,4036	0,6859
		iz navodila za uporabo	1,6434	3,6758	5,4808	1,6395	3,4338
	10 mg/l + 0,02·S _{Cr} [mg/l]	optimizirani	2,2864	3,8152	1,3179	1,7575	2,9581
		iz navodila za uporabo	7,0699	11,0667	10,9899	5,3459	8,3362

4.4 Ocenjevanje očistka sinistrina z upoštevanjem interindividualne variabilnosti

Da bi celotno situacijo nekoliko približali realnosti, smo predpostavili določeno stopnjo interindividualne variabilnosti med pacienti za posamezne farmakokinetične parametre in tako v farmakokinetični model vnesli še dodatno raven variabilnosti. Predpostavili smo lognormalno porazdelitev vrednosti parametrov s tipičnimi vrednostmi, ki so podane v preglednici II, in koeficienti variabilnosti, ki so navedeni v preglednici XX.

Preglednica XX: Vrednosti predpostavljenih koeficientov variabilnosti (CV) za posamezen farmakokinetični parameter

farmakokinetični parameter	CV
GFR	30 %
V_1	15 %
Q	30 %
V_2	30 %

Za posamezne protokole vzorčenja smo za vsako od desetih tipičnih kliničnih situacij s programom izvedli po petsto populacijskih simulacij z upoštevanjo predpostavljene rezidualne napake in interindividualno variabilnostjo. Krivulje smo analizirali in iz njih izračunali ocene očistkov z metodo ML. Določili smo natančnost ocene (RMSE) za posamezne načine vzorčenja in jih primerjali. Primerjavo natančnosti ocen očistkov, pridobljenih z metodo ML, glede na vrsto in vrednost predpostavljene rezidualne napake in glede na protokol vzorčenja krvi za osebe P1, P2, P3, P4 in P5 prikazuje preglednica XXI, za osebe P6, P7, P8, P9 in P10 pa preglednica XXII.

Preglednica XXI: Vrednosti RMSE ocen očistkov, pridobljene z uporabo optimiziranega protokola vzorčenja in protokola vzorčenja iz navodil za uporabo sinistrina ob upoštevanju različnih rezidualnih napak in IIV pri hipotetičnih pacientih P1, P2, P3, P4 in P5

			P1	P2	P3	P4	P5
rezidualna napaka	časi vzorčenja	RMSE [ml/min]					
onalna	2 %	optimizirani	17,0252	26,1645	4,6195	5,0915	0,4257
		iz navodila za uporabo	10,0678	12,7029	11,4579	2,9301	8,2256
	5 %	optimizirani	5,3195	4,5937	2,1400	1,4621	1,1757

		iz navodila za uporabo	36,3190	3,7818	22,0098	6,2092	12,1594
	10 %	optimizirani	6,9447	6,6065	3,3646	3,3902	2,8430
		iz navodila za uporabo	53,9449	9,8565	27,5276	13,3082	14,5232
kombinirana	2 mg/l + 0,005·S _{Cr} [mg/l]	optimizirani	4,6250	15,6564	1,4512	3,7446	0,4892
		iz navodila za uporabo	17,4664	15,6538	10,7862	6,7211	7,3719
	10 mg/l + 0,02·S _{Cr} [mg/l]	optimizirani	27,2695	58,3729	6,6621	15,6727	2,2368
		iz navodila za uporabo	53,2635	48,7489	25,6132	21,3955	13,5872

Preglednica XXII: Vrednosti RMSE ocen očištkov, pridobljene z uporabo optimiziranega protokola vzorčenja in protokola vzorčenja iz navodil za uporabo sinistrina ob upoštevanju različnih rezidualnih napak in IIV pri hipotetičnih pacientih P6, P7, P8, P9 in P10

			P6	P7	P8	P9	P10
rezidualna napaka	časi vzorčenja	RMSE [ml/min]					
proporcionalna	2 %	optimizirani	2,0422	0,6422	0,2937	1,0057	0,4563
		iz navodila za uporabo	1,7621	2,9998	6,1571	1,7793	2,9731
	5 %	optimizirani	0,8634	0,9807	0,7389	1,1197	1,2821
		iz navodila za uporabo	4,2608	6,7329	9,2144	3,8762	5,5145
	10 %	optimizirani	3,1392	3,4672	1,7866	2,2058	2,7736
		iz navodila za uporabo	7,4910	10,1137	10,9761	5,8765	8,2800
kombinirana	2 mg/l + 0,005·S _{Cr} [mg/l]	optimizirani	0,6296	1,1147	0,3028	0,4681	0,8513
		iz navodila za uporabo	2,2131	4,8340	5,6887	2,0407	3,9704
	10 mg/l + 0,02·S _{Cr} [mg/l]	optimizirani	3,3464	4,9170	1,5988	2,0312	3,3553
		iz navodila za uporabo	7,6975	10,8429	10,2397	5,6636	9,0078

5 RAZPRAVA

Osredotočili smo se na nekaj tipičnih primerov ledvičnih bolnikov v klinični praksi. Še posebej nas je zanimalo stanje njihove ledvične funkcije in morebitna prisotnost hipervolemije. Pri bolnikih z zelo slabo ledvično funkcijo namreč pogosto prihaja do zastajanja telesnih tekočin (hipervolemije in edemov), kar se kaže v spremenjeni farmakokinetiki učinkovin zaradi povečanja volumna porazdelitve. Povečan volumen distribucije in/ali nizka GFR lahko privedeta do podaljšanja razpolovnega časa sinistrina, v tem primeru pa je lahko vprašljiva natančnost ocene GFR. Pri takšnih bolnikih se pojavi potreba po podaljšanju intervala vzorčenja krvi za izboljšanje ocene ledvične funkcije.

Za osnovni strukturni model smo si izbrali dvoprostorni model, ki kar najbolje opiše farmakokinetiko sinistrina. Za vseh deset predpostavljenih kliničnih situacij smo s pomočjo programa simulirali farmakokinetične profile po hipotetični aplikaciji sinistrina v obliki enkratne bolus injekcije. S simulacijo smo pokazali, da je plazemska krivulja zdravega človeka strma, v primeru nefrotskega sindroma s hipervolemijo je krivulja plazemske koncentracije položnejša, v primerjavi z zdravim človekom pa se tudi kasneje lomi. S slabšanjem ledvične bolezni od tretje do četrte stopnje KLB pa vse do odpovedi ledvic plazemske koncentracije sinistrina s časom vse počasneje padajo, krivulja pa postaja vse bolj položna. Znotraj iste stopnje KLB se profil z večanjem volumna stranskega prostora (ob konstantnem očistku) kasneje lomi, kar pomeni, da moramo proporcionalno podaljšati jemanje krvnih vzorcev in tako zagotoviti pravilno oceno distributivne in eliminativne faze.

V navodilu za uporabo sinistrina je že predpisan načrt vzorčenja krvi, in sicer v intervalih 0 (slepi vzorec), 5, 10, 15, 30, 60, 90 in 120 minut, v primeru zastajanja telesnih tekočin pa je predlagano nadaljevanje vzorčenja še vsako uro. V literaturi smo našli podatek, da naj bi vzorčenje nadaljevali do šest ur po aplikaciji sinistrina, kar pomeni, da je pacientu v tem primeru potrebno enajstkrat vzeti kri (40). Z namenom izboljšanja ocene GFR pri bolnikih s slabo ledvično funkcijo in/ali hipervolemijo smo z uporabo programskega orodja ADAPT 5 in uporabo kriterijev D-optimalnosti določili okviren optimiziran načrt vzorčenja krvi pri desetih hipotetičnih kliničnih situacijah, in sicer glede na vrsto morebitne rezidualne napake in oceno GFR. Predvideli smo, da rezidualna napaka zajema

napako pri odmerjanju sinistrina, napako pri jemanju krvnih vzorcev, intraindividualno variabilnost, napako FK strukturnega modela in modela napake ter napako analizne metode. Slednja verjetno največ pripomore k celotni rezidualni napaki, zato je najpomembnejša in moramo biti nanjo še posebej pozorni. Če predpostavimo, da to drži, lahko napako analizne metode ocenimo tekom njene validacije. Zavedati pa se je potrebno, da je dejanska rezidualna napaka nekoliko večja od predvidene.

Pri določanju optimiziranih časov vzorčenja smo se držali cilja, da bi čim bolj zmanjšali število vzorčenj in izvzeli morebitne neugodne čase ter s tem pripomogli k manjši obremenitvi pacientov in medicinskega osebja. Izkazalo se je, da so časovne točke znotraj ene vrste predpostavljene rezidualne napake primerljive ne glede na njeno vrednost.

Pripravili smo osem različnih protokolov vzorčenja za predpostavljene različne vrednosti rezidualne napake in očiščkov. V primeru predpostavljene proporcionalne rezidualne napake je novi protokol vseboval pet časov vzorčenj, v primeru kombinirane rezidualne napake pa jih je vseboval šest, in sicer ne glede na morebitno prisotnost hipervolemije. Za normovolemične paciente smo tako zmanjšali število vzorčenj za enega ali dva, pri hipervolemičnih pacientih pa kar za pet ali šest. S pomočjo farmakokinetične simulacije koncentracijskih profilov, standardne dvostopenjske analize in računanja RMSE smo preverili natančnost ocen očiščka, pridobljenih z optimiziranim načrtom vzorčenja krvi. Hkrati smo določili tudi natančnost ocen očiščka, pridobljenih s protokolom vzorčenja, prepisanim v navodilu za uporabo sinistrina. Natančnost ocen smo med seboj primerjali in opazili trend manjšanja RMSE (večanja natančnosti ocen GFR) pri uporabi optimiziranega protokola vzorčenja, četudi le to zahteva manjše število vzorcev. Izmed vseh desetih situacij omenjen trend izstopa le pri pacientu z nefrotskim sindromom, in sicer ne glede na to kakšno vrsto in vrednost rezidualne napake smo predpostavili.

V okviru standardne dvostopenjske analize smo očišček ocenjevali z uporabo dveh različnih metod, WLS in ML. Primerjali smo vrednosti ocen očiščka, pridobljene z obema metodama, in ugotovili, da metoda ML daje natančnejše ocene očiščka kot metoda WLS.

Celoten postopek simulacije profilov in njihove analize smo ponovili, vendar smo se v tem primeru bolj približali realnim situacijam, saj smo predpostavili določeno stopnjo interindividualne variabilnosti med pacienti za posamezne farmakokinetične parametre in tako v farmakokinetični model vnesli dodatno raven variabilnosti z vrednostmi

koeficientov variance posameznih parametrov. Tokrat smo očistek v okviru standardne dvostopenjske analize ocenjevali le z uporabo metode ML. Primerjali smo vrednosti RMSE, pridobljene z optimiziranim protokolom vzorčenja in protokolom iz navodila za uporabo sinistrin. Načeloma je za vse situacije, ne glede na predpostavljeno vrsto in vrednost rezidualne napake, natančnost ocene očistka večja pri uporabi optimiziranega načrta vzorčenja, vendar pa so se vseeno pokazala naslednja odstopanja:

- pri pacientih P1, P4 in P6 ter upoštevani 2 % proporcionalni rezidualni napaki je bila ocena očistkov, dobljene s predpisanim vzorčenjem, natančnejša od ocene, dobljene z optimiziranim protokolom;
- pri pacientu P2 in upoštevani 2 % ali 5 % proporcionalni rezidualni napaki ali kombinirani rezidualni napaki je bila vrednost RMSE prav tako višja v primeru uporabe novega, optimiziranega načrta vzorčenja v primerjavi s tistim iz navodila za uporabo.

V večini primerov se je naš novi protokol vzorčenja izkazal za boljšega od predpisanega. Ugotovili smo, da je pri pacientih s slabo ledvično funkcijo interval vzorčenja do šest ur po aplikaciji nekoliko prekratek. Naš optimiziran protokol, pridobljen s pomočjo kriterijev D-optimalnosti, namreč zajema čase vzorčenja tudi po dvanajstih, šestnajstih ali štiriindvajsetih urah vzorčenja. Kljub temu, da naš novi načrt jemanja vzorcev zajema manjše število vzorcev, večinoma daje boljše ocene očistkov, saj se optimiziran protokol od predpisanega v navodilu razlikuje po časovni razporeditvi vzorčenj.

Vseeno pa dobljeni rezultati niso idealni, saj v določenih primerih, sploh pri pacientu z normalno vrednostjo GFR in hujšo stopnjo hipervolemije, v navodilu predpisan protokol vzorčenja omogoča bolj natančno oceno očistka kot optimiziran protokol. Kljub vsemu predpisan protokol v tem primeru vsebuje kar enajst časov vzorčenj, kar je občutno manj od petih oziroma šestih časov vzorčenj in v tem primeru pretehta.

Določili smo torej osem različnih protokolov vzorčenja, katerega bomo uporabili pa je odvisno od vrednosti parametrov. V klinični praksi bi ledvičnemu bolniku najprej ocenili GFR, na osnovi klinične presoje pa bi nato ocenili volumen porazdelitve. Volumen porazdelitve bi lahko ocenili tudi prek meritve volumna telesnih tekočin z metodo bioelektrične impedance. Gre za enostavno in neinvazivno metodo

ocenjevanja volumna telesnih tekočin, ki je tudi dokaj poceni. Deluje na osnovi aplikacije električnih tokov skozi telo in opazovanju električnega odziva. Tkiva z visoko vsebnostjo vode in v njej raztopljenih elektrolitov dobro prevajajo električni tok in obratno; maščevje, kosti in organi, ki jih napolnjuje zrak, slabo prevajajo električni tok. Bioimpedančna analiza torej temelji na razliki v prevodnosti in dielektričnih lastnostih posameznih tkiv (41). Za izbiro ustreznega protokola vzorčenja bi predpostavili tudi rezidualno napako, in sicer na podlagi izkušenj in parametrov validacije analizne metode.

6 SKLEP

Hitrost izločanja sinistrina se pri bolnikih z zastajanjem telesnih tekočin (edemi, ascites) in/ali zmanjšanju GFR bistveno upočasni. Še zlasti pri bolnikih z visoko stopnjo hipervolemije ($V_2 = 14$ l) ali $GFR \leq 15$ ml/min je potrebno kri vzorčiti dlje časa, vsaj nadaljnjih štiriindvajset ur po aplikaciji, kar je precej dlje od šestih ur, ki so predpisane v navodilu za uporabo sinistrina. Le v tem primeru namreč natančno ocenimo tako kinetiko porazdelitve kot tudi eliminacije sinistrina.

Za primerjavo; pri bolniku z zelo slabo ledvično funkcijo, z oceno GFR med 15 in 7 ml/min, in zmerno ali hudo stopnjo hipervolemije, v navodilih naveden načrt vzorčenja predpisuje jemanje vzorcev po 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 in 360 minutah, nov protokol vzorčenja pa predpisuje vzorčenje po 5, 40, 135, 200 in 1440 minutah ali 5, 35, 120, 160(180), 200, 960 in 1440 minutah, odvisno od vrste predpostavljene rezidualne napake (proporcionalna ali kombinirana). V novem načrtu vzorčenja je torej bistveno podaljšan čas jemanja krvnih vzorcev, saj je zadnje vzorčenje predpisano po štiriindvajsetih urah od aplikacije. S tem bistveno izboljšamo natančnost meritve plazemske koncentracije sinistrina, saj le-ta že doseže stacionarno stanje.

V večini primerov smo z novim načinom vzorčenja bistveno zmanjšali napako v oceni očistka. Natančnost smo najbolj izboljšali v primeru zdrave osebe ob predpostavljeni 10 % proporcionalni rezidualni napaki, in sicer za 87,13 %. Najmanj se je izboljšala pri bolniku z odpovedjo ledvic in zmerno stopnjo hipervolemije, in sicer za 43,48 %. V določenih primerih se natančnost ocene očistka ni izboljšala. Menimo, da je kljub vsemu to posledica velike razlike v številu vzorčenj. Novi režim vzorčenja krvi torej ni absoluten, zato je v določenih primerih še vedno smiselno povečati število krvnih vzorcev.

7 LITERATURA

1. Swedish Council on Health Technology Assessment: Methods to estimate and measure renal function (Glomerular filtration rate). Systematic Review. Report no. 214. 2013: 7.
2. Koeppen BM, Stanton BA: Berne and Levy Physiology, sixth edition, Mosby, Philadelphia, 2008: 557-558.
3. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, druga izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 184-192.
4. Rowland M, Tozer TN: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics, Concepts and applications, fourth edition, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011: 415.
5. Bevc S, Ekart R, Gorenjak M, Hojs R, Puklavec L: Ocena glomerulne filtracije – primerjava serumskega kreatinina, serumskega cistatina C in enačb za izračun očistka kreatinina. Zdrav Vestn. 2006; 75: 455-462.
6. Zveza društev ledvičnih bolnikov Slovenije. Kronično ledvično bolezen lahko upočasnimo. <http://www.zveza-dlbs.si/upocasnimo.html>. Dostopano: 15.10.2014.
7. Bedrač SM, Kuželički NK, Mlinar B, Ostanek B, Trošt Z: Vaje iz klinične kemije II: študijsko gradivo, prenovljena izdaja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 6-9.
8. Cleveland Clinic, Center for Continuing Education. Kidney function assessment by creatinine-based estimation equations. <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/nephrology/kidney-function/Default.htm>. Dostopano: 8.5.2015.
9. Bevc S, Hojs R, Kanič V, Penko M: Prevalenca kronične ledvične bolezni pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom. Zdrav Vestn. 2007; 76: 151-157.
10. Botev R, Cirillo M, Couchoud C, De Santo NG, Fauvel JP, Lee N, Mallié J, Schück O, Wetzels JF: Estimating glomerular filtration rate: Cockcroft-Gault and

- Modification of Dies in Renal Disease formulas compared to renal inulin clearance. Clin J Am Soc of Nephrol. 2009; 4(5): 899-906.
11. Drogenik P, Grabnar I: Prilaganje odmerkov pri ledvični odpovedi. Golniški simpozij 2013, Golnik, 2013. Klinična farmacija: Usklajevanje zdravljenja z zdravili: Golniški simpozij 2013, Golnik, 26. september 2013: zbornik prispevkov. Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. 2013: 13-24.
 12. Castro AF 3rd, Coresh J, Eggers P, Feldman HI, Greene T, Kusek JW, Levey AS, Schmid CH, Stevens LA, Van Lente F, Zhang Y: A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med. 2009; 150(9): 604-612.
 13. National Kidney Disease Education Program. Estimating GFR. <http://nkdep.nih.gov/lab-evaluation/gfr/estimating.shtml>. Dostopano: 4.11.2014.
 14. Beck GJ, Coresh J, Eggers PW, Froissart M, Greene T, Hamm LL, Levey AS, Lewis JB, Mauer M, Navis GJ, Schmid CH, Steffes MW, Stevens LA, Zhang YL: 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 m². Am J Kidney Dis. 2010; 56(3): 486-495.
 15. Blauw GJ, de Craen JMA, den Elzen WPJ, Rabelink TJ, Vlasved T, Westendorp RGJ, Willems JM: Performance of Cockcroft-Gault, MDRD, and CKD-EPI in estimating prevalence of renal function and predicting survival in the oldest old. BMC Geriatrics. 2013; 113(13): 1471-2318.
 16. Cransberg K, Mathot RA, van Rossum LK, Vulto AG: Optimal sampling strategies to assess inulin clearance in children by the inulin single-injection method. Clin Chem. 2003; 49(7): 1170-1179.
 17. Berg UB, Bäck R, Celsi G, Halling SE, Homberg I, Krmar RT, Monemi KÅ, Öborn H, Herthelius M: Comparison of plasma clearance of iohexol and urinary clearance of inulin for measurement of GFR in children. Am J Kidney Dis. 2011; 57(1): 55-61.

18. Levey AS, Stevens LA: Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20 (11): 2305-2313.
19. Bastost MG, Brito DJ, França AK, Neves FA, Salgado JV, Salgado NF, Santos EM: Monitoring renal function: measured and estimated glomerular filtration rates – a review. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43(6): 528-536.
20. Amuchastegui CS, Daina E, Gaspari F, Guerini E, Mosconi L, Perico N, Remuzzi G, Ruggeneti P: A Plasma clearance of nonradioactive iohexol as a measure of glomerular filtration rate. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6(2): 257-263.
21. Baigent C, Barron J, Dockrell ME, Emberson JR, Landray MJ, Mafham MM, Niculescu-Duvaz I: A practical method of measuring glomerular filtration rate by iohexol clearance using dried capillary blood spots. *Nephron Clin Pract.* 2007; 106(3): 104-112.
22. Estelberger W, Holzer H, Horn S, Mauric A, Petek W, Poggitsch H, Zitta S: Determination of the glomerular filtration rate by identification of sinistrin kinetics. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry.* 1995; 33(4): 201-209.
23. Kaplan-Pavlovič S, Pajek J: Raziskovalni in klinični pomen merjenja ledvične funkcijske rezerve. *Zdrav vestn.* 2002; 71: 467-470.
24. Fresenius Kabi. Summary of Product Characteristics. http://fresenius-kabi.at/en/files/4.2.3.Inutest_SPC_2011.pdf. Dostopano: 25.11.2014.
25. Fresenius Kabi. Sinistrin/Inutest®. <http://fresenius-kabi.at/en/4519.htm>. Dostopano: 25.11.2014.
26. Estelberger W, Müller T, Oettl K, Payerl D, Reibnegger G, Zitta S: Quantitative analysis of sinistrin in serum with high-performance liquid chromatography for renal function testing. *Anal Biochem.* 2004; 331(1): 183-188.
27. Estelberger W, Meinitzer A, Reibnegger G, Rosenkranz AR, Schrabmair W, Wagner D, Zitta S: Glomerular filtration rate (GFR) determination via individual kinetics of the inulin-like polyfructosan sinistrin versus creatinine-based population-

- derived regression formulae. *BMC Nephrology*. 2013; 14: 159.
28. Blouin RA, DiPiro JT, Pruemer JM, Spruill WJ, Wade WE: *Concepts in Clinical Pharmacokinetics*, Fifth edition, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, Maryland, 2010: 73-86.
 29. Han T, Kaneda K, Yamashita S: Population pharmacokinetic of propofol bolus administered in patients with major burns. *Burns*. 2010; 36(8): 1215-1221.
 30. D'Argenio DZ, Schumitzky A: A program package for simulation and parameter estimation in pharmacokinetics. *Computer programs in biomedicine*. 1979; 9(2): 115-134.
 31. Hedaya MA: *Basic pharmacokinetics*, second edition, CRC Press, Boca Raton 2007: 517-518.
 32. D'Argenio DZ, Schumitzky A, Wang X: *ADAPT 5 User's Guide: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic systems analysis software*, Release 4, Biomedical Simulations Resource, Los Angeles 2009: 1-233.
 33. Bogataj M, Grabnar I, Kerec M, Mrhar A, Primožič S: *Vaje iz biofarmacije s farmakokinetiko: Skripta, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana*, 2001: 46-55.
 34. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Mrhar A: *Farmakokinetični modeli: osnove, vrsta, uporaba*: [http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Osnove klini%C4%8Dne farmakokinetike/Pr edavanja/Modeli.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Osnove_klini%C4%8Dne_farmakokinetike/Pr edavanja/Modeli.pdf). Dostopano 12.2.2015
 35. Bonate PL: *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation*, second edition, Springer, New York 2011: 125-307.
 36. *Engineering Statistics Handbook. D-Optimal designs*. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri521.htm>. Dostopano: 7.3.2015.
 37. Triefenbach F: *Design of experiments: The D-optimal approach and its implementation as a computer algorithm*, Bachelor's thesis in information and communication technology, Umea University & South Westphalia University of

-
- applied science 2008: 10-22.
38. Ette EI, Williams PJ: Population pharmacokinetics II: estimation methods. *Ann Pharmacother.* 2004; 38(11): 1907-1915.
 39. Hyndman RJ, Koehler AB: Another look at measures of forecast accuracy. *International journal of forecasting.* 2006; 22(4): 679-688.
 40. Appenzeller M, Belaz N, Bertschi AP, Biollaz J, Buclin T, Burnier M, Decostered LA, Sechaud R: Estimation of glomerular filtration rate by sinistrin clearance using various approaches. *Renal Failure.* 1998; 20(2): 267-76.
 41. Hart FX: Bioimpedance in the clinic. *Zdrav Vestn.* 2009; 78: 782-790.