

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽANA NOVAK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ŽANA NOVAK

**DOLOČANJE KONCENTRACIJ JOHEKSOLA V POSUŠENIH
KRVNIH MADEŽIH PODGAN ZA OCENO HITROSTI
GLOMERULNE FILTRACIJE**

DETERMINATION OF IOHEXOL CONCENTRATION IN RAT DRIED BLOOD
SPOTS FOR ESTIMATION OF GLOMERULAR FILTRATION RATE

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Iskrena zahvala gre izr. prof. dr. Mojci Kerec Kos, mag. farm. za mentorstvo pri izdelavi magistrske naloge. Hvala za prijaznost, koristne nasvete in strokovno pomoč. Hvala tudi vsem sodelavcem Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Hvala dr. Katji Čvan Trobec, mag. farm. za vso pomoč in nasvete.

Za podporo skozi ves študij se zahvaljujem svoji družini, prijateljem in Janu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

Žana Novak

Ljubljana, 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Ledvična funkcija	1
1.2	Joheksol	2
1.2.1	Joheksol kot kontrastno sredstvo	3
1.2.2	Uporaba joheksola za določanje GFR	4
1.2.3	Farmakokinetika joheksola	5
1.2.4	Plazemski očistek joheksola za določanje GFR	6
1.2.5	Joheksol in živalski modeli	7
1.3	Metoda posušenega krvnega madeža pri živalskih modelih	8
1.4	Kaheksija in ledvična funkcija	10
2	NAMEN DELA	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	Materiali	15
3.1.1	Biološki material - kri	15
3.1.2	Standardi	15
3.1.3	Reagenti in topila	15
3.1.4	Naprave in pribor	16
3.2	Metode	17
3.2.1	Priprava osnovnih raztopin, topil in pufrov	17
3.2.2	Priprava standardnih DBS vzorcev	18
3.2.3	HPLC metoda	20
3.2.4	Optimizacija ekstrakcije DBS vzorcev	22
3.2.5	Analiza realnih DBS vzorcev	23
3.2.6	Izračun očistka joheksola	25
3.2.7	Vrednotenje rezultatov	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1	HPLC metoda	27
4.2	Optimizacija ekstrakcije DBS vzorcev	31

4.3	Analiza realnih DBS vzorcev	33
5	SKLEPI.....	43
6	LITERATURA	44

POVZETEK

Najboljši diagnostični kriterij za oceno ledvične funkcije je hitrost glomerulne filtracije. Ledvično funkcijo lahko preverjamo z eksogenim označevalcem joheksolom, saj je njegov očistek proporcionalen hitrosti glomerulne filtracije.

Namen magistrske naloge je bil določiti koncentracije joheksola v posušenih krvnih madežih, ki smo jih dobili iz *in vivo* študije na podganah in iz koncentracij joheksola oceniti hitrost glomerulne filtracije pri zdravih podganah, podganah z razvitim tumorjem in pri podganah, ki so razvile rakavo kaheksijo, kjer gre za nenamerno izgubo telesne mase, ki se pojavi kot posledica pridružene kronične bolezni, kot je npr. rak.

Odvzemi krvi so potekali v šestih časovnih točkah po enkratni intravenski aplikaciji joheksola na dan 0 (zdrave podgane), dan 5 (podgane z razvitim tumorjem) in dan 10 (podgane z razvito rakavo kaheksijo). Koncentracijo joheksola v posušenem krvnem madežu podgan smo določali z že predhodno razvito in validirano analizno metodo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in UV detekcijo. Ekstrakcija učinkovine je vključevala obarjanje proteinov s perklorno kislino. Pri optimizaciji ekstrakcije je bilo potrebno zagotoviti ustrezen pH supernatanta, kar smo dosegli z dodatkom 170 μL 2,5 % perklorne kisline pred ekstrakcijo in 50 μL 2,5 % amonijaka po ekstrakciji. Območje linearnosti naše metode je bilo od 25 do 500 $\mu\text{g/mL}$. Iz koncentracij joheksola v krvi smo na osnovi enoprostornega farmakokinetičnega modela izračunali ustrezne konstante hitrosti izločanja joheksola in njegov volumen porazdelitve, pri izračunu očistka joheksola pa smo upoštevali Bröchner – Mortensenov popravek.

Pri podganah z rakom sta bila volumen porazdelitve in očistek joheksola značilno povečana glede na zdrave podgane. Pri podganah z razvito rakavo kaheksijo se je konstanta hitrosti izločanja joheksola značilno zmanjšala v primerjavi z zdravimi podganami, medtem ko zmanjšanje očistka joheksola in povečanje volumna porazdelitve ni bilo statistično značilno. Vzrok je lahko v majhni velikosti vzorca ter veliki interindividualni variabilnosti farmakokinetičnih parametrov joheksola. Metoda posušenega krvnega madeža se je izkazala za uporabno in zanesljivo metodo pri določanju koncentracij joheksola za oceno hitrosti glomerulne filtracije.

ABSTRACT

The best diagnostic criteria for assessment of renal function is the glomerular filtration rate. Iohexol was chosen as a exogenous marker for renal function assessment as its clearance is proportional to the glomerular filtration rate.

The aim of this thesis was to evaluate the iohexol concentration in dried blood spots, which were obtained from *in vivo* study in rats, and to estimate glomerular filtration rate based on iohexol concentrations in healthy rats, in rats after the development of cancer and in rats after occurrence of cachexia. Cachexia is a process of unintentional weight loss caused by underlying chronic disease like cancer.

Blood was withdrawn in six time points after single intravenous dose of iohexol on day 0 (healthy rats), day 5 (rats with cancer) and day 10 (rats with cancer cachexia). Iohexol concentration in dried blood spots was determined by previously developed and validated HPLC–UV method. Extraction included protein precipitation by adding perchloric acid. It was necessary to optimize the extraction to provide appropriate pH of the supernatant, which was achieved by the addition of 170 μL 2.5 % perchloric acid prior to extraction and 50 μL 2.5 % ammonia, after the extraction. The method was linear from 25 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Blood iohexol concentrations using one-compartment pharmacokinetic model were used for estimaton of iohexol elimination rate constant, volume of distribution and clearance. Iohexol clearance was corrected according to the method of Bröchner–Mortensen.

Iohexol clearance and volume of distribution in rats with cancer were significantly increased in comparisson to healthy rats. Iohexol elimination rate constant in rats with cancer cachexia was significantly decreased compared to healthy rats. Furthermore, we did not reached statistical significance according to decrease in iohexol clearance and volume of distribution. The cause may be small sample size and interindividual variability of iohexol pharmacokinetic parameters. The method of dried blood spots proved to be useful and reliable method for determination of iohexol for estimation of glomerular filtration rate.

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC – površina pod kromatografskim vrhom

Cl_{joheksol} – očistek joheksola

Cl_{joheksol BM} - očistek joheksola z Bröchner – Mortensenovim popravkom

D0 – dan 0

D5 – dan 5

D10 – dan 10

DBS – posušen krvni madež (angl. dried blood spot)

GFR – hitrost glomerulne filtracije

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

k_{el} – konstanta hitrosti izločanja

KV – koeficient variacije

LC – tekočinska kromatografija

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

P – podgana

R² – determinacijski koeficient

RSD – relativna standardna deviacija

SD – standardna deviacija

t_r – retencijski čas

UV - ultravijolično

V_d - volumen porazdelitve

1 UVOD

1.1 Ledvična funkcija

Ocena ledvične funkcije je v klinični praksi ključnega pomena. Najboljši diagnostični kriterij je hitrost glomerulne filtracije (GFR), katera se je uveljavila kot najboljši celokupni pokazatelj stanja ledvične funkcije. Njene vrednosti so pomembne ne samo za ugotavljanje ledvičnih okvar, ampak tudi za optimalno zdravljenje oziroma prilagajanje odmerkov zdravil (1 - 4). GFR nam pove koliko krvi se prefiltrira skozi ledvične glomerule v minuti. Optimalno je določena pri standardiziranih pogojih, ki vključujejo prenehanje jemanja zdravil, predhodno postenje, pitje tolikšnih količin vode, da zagotovimo pretok urina s hitrostjo $> 1 \text{ mL/min}$ in popolno praznjenje mehurja (3).

GFR se pri ljudeh ne da izmeriti direktno (3). Ena od metod določanja GFR je določanje ledvičnega očistka izbrane spojine. Ledvični očistek je definiran kot volumen plazme, ki se v časovni enoti popolnoma očisti določene snovi pri prehodu skozi ledvice (5). Določamo ga z meritvami urinskih in krvnih koncentracij endogenih ali eksogenih označevalcev. Pri bolnikih z nizko GFR ($< 30 \text{ mL/min}$) ali s prisotnimi edemi je merjenje ledvičnega očistka boljše metoda za določanje GFR kot merjenje serumskih koncentracij oz. uporaba enačb za oceno GFR (3).

GFR lahko ocenimo tudi z enačbami, pri katerih uporabimo serumске koncentracije endogenih snovi (kreatinin, cistatin C) ali pa ga izračunamo posredno z urinskimi ali plazemskimi očistki eksogenih ali endogenih označevalcev (3, 4). V večini kliničnih primerov je ocena GFR izračunana z enačbami na podlagi serumskega kreatinina zadovoljiva. GFR izračunana z enačbami na podlagi serumskega kreatinina je praviloma precenjena zaradi izločanja kreatinina skozi ledvične tubule (3, 4). Ocena GFR z enačbami je lahko netočna pri ljudeh, pri katerih telesna masa zelo odstopa (debelost, anoreksija) od tiste, na podlagi katere so bile enačbe za izračun GFR razvite (1, 6). V takih primerih je posredna meritev GFR z urinskim ali plazemskim očistkom pomemben potrditveni test (1, 6). Najpogosteje se uporablja določanje očistka endogenega kreatinina, čeprav je metoda pogosto zamudna in nenatančna, predvsem zaradi 24-urnega zbiranja urina in težav z inkontinenco pri starejših ljudeh (1, 4). Normalne vrednosti pri zdravih belcih so $130 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ pri mladih moških in $120 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ pri mladih ženskah. Te

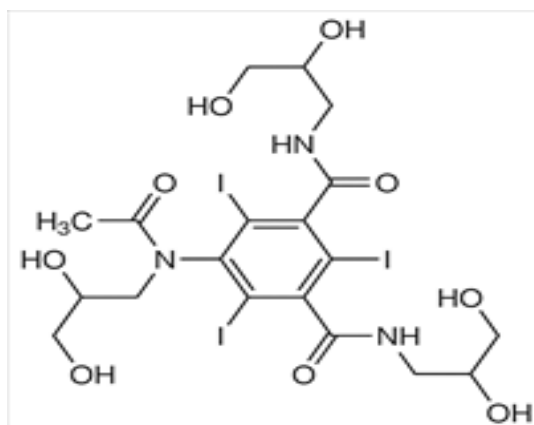
vrednosti variirajo med dnevi in na podlagi dnevnega beljakovinskega vnosa in telesne vadbe (1).

Zlati standard za merjenje ledvične funkcije je eksogeni označevalec inulin, fruktozni polimer (1, 3, 5, 6). Inulin ima vse lastnosti idealnega označevalca GFR; je inertna substanca, ki se prosto filtrira skozi ledvične glomerule, se ne reabsorbira in izloča v ledvičnih tubulih in ne škoduje ledvicam (1, 3, 6). Metoda je zahtevna in invazivna, saj vključuje jutranjo aplikacijo na tešče, neprekinjeno intravensko infuzijo, veliko odvzetih krvnih in urinskih vzorcev, pitje velikih količin vode za boljšo stimulacijo diureze in kateterizacijo mehurja za zagotovitev zajetja celotnega urina (1, 7). Metoda je v uporabi, če potrebujemo zelo natančno določitev ledvične funkcije (6, 8), a se uporablja redko zaradi visokih stroškov (pomanjkanje komercialno dostopnih odmernih oblik), potrebe po infuzijski črpalki, večkratnega zbiranja vzorcev, delovne intenzitete in zamudnosti (5, 6). Težavno postane tudi kadar so potrebne ponovne meritve (9). Zaradi teh slabosti se zatekamo k drugim eksogenim označevalcem (1, 3).

Joheksol se uporablja kot referenčni standard za določanje GFR pri različnih starostnih skupinah, tudi pri otrocih, nosečnicah in starostnikih (7, 10, 11). Študije dokazujejo zelo dobro korelacijo med GFR določeno z očistkom inulina in plazemskim očistkom joheksola (3, 5, 7, 9). V nekaterih študijah je bil očistek inulina malo manjši v primerjavi z plazemskim očistkom joheksola, predvidoma zaradi tubulne reabsorpcije joheksola ali pa njegove vezave na plazemske proteine (1).

1.2 Joheksol

Joheksol je vodotopno, neionsko, nizkoosmolarno jodirano rentgensko kontrastno sredstvo. Njegova kemijska struktura je prikazana na sliki 1. Trži se z lastniškim imenom OmnipaqueTM (12, 13). Gre za brezbarvno do blede rumeno raztopino za injiciranje s pH od 6,8 do 7,6, sterilizirano z avtoklaviranjem (12). V Sloveniji je na voljo v koncentracijah 240, 300 in 350 mg joda/mL raztopine (13), v tujini pa so na voljo tudi koncentracije 140, 180 in 210 mg joda/mL raztopine (14). Raztopino shranjujemo v temnih prostorih, saj je občutljiva na svetlobo (12).



Slika 1: Strukturna formula joheksola (5)

Molekulska masa joheksola je 821,14 g/mol, od tega je joda 46.36% (12, 14). Joheksol je zelo dobro topen v vodi, dobro topen v metanolu in skoraj netopen v diklorometanu (15). pKa joheksola je večji od 13 (13). Joheksol se uporablja kot kontrastno sredstvo in pri merjenju GFR (5).

1.2.1 Joheksol kot kontrastno sredstvo

V zdravstvenih zavodih se raztopina joheksola uporablja pri odraslih in otrocih za različne diagnostične namene (13), saj spada med jodirana kontrastna sredstva, ki se uporabljajo za rentgensko slikanje notranjih organov, krvnih žil in mehkih tkiv. Joheksol, tako kot tudi vsa ostala kontrastna sredstva, učinkovito vsrka rentgenske žarke in s tem poveča kontrast med preučevanimi telesnimi strukturami in okoliškim tkivom oziroma morebitnimi patološkimi spremembami. S tem rentgenska slika pridobi na diagnostični vrednosti (16). Način aplikacije kontrastnega sredstva je odvisen od vrste preiskave. Aplikacija je intratekalna v primeru mielografije in intravaskularna v primeru angiokardiografije, arteriografije, flebografije, urografije ali računalniške tomografije. V primeru preiskave prebavil z računalniško tomografijo je aplikacija peroralna, medtem ko je rektalna aplikacija pogosta predvsem pri preiskavah prebavil pri otrocih (12 - 14).

Kot neionsko kontrastno sredstvo povzroči manj neželenih učinkov v primerjavi s starejšimi neionskimi in z ostalimi ionskimi kontrastnimi sredstvi (7, 14), saj ima majhno osmolarnost, neželeni učinki pa naraščajo z osmolarnostjo (16). Čeprav je uporaba jodiranih kontrastnih sredstev na splošno varna (če že pride do reakcij, so le te večinoma blage), pa je vseeno možnost pojava kontrastne nefropatije oz. akutne ledvične odpovedi. Do tega najpogosteje pride pri koronarni angiografiji, perkutani koronarni intervenciji ali

računalniški tomografiji. Gre za resen zaplet, ki se v splošni populaciji pojavi v 0,6 – 2,3 % primerih, pri bolnikih z ledvičnim popuščanjem pa je pojavnost precej višja in narašča z večanjem koncentracije serumskega kreatinina tudi do 62 % (13, 16).

1.2.2 Uporaba joheksola za določanje GFR

Joheksol se izloča samo preko ledvic (delež, ki se ne izloča preko ledvic je zanemarljiv) z glomerulno filtracijo, brez tubulne sekrecije ali reabsorpcije, in se ne veže na plazemske proteine, zato je odličen označevalec za oceno GFR tako pri odraslih kot pri otrocih (1, 5, 7, 10). Določamo lahko plazemski ali urinski očistek joheksola (1).

Urinski očistek je najbolj direktna metoda za merjenje GFR in je odvisen od koncentracije označevalca v urinu, volumna urina in povprečne plazemske koncentracije označevalca. Po enkratni intravenski ali subkutani injekciji eksogenih označevalcev zbiramo urin na 20 do 30 minut, pri čemer potrebujemo 2 - 4 vzorce. Subkutana aplikacija omogoča počasnejše sproščanje označevalca v sistemski krvni obtok in bolj konstantne plazemske koncentracije. Prednosti urinskega očistka so razmeroma kratek čas postopka in možna primerjava urinskih očistkov med vzorci, saj je končni rezultat povprečje posameznih očistkov, kar izboljša kakovost rezultatov (1). V nekaterih študijah so opazili slabo povezavo med urinskim očistkom joheksola in resnično GFR, kar bi lahko bila posledica izločanja joheksola tudi po drugih poteh (ne le preko ledvic) ali neustreznega praznjenja mehurja (7). Kliničnih študij z določanjem urinskega očistka joheksola je malo (6).

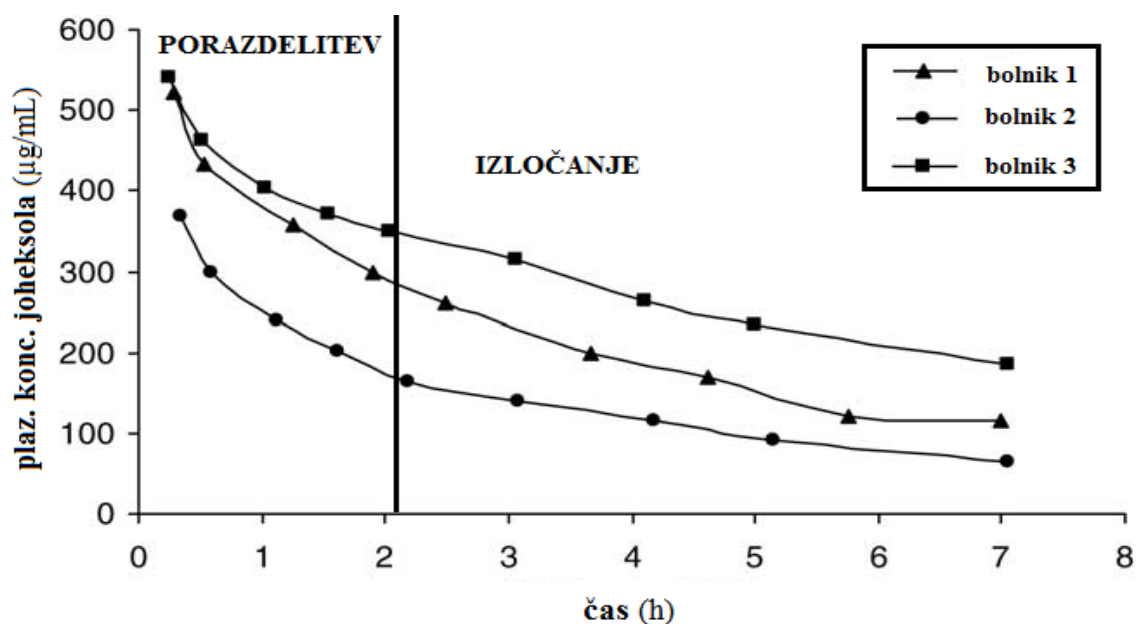
Določanje GFR na podlagi plazemskega očistka joheksola je natančna, varna in učinkovita metoda (7, 11, 17). Njegova uporaba je v porastu, še zlasti pri starejših, saj se tako izognemo nevšečnostim in napakam, ki so pogoste pri zbiranju urina (1, 9, 18). Plazemski očistek računamo kot kvocient odmerka (D) in površine pod plazemsko krivuljo (AUC) (1). Največja slabost plazemskega očistka je večkratno jemanje krvnih vzorcev, zaradi česar je ta metoda draga in zamudna, saj za vzorčenje potrebujemo približno 5 ur, da se pokrije tako porazdelitvena kot izločevalna faza joheksola v organizmu. Pri ljudeh z zelo nizko GFR se ta čas podaljša celo na 8 - 10 ur. Krajše obdobje jemanja krvnih vzorcev lahko vodi do večje izračunane vrednosti GFR. Problemi se pojavijo tudi pri ljudeh, ki imajo težave z jemanjem krvi (slabe žile) in pri ljudeh z velikim volumnom porazdelitve (npr. edemi) (1, 9, 18). Največje omejitve se nanašajo na zahtevnost in stroške določanja koncentracije joheksola v plazmi s HPLC metodo (1).

Študije dokazujejo dobro korelacijo med urinskim in plazemskim očistkom joheksola, pri ljudeh z nizko GFR pa je lahko izračunan plazemski očistek večji v primerjavi z urinskim (1). Pri nekaterih zdravstvenih stanjih, npr. pri nabiranju tekočine v trebušni votlini ali v medceličnem prostoru, je določanje urinskega očistka joheksola primernejše od plazemskega (6).

Prednosti uporabe joheksola so nizki stroški, široka dostopnost in stabilnost v bioloških tekočinah, kar omogoča varen prenos krvnih vzorcev do analiznih laboratorijev (1, 10). Pri radioloških preiskavah so potrebne 10 – 50-krat večje količine joheksola kot pri določanju GFR, a kljub temu ostaja nizko toksičen, verjetno zaradi nizke osmolarnosti in njegove zanemarljive vsebnosti prostega joda (11).

1.2.3 Farmakokinetika joheksola

Koncentracija joheksola v plazmi se po intravenski aplikaciji hitro zmanjšuje, saj joheksol difundira iz plazme v medcelični prostor (16). Sočasno poteka tudi difuzija medcelične vode (skupaj z nekaj molekulami joheksola) v plazmo, dokler se med obema prostoroma ne vzpostavi ravnotežje, ko imamo na obeh straneh podobno koncentracijo joheksola (14, 16). Ker pa se joheksol hkrati izloča iz telesa, to pomeni ponovno difuzijo joheksola iz medceličnega prostora nazaj v plazmo. Tako se koncentracija joheksola v plazmi zmanjšuje v obliki dvoeksponentne krivulje, kot je prikazano na sliki 2 (16).



Slika 2: Plazemska koncentracija joheksola v odvisnosti od časa (5)

Pri ljudeh z normalno ledvično funkcijo se ravnotežje med plazmo in medceličnim prostorom vzpostavi približno 2 uri po intravenski aplikaciji, pri zmanjšani ledvični funkciji pa po 3 urah ali več (7, 19). Joheksol ne prehaja v notranjost celic, izjema so epitelne celice ledvičnih tubulov (16). Njegova vezava na plazemske proteine je manj kot 2 %, kar je zanemarljivo oziroma klinično nepomembno (7, 13). Povprečen volumen porazdelitve je 0,17 L/kg (14). Študije na živalih kažejo, da joheksol ne prehaja krvne možganske bariere, prehaja pa verjetno skozi placento in se tudi izloča v materino mleko, a ni znano v kakšnem obsegu. Večina joheksola se izloči preko ledvic v nespremenjeni obliki (5, 14). Največjo koncentracijo v urinu doseže 1 uro po aplikaciji, pri čemer se ga približno 90 % izloči že v 24 urah (13, 14). Ostalih 10 % se iz telesa izloči relativno počasi (19). Pod fiziološkimi pogoji se le okoli 1 % joheksola izloči po neledvičnih poteh, kot so prebavila, koža, slina in solze. Izločanje preko teh poti je ponavadi povezano z zmanjšano ledvično funkcijo (16). Pri bolnikih z ledvičnimi okvarami oz. nenormalnim ledvičnim delovanjem se čas izločanja podaljša, saj lahko pride do izločanja joheksola v žolč. Odstrani se ga lahko s hemodializo (14).

1.2.4 Plazemski očistek joheksola za določanje GFR

Za opis porazdelitve in izločanja spojine iz organizma se velikokrat uporabljajo farmakokinetični modeli. Plazemski profil joheksola najbolje opišemo z dvoprostornim farmakokinetičnim modelom, ki predvideva, da joheksol po enkratni intravenski aplikaciji prehaja med osrednjim prostorom (plazma) in perifernim prostorom z večjim volumnom (medcelični prostor) in se iz osrednjega prostora tudi izloča (19). V tem primeru je plazemska koncentracija joheksola predstavljena z vsoto dveh eksponentnih členov, kjer v prvem delu prevladuje hitrejša faza porazdelitve, v drugem pa faza izločanja, ki poteka počasneje (9, 10, 16). GFR izračunamo tako, da odmerkek joheksola delimo s površino pod krivuljo (AUC). Pri tem zbiramo krvne vzorce zgodnje faze (ponavadi 2 - 3 vzorce do prve ure) in pozne faze (1 - 3 vzorci od druge ure dalje) (1). Število vzorcev lahko zmanjšamo, če za izračun vzamemo samo vzorce pozne faze izločanja oz. predpostavimo enoprostorni farmakokinetičen model joheksola. Ker ne upoštevamo zgodnje porazdelitvene faze, so izračunani očistki ob tej predpostavki večji, zato uporabimo korekcijski faktor, t.i. Bröchner – Mortensenov popravek in na ta način je izračun očistka joheksola na osnovi enoprostornega modela primerljiv izračunu na osnovi dvoprostornega farmakokinetičnega modela (1, 9, 20). Pri večini rutinskih postopkov ocenijo GFR na

podlagi dveh krvnih vzorcev v pozni fazi izločanja, vendar so meritve v primeru, da je en od dveh vzorcev netočen, lahko napačne. Pri štirih vzorcih pa lahko dosežemo veliko večjo točnost (7).

1.2.5 Joheksol in živalski modeli

Raziskave na živalih kažejo, da joheksol nima mutagenega in teratogenega potenciala. Kancerogenega učinka niso preučevali, saj uporaba joheksola ni dolgotrajna. Po intravenski uporabi pri miših in podganah ima joheksol zelo majhno akutno toksičnost za srce, ožilje in živčevje. Večkratno odmerjanje joheksola so podgane in opice dobro prenašale. Farmakološke študije varnosti pri podganah, kuncih in psih so pokazale, da zdravilo Omnipaque nima značilnih učinkov na srčno-žilni ali osrednji živčni sistem (13).

Objavljenih je kar nekaj študij, kjer določajo GFR s pomočjo joheksola na različnih živalih, kot so prašiči, ovce, psi, mačke, konji in osli (21 - 27). Določanje GFR pri živalih poteka z majhnim številom krvnih vzorcev ter brez potrebe po vzorčenju urina (26). Poleg tega pa je izredno pomembno, da se zaradi stabilnosti joheksola lahko plazemske vzorce (21, 25) zamrzne za nekaj tednov oz. se jih nato pošlje do ustreznih laboratorijev. To poenostavi celoten postopek določanja GFR in je priročno predvsem pri manjših živalih (21, 22, 24). Pri uporabi joheksola je možen pojav akutne nefrotoksičnosti, čeprav slednja ni bila dokumentirana še v nobeni študiji na živalskih modelih. Na splošno v študijah na psih, mačkah, konjih in oslih niso ugotovili nobenih neželenih učinkov joheksola, zato se joheksol smatra za varnega in živalim prijaznega (21, 26).

Veliko študij se osredotoča na primerjavo očistka joheksola določenega s predpostavko enoprostornega oz. dvoprostornega farmakokinetičnega modela. Rezultati so primerljivi, saj se je Bröchner – Mortensenov korekcijski faktor, razvit za enoprostorni model pri ljudeh, izkazal za primerne tudi pri živalih (22, 23, 28). Farmakokinetične študije kažejo, da se pri podganah 95 % celotnega joheksola izloči z urinom in 5 % z blatom, pri psih pa 98 % z urinom in 1 % z blatom (23). Ugotavljali so tudi najmanjše število plazemskih vzorcev, ki še zagotavljajo natančne rezultate in sicer naj bi pri psih zadostovali trije vzorci, medtem ko so pri mačkah za rezultate primerljive s plazemskim očiščkom eksogenega kreatinina zadostovali dva oz. štirje vzorci (25).

Največji problem predstavlja dejstvo, da pri živalih ni določenih referenčnih mej za normalno GFR, kar je verjetno vzrok za razlike v protokolih za merjenje plazemskih oz.

urinskih očistkov z označevalci ledvične funkcije in sicer v časovnih točkah vzorcev in uporabljenih farmakokinetičnih modelih za izračun GFR. Problemi nastanejo tudi zaradi vpliva neledvičnih faktorjev na GFR, kot so spol, starost, pasma ter dnevni vnos beljakovin (25). S tem je otežena primerjava rezultatov tako med študijami kot med različnimi laboratoriji (22, 25). Kljub temu pa eno samo referenčno območje za normalno GFR verjetno ne bo zadovoljivo za vse živali, zaradi razlik v pasmi in starosti (25). Veliko težav v veterinarski praksi bi se odpravilo z uvedbo standardnega protokola za določitev GFR z uporabo joheksola (28).

1.3 Metoda posušenega krvnega madeža pri živalskih modelih

Metoda posušenega krvnega madeža (DBS; angl. dried blood spots) je tehnika vzorčenja krvi za kvantitativno analizo malih molekul, ki je bila prvič predstavljena leta 1963. Metoda DBS je v porastu in je alternativa tradicionalnim metodam vzorčenja krvi v farmakokinetičnih in toksikokinetičnih študijah zdravil (29 - 31). Gre za vzorčenje, pri katerem kapljice polne krvi kanemo na ustrezen filter papir (DBS kartica), počakamo da se posušijo in jih nato shranimo v neprepustne plastične vrečke skupaj s sušilnim sredstvom, ki preprečuje prisotnost vlage. Tako zagotovimo kakovost vzorcev. Posušene vzorce lahko do zelenih analiznih laboratorijev pošljemo kar v kuverti po navadni pošti, brez posebnih zahtev (29). Najbolj učinkovita metoda v smislu minimalnega volumna odvzete krvi je uporaba steklenih kapilar (10 - 20 μ L), ki so v notranjosti predhodno poškropljene z antikoagulantom EDTA. Alternativa je uporaba polavtomatskih pipet, s katerimi odpipetiramo majhen volumen krvi (npr. 20 μ L) na DBS kartico. Za primerjavo, tradicionalno vzorčenje zahteva 0,3 - 0,5 mL krvi živali za pridobitev 0,15 - 0,25 mL seruma oz. plazme za analizo (32). DBS vzorčenje predstavlja primerno metodo za farmakokinetične študije pri podganah in miših, še posebej v primeru zaporednega vzorčenja pri isti živali (33, 34). Ker ta pristop zmanjša število živali, posledično zmanjša tudi stroške izvedbe raziskave (29, 34). Čeprav se DBS nanaša na vzorce krvi, pa je metoda primerna za večino bioloških tekočin (31). Pred analizo DBS vzorcev moramo biti pazljivi na velikost in obliko madežev, združene madeže, zamazane madeže, poškodbe kartice in na prisotnost strdkov oz. hemolize eritrocitov (32).

Prednosti DBS metode pri živalskih modelih so (29 - 35):

- majhni volumni enkratnega odvzema krvi (10 - 20 μ L),
- manjše število potrebnih živali,
- boljša kakovost podatkov; metoda omogoča, da določimo celoten toksikokinetični profil v krvi enega samega glodavca, kar omogoča oceno interindividualne variabilnosti med posameznimi živalmi,
- majhni stroški pošiljanja in shranjevanja vzorcev; ni potrebno zamrzovanje vzorcev, ampak zadošča sobna temperatura,
- boljša stabilnost v primerjavi z zamrznjenimi vzorci,
- poenostavljeni postopki; ni centrifugiranja za ločitev plazme/seruma,
- manj povzročene stres pri glodavcih in neglodavcih v primerjavi z večjimi volumni odvzema krvi (0,3 – 0,5 mL).

Uporaba živalskih modelov je v predkliničnih študijah za pridobitev toksikokinetičnih podatkov žal nepogrešljiva, kljub temu pa stremimo k osnovnemu načelu 3R (32, 34). 3R koncept pomeni zamenjati (angl. replacement) uporabo živali v raziskavah z drugo sprejemljivo metodo brez uporabe živali, zmanjšati (angl. reduction) število živali v raziskavah na najmanjše možno ter izboljšati (angl. refinement) oskrbo, nastanitev in izvedbo postopkov, da so živali v raziskavah izpostavljene najmanjšemu možnemu potencialnemu trpljenju (36). Metoda DBS v skladu s 3R konceptom zmanjša število glodavcev in izboljša način odvzema vzorcev krvi, tako pri glodavcih (miši in podgane) kot neglodavcih (zajci, psi, nehumani primati). K temu doprinese manjši volumen odvzete krvi in uporaba fine igle, ki povzroči manjšo rano. Vse to posledično povzroči manj stresa pri živali (32).

Živali pred DBS vzorčenjem postavijo v ogrevan prostor, da sprožijo vazodilatacijo ven, pri čemer je ta čas pri glodavcih precej krajši kot pri neglodavcih in posledično manj stresen. Pri vseh neglodavcih je potrebno predhodno britje predela vzorčenja. Za DBS vzorčenje pri zajcih uporabijo ušesno veno, pri glodavcih repno veno in pri psih in nehumanih primatih veno zgornjega uda (32).

Metoda DBS pa ima tudi nekaj slabosti. Zaradi majhnih volumnov odvzete krvi in posledično nizkih koncentracij učinkovine je nujna uporaba visoko občutljivih in specifičnih analiznih metod, kar lahko predstavlja visoke stroške (37). Ker imamo živalske

vzorci, je možna kontaminacija z izločki ali hrano (35). Pride lahko tudi do kontaminacije iz zraka, saj se vzorci sušijo do nekaj ur. Z DBS tehniko lahko določamo le učinkovine, ki so stabilne na zraku in niso hlapljive ali vnetljive (38). DBS vzorci so vzorci polne krvi, zato zahtevajo previdno ekstrakcijo, saj imamo v primerjavi s plazemskimi vzorci prisotne krvne celice, ki lahko interferirajo z našo substanco oz. vplivajo na njeno porazdelitev. Glavna vprašanja, ki se porajajo pri uporabi DBS metode in pri katerih je potrebna dodatna obravnava so vpliv volumna krvi, vpliv uporabe steklene kapilare oz. pipete, optimizacija ekstrakcije in izbira ustrezne DBS kartice (29). Hematokrit je volumski delež eritrocitov v krvi in lahko močno vpliva na kakovost, ponovljivost in zanesljivost rezultatov. Viskoznost krvi je linearna z vrednostjo hematokrita, kar pomeni da vpliva na porazdelitev kaplje oz. na širjenje in oblikovanje lise krvi na filter papirju, homogenost madežev in čas sušenja (39, 40). Večji hematokrit bo zaradi večje viskoznosti krvi povzročil manjši madež krvi, kjer bo kri bolj skoncentrirana (39). Vplivu hematokrita se lahko izognemo z izrezovanjem in analiziranjem celotnega madeža krvi, saj s tem odstranimo napake v povezavi z različnim širjenjem in nehomogenostjo madežev krvi. Najpomembnejši parameter pri tem pa je natančnost volumna krvi pri nanosu na DBS kartico, kar lahko dosežemo z uporabo kalibriranih pipet, s katerimi definiramo in zagotovimo enak volumen krvi vseh vzorcev (39, 40).

1.4 Kaheksija in ledvična funkcija

Kaheksija je proces nenamerne izgube telesne mase, ki se pojavi kot posledica dolgotrajne aktivacije obrambnih mehanizmov zaradi pridružene kronične bolezni kot so npr. rak, kronično srčno popuščanje in kronična obstruktivna pljučna bolezen (41 - 43). Glavni klinični znak je izguba telesne mase pri odraslih oziroma zmanjšana rast pri otrocih (43, 44). Klinična opredelitev kaheksije je prikazana v preglednici I. Gre za javno zdravstveni problem, saj jo povezujejo z visoko stopnjo obolevnosti in umrljivosti. Prevalenca kaheksije pri kroničnih boleznih srca in pri kronični obstruktivni pljučni bolezni je 5 – 15 % in pri bolnikih z napredovanim rakom 60 – 80 %. Ugotovljeno je bilo, da naj bi imelo 50 % bolnikov z rakom ob smrti prisotne znake kaheksije (44, 45). Izguba mišične mase pri kaheksiji je v primerjavi z normalnim stradanjem hitrejša in obsežnejša, poleg tega pa pri kaheksiji za povečanje telesne mase in za uspešno ozdravljenje ne zadošča samo zadosten vnos hrane (43). Študije kažejo, da pri že razviti kaheksiji niti enteralna ali parenteralna prehrana ne izboljšata simptomov ali podaljšata življenja (46).

Preglednica I: Klinična opredelitev kaheksije (Washington, 2008) (43, 44, 45, 47)

OSNOVNO MERILO		3 OD 5 DODATNIH MERIL
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Prisotnost kronične bolezni ▪ Izguba vsaj 5 % telesne mase v zadnjih 12 mesecih ali manj <li style="text-align: center;">ali indeks telesne mase pod 20 	+	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zmanjšana mišična moč ▪ Utrujenost ▪ Anoreksija ▪ Nizek indeks puste telesne mase ▪ Patološki izvidi biokemijskih preiskav: <ul style="list-style-type: none"> ▪ zvišanje vnetnih kazalcev: <ul style="list-style-type: none"> CRP > 5,0 mg/l, IL-6 > 4,0 pg/mL ▪ anemija: hemoglobin < 120 g/l ▪ hipoalbuminemija: albumini < 32 g/l

CRP...C-reaktivni protein; IL-6...interlevkin 6

Sindrom kaheksije poteka progresivno in je kontinuiteta treh faz; prekaheksije, kaheksije in refraktarne kaheksije, vendar ni nujno, da vsi bolniki izkusijo vse stadije. Stadiji rakave kaheksije so prikazani v preglednici II. Resnost stanja določimo glede na stopnjo izčrpnosti energetskih zalog in telesnih beljakovin v kombinaciji s stopnjo izgube telesne mase (44, 48). Določitev stadija kaheksije je izhodišče za različne ukrepe. To še posebej velja za stanje prekaheksije, kjer je možno zgodnje zdravljenje simptomov in posledično preprečevanje nadaljnega razvoja kaheksije. To se je izkazalo za izredno učinkovito, saj skupaj z boljšo obravnavo kaheksije vplivamo tudi na uspešnejše zdravljenje osnovne bolezni (44). Cilji zdravljenja so povečanje telesne mase, predvsem na račun skeletne mišičnine, ali vsaj njeno ohranjanje brez dodatne izgube mišične mase.

Glavna patofiziološka lastnost kaheksije je negativna beljakovinska in energetska bilanca skupaj z zmanjšanim vnosom hranil in presnovnimi spremembami (48). Natančni vzroki in mehanizmi kaheksije še niso poznani, vendar naj bi nastali zaradi presnovnih, hormonskih ali citokinskih dejavnikov (41, 42, 49). Citokini so beljakovinske molekule, ki jih sproščajo limfociti in makrofagi in imajo glavno vlogo pri vnetnem odzivu (50 - 52). Izguba telesne mase je posledica izgube tako maščobnega kot mišičnega tkiva in vključuje zmanjšano delovanje faktorjev za izgradnjo mišične mase (anaboliki) in/ali povečano delovanje faktorjev za razgradnjo mišične mase (kataboliki) (41, 50, 51, 52). Povečan je bazalni

metabolizem maščob, ogljikovih hidratov in beljakovin, pri čemer naj bi kronično vnetje igralo glavno vlogo (41, 49). Kljub temu, da so povečane serumske koncentracije citokinov pri rakavih bolnikih že povezali z napredovanjem tumorja, pa še vedno ni jasno ali citokine tvori neoplazma ali samo telo kot odziv nanjo (49, 51). Vključenost citokinov v nastanek kaheksije so preverjali tudi na živalskih modelih in dokazali, da specifična nevtralizacija citokinov s protitelesi blaži kaheksijo (51).

Preglednica II: Stadiji rakave kaheksije (47, 48)

	PREKAHEKSIJA	KAHEKSIJA	REFRAKTARNA KAHEKSIJA	
Normalno stanje	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Izguba telesne mase $\leq 5\%$ ▪ Anoreksija in presnovne spremembe 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Izguba telesne mase $> 5\%$ ali <ul style="list-style-type: none"> ▪ indeks telesne mase < 20 in izguba telesne mase $> 2\%$ ali <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sarkopenija in izguba telesne mase $> 2\%$ ali <ul style="list-style-type: none"> ▪ Znižan vnos hranil, prisotno sistemsko vnetje 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Močno izražen telesni propad ▪ Osnovna bolezen močno prokatabolna ▪ Slaba telesna zmogljivost ▪ Ni več odziva na zdravljenje ▪ Pričakovano preživetje < 3 mesece 	Smrt

Kaheksija vodi v spremembe v telesni sestavi in funkciji, kar lahko vpliva na farmakokinetiko zdravil. Vpliv kaheksije na farmakokinetiko učinkovin se lahko izrazi na vseh nivojih: absorpciji, porazdelitvi, metabolizmu in izločanju. Poročali so o spremenjeni absorpciji, zmanjšanemu volumnu porazdelitve in upočasnjem metabolizmu (41, 42). Študij, ki preučujejo vpliv kaheksije na farmakokinetiko zdravil, primanjkuje. V študijah na ljudeh niso našli nobenih konkretnih dokazov, da kaheksija vpliva na ledvično funkcijo. Zaradi izgube mišične mase pri kahektičnih bolnikih se lahko preceni ledvična funkcija, če je določena na podlagi serumske koncentracije kreatinina (41). Prva študija na podganah, kjer so neposredno ocenjevali vpliv kaheksije na ledvično funkcijo, je bila objavljena leta 2015. Dokazali so povezavo med rakavo kaheksijo in zmanjšano ledvično funkcijo.

Ledvična funkcija pri podganah z rakom je bila raziskana že prej, vendar so si rezultati nasprotujoči. V nekaterih študijah ni bilo zmanjšanja GFR pri raku, medtem ko je v drugih prišlo do opaznega poslabšanja ledvične funkcije. Razlikovanje med rakom in rakavo kaheksijo je zelo pomembno in bi na nek način lahko razložilo tudi nasprotujoče si rezultate v kliničnih študijah (42).

2 NAMEN DELA

Joheksol je vodotopno kontrastno sredstvo in odličen eksogeni označevalec za določanje ledvične funkcije. Izloča se samo preko ledvic z glomerulno filtracijo, brez tubulne sekrecije ali reabsorpcije, in se ne veže na plazemske proteine, zato je njegov očistek merilo hitrosti glomerulne filtracije. Določanje hitrosti glomerulne filtracije s pomočjo joheksola je zaradi svoje enostavnosti, natančnosti in nizke cene dobro diagnostično orodje v klinični praksi majhnih živali. Joheksol se smatra za varnega ter ljudem in živalim prijaznega.

Namen magistrske naloge bo primerjati hitrost glomerulne filtracije pri zdravih podganah, podganah z razvitim tumorjem in pri podganah, ki so razvile rakavo kaheksijo. Hitrost glomerulne filtracije bomo določili na osnovi očistka joheksola, ki so ga v *in vivo* študiji aplicirali podganam. Podganam so odvzeli kri 10, 20, 30, 60, 90 in 120 minut po intravenski aplikaciji joheksola. V posušeni krvni madeži bomo določili koncentracijo joheksola s pomočjo že predhodno razvite metode za določanje plazemskih koncentracij joheksola s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in UV detekcijo. Potrebna bo prilagoditev ekstrakcijske metode za DBS vzorce. Iz izmerjenih koncentracij joheksola bomo izračunali očistke joheksola pri podganah in sicer ob predpostavki enoprostornega farmakokinetičnega modela joheksola z Bröchner – Mortensenovim popravkom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Biološki material - kri

Za standardne DBS vzorce smo uporabili kapilarno kri odvečnih netretiranih laboratorijskih poskusnih podgan vrste Sprague Dawley, težkih med 200 - 300 g. Kri je bila odvzeta v epruvete, v katerih je bil pristoten antikoagulant K_2EDTA v suhi obliki. Za pripravo DBS standardov za umeritveno premico smo vedno uporabili svežo kri. Navedena uporaba laboratorijskih glodavcev je bila priglašena na Upravo RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

Realne DBS vzorce podgan Wistar Han smo pridobili iz Nemčije, Berlina, kjer so na Univerzi Charite izvedli *in vivo* študijo na podganah. Vsi postopki so bili odobreni s strani lokalne etične komisije za poskuse na živalih.

3.1.2 Standardi

- joheksol ($C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$); $M = 821.138$ g/mol (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)

3.1.3 Reagenti in topila

- 70 % perklorna kislina, Chromasol V[®] ($HClO_4$); $M = 100,46$ g/mol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 85 % ortofosforna kislina (H_3PO_4); $M = 98$ (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- bidestilirana voda (ultra čista voda), pridobljena z aparatom Mili-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA), specifična upornost 18,2 M Ω cm, celokupni organski ogljik (TOC) 5, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
- acetonitril Chromasol V[®] (CH_3CN); $M = 41,05$ g/mol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 25 % amonijak (NH_3); $M = 17,03$ g/mol (Panreac Quimica S.A.U., Barcelona, Španija)
- kalijev hidrogen fosfat pro analysi (KH_2PO_4); $M = 136,08$ g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

- puferska raztopina pH = 2 (Panreac Quimica S.A.U., Barcelona, Španija)
- puferska raztopina pH = 4 (Panreac Quimica S.A.U., Barcelona, Španija)

3.1.4 Naprave in pribor

- hladilnik (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- tehtnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- centrifuga Eppendorf 5415 R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- mešalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- stresalnik Vortemp 56 EVC (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- ultrazvočna kadička Bandelin Sonorex digital 10 P (Schalltec, Mörfelden - Walldorf, Nemčija)
- elektromagnetno mešalo Rotamix 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- polavtomatske pipete 2 - 20 μ L, 20 - 200 μ L in 200 - 1000 μ L (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- plastične epice 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- HPLC kolona: Snynergi Hydro, 250 x 4,60 mm, 4 μ m (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- HPLC predkolona: C 18, 4 x 2,0 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija)
- HPLC sistem Agilent 1100 series z UV detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike)
- kartice Whatman 903 (Whatman, Velika Britanija)

Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, viala, inserti za viala, presesalna buča in lij za presesalno bučo.

Ostali inventar: plastične epruvetke, epruvete s K_2EDTA namenjene za vakuumski odvzem venske krvi, nastavki za pipete, plastične kapalke, pinceta, spatula, škarje, lateksne rokavice, Parafilm[®]M, magnetna palica za odstranjevanje magnetov, alkoholni flomaster, pripomočki za filtracijo s presesalno bučo in pH lističi.

3.2 Metode

3.2.1 Priprava osnovnih raztopin, topil in pufrov

Osnovna raztopina joheksola: Joheksol smo zatehtali v 1,5 mL epico in pripravili raztopino s končno koncentracijo 10 mg/mL. Glede na zatehto joheksola (mase natehte so bile od 9,97 do 10,13 mg), smo dodali ustrezno količino bidestilirane vode, da smo dobili željeno koncentracijo 10 mg/mL. Osnovno raztopino smo hranili v hladilniku pri 4 °C največ en mesec.

50 mM fosfatni pufer s pH 3 za mobilno fazo: Zatehtali smo 6,804g KH_2PO_4 , ga kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko, z bidestilirano vodo dopolnili do oznake in zaprto bučko dobro premešali, tako da se je ves KH_2PO_4 raztopil. Pripravljeno raztopino KH_2PO_4 smo s pomočjo predhodno umerjenega pH metra uravnali na pH 3 s 85 % ortofosforno kislino. Sledila je filtracija s presesalno bučo in nazadnje še 10 minutna sonifikacija v ultrazvočni kadički, pri čemer smo odstranili vse morebitne delce in pline, ki bi lahko pri HPLC analizi poškodovali kolono. Uporabljali smo svežo mobilno fazo, katero smo pripravili vsakič tik pred analizo, saj bi v nasprotnem primeru lahko, še posebej pri nestabilnih vodnih raztopinah, hitro prišlo do kontaminacije.

5 % perklorna kislina: V digestoriju smo v 10 mL bučko odpipetirali 714 μL 70 % perklorne kisline in z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. Bučko smo dobro premešali.

2,5 % perklorna kislina: V digestoriju smo v 10 mL bučko odpipetirali 357 μL 70 % perklorne kisline in z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. Bučko smo dobro premešali.

2,5 % raztopina amonijaka: V 5 mL bučko smo odpipetirali 500 μL 25 % amonijaka in z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. Bučko smo dobro premešali. Raztopino smo vedno pripravljali sproti, tik pred analizo pripravljenih vzorcev. Zaradi dražečih hlapov amonijaka in neprijetnega vonja smo jo vedno pripravljali v digestoriju.

Priprava standardnih raztopin joheksola za umeritveno krivuljo

Za umeritveno krivuljo smo iz osnovne raztopine joheksola s koncentracijo 10 mg/mL z redčenjem pripravili osem standardnih raztopin joheksola z različnimi koncentracijami ter slepi vzorec. Pripravo standardnih raztopin iz osnovne raztopine joheksola prikazuje preglednica III.

Preglednica III: Priprava standardnih raztopin joheksola z redčenjem osnovne raztopine joheksola s koncentracijo 10 mg/mL

Koncentracija standardnih raztopin joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	REDČENJE	
	Volumen osnovne raztopine joheksola (μL)	Volumen vode (μL)
0	0	25
50	5	995
100	10	990
200	20	980
500	50	950
1000	50	450
1500	75	425
2000	50	200
5000	50	50

3.2.2 Priprava standardnih DBS vzorcev

Standardne DBS vzorce smo pripravili s kapilarno krvjo netretiranih podgan. Epruvete s krvjo smo previdno in počasi premešali med rokami, saj bi drugače lahko prišlo do hemolize. Približno desetkrat smo jih obrnili na glavo, da smo odstranili tudi ostanke krvi pod zamaškom in tako zagotovili enakomerno razporeditev krvnih celic.

V eni od treh napolnjenih epruvet je bil opazen velik strdek. To bi lahko znatno spremenilo naše rezultate, zato te epruvete nismo uporabili in smo jo zavrgli. Kri v ostalih dveh pa smo med sabo zmešali in jo v nadaljevanju uporabili.

Za pripravo standardnih krvnih raztopin smo zmešali 25 μL posamezne standardne raztopine joheksola ter 475 μL podganje krvi. Nato smo epruvete previdno premešali in nato standardne krvne raztopine joheksola s polavtomatsko pipeto nanegli na kartico Whatman 903. Iz vsake standardne krvne raztopine joheksola smo pripravili 20 standardnih DBS vzorcev in sicer smo na vsako kartico nanegli po 10 kapljic z volumnom 20 μL . Pripravljene standardne DBS vzorce prikazuje slika 3. Vzorce smo 1 dan sušili na zraku in jih nato pospravili v plastične tesnilne vrečke. Tako smo dobili ustrezne standardne DBS vzorce s koncentracijami joheksola od 2,5 do 500 $\mu\text{g/mL}$, katere smo kasneje uporabili za umeritvene krivulje pri vsaki analizi realnih DBS vzorcev.

Koncentracije joheksola v standardnih DBS vzorcih po predhodnem zmešanju standardnih raztopin joheksola s podganjo krvjo prikazuje preglednica IV.

Preglednica IV: Koncentracije joheksola v standardnih DBS vzorcih po zmešanju 25 μL standardnih raztopin joheksola in 475 μL podganje krvi

Standardni DBS vzorec	Koncentracija standardne raztopine joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	Koncentracija joheksola v standardnih DBS vzorcih ($\mu\text{g/mL}$)
1	0	0
2	50	2,5
3	100	5
4	200	10
5	500	25
6	1000	50
7	1500	75
8	200	100
9	5000	250
10	10000	500



Slika 3: Standardni DBS vzorci na karticah Whatman 903

3.2.3 HPLC metoda

Za izračun plazemskega očistka joheksola je potrebna analizna metoda, ki omogoča enostavno, natančno, zanesljivo in specifično določanje koncentracij joheksola v plazmi. Kot taka se je v kliničnih študijah izkazala HPLC - UV metoda, ki ima tudi primerno stopnjo robustnosti in je uporabna za določanje joheksola v plazmi, urinu, serumu in blatu (5, 6).

Uporabili smo analizno metodo iz diplomske naloge Nike Marđetko (53). Gre za HPLC - UV analizno metodo, ki temelji na kvantifikaciji joheksola po predhodnem obarjanju plazemskih proteinov s perklorno kislino in nadaljnjem vorteksiranju in centrifugiranju. Optimizacija same kromatografije ni bila potrebna, kljub temu da je bila metoda v osnovi razvita za določevanje plazemskih koncentracij joheksola in ne DBS vzorcev.

Kromatografski pogoji:

- kolona: reverzno – fazna kromatografska kolona Synergi Hydro (C₁₈, velikost delcev 4 μm, dolžina kolone 250 mm, notranji premer 4,6 mm)
- temperatura kolone: 40 °C
- pretok mobilne faze: 1,2 mL/min
- valovna dolžina UV detekcije: 254 nm
- mobilna faza: 50 mM fosfatni pufer s pH 3 (94 %) in acetonitril (6 %)
- volumen injiciranja: 50 μL
- čas analize: 7 minut

Pri teh pogojih je bila zagotovljena ustrezna ločba kromatografskih vrhov preiskovanega analita in ostalih vrhov, kot so nečistote, proteini.

Uporabljena HPLC - UV metoda je bila že validirana za plazemske vzorce. Mi smo tekom naše analize preverjali tri pomembnejše parametre in sicer linearnost, točnost in ponovljivost.

Točnost analizne metode izraža ujemanje izmerjene vrednosti z nominalno vrednostjo analita v vzorcu in smo jo izračunali z enačbo 1 (54). Iz odzivov posameznih standardnih vzorcev z znano koncentracijo joheksola smo s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracijo joheksola v teh standardnih vzorcih. Povratno izračunane koncentracije smo nato primerjali z dejanskimi koncentracijami in niso smele odstopati za več kot 15 %.

$$\text{Točnost}(\%) = \frac{\bar{C}_{\text{izmerjena}}}{C_{\text{prava}}} \times 100 \quad \text{Enačba 1}$$

Ponovljivost analizne metode izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod enakimi delovnimi pogoji (isto osebje, ista oprema) v kratkem časovnem obdobju. Gre za natančnost znotraj postopka (55). Ponovljivost metode smo preverjali s standardnimi DBS vzorci za pripravo umeritvene premice in sicer smo analizirali po dva vzorca vsake koncentracije. Ponovljivost smo izračunali kot relativno standardno deviacijo po enačbi 2. RSD posamezne meritve ne sme preseči vrednosti 15 %.

$$\text{RSD}(\%) = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Enačba 2}$$

Linearnost je sposobnost analitskega postopka, da znotraj danega območja daje rezultate, ki so premosorazmerni koncentraciji analita v vzorcu (55). Linearnost opredelimo s statistično obdelavo odzivov standardnih vzorcev z metodo linearne regresije, pri čemer dobimo umeritveno premico z enačbo $y = kx + n$, kjer n predstavlja odsek na ordinati oz. začetno vrednost, k pa naklon premice, y odraža odziv oz. površino kromatografskega vrha analita in x predstavlja koncentracijo analita v vzorcu. Umeritvena premica opisuje odnos med koncentracijo analita in odzivom, to korelacijo pa ovrednotimo s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (R) oz. z determinacijskim koeficientom (R^2) (54).

Območje linearnosti smo določili glede na povratno izračunane koncentracije standardnih DBS vzorcev s pomočjo umeritvene premice, pri čemer točnost in ponovljivost nista smeli odstopati za več kot 15 % od dejanskih koncentracij oz. za več kot 20 % pri najnižji točki umeritvene premice.

Delovno območje metode je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega so bile dokazane linearnost, točnost in natančnost. Običajno ga določimo iz območja linearnosti. Ovrednotili tudi mejo kvantifikacije (LLOQ), ki je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno določimo z ustrežno točnostjo in natančnostjo, ki ne smeta odstopati za več kot 20 % od dejanskih koncentracij. Ponavadi je meja LLOQ najnižja točka umeritvene krivulje (55).

3.2.4 Optimizacija ekstrakcije DBS vzorcev

Pri ekstrakciji smo izhajali iz članka Mafham in sodelavcev (56). Opisan postopek ekstrakcije smo vzeli kot osnovo in ga nato še dodatno optimizirali, s spreminjanjem različnih parametrov.

Osnovna shema:

- DBS vzorcu dodamo 170 μ L 5 % perklorne kisline
- vorteksiranje (3 minute)
- sonifikacija v ultrazvočni kadički (15 minut)
- stresanje (30 minut s 3000 obrati/min pri temperaturi 24 °C)
- centrifugiranje (10 min pri 4000 g in temperaturi 20 °C)

DBS vzorce smo s škarjami v celoti previdno izrezali in jih vstavili v 1,5 mL epice. Pri tem smo si pomagali s pinceto, da se s prsti ne bi dotikali površine papirja. Po končani ekstrakciji smo dobili bistro raztopino (supernatant), ki se je ločila od usedlih, gostejših delcev, ki so predstavljali oborjene proteine, koščke filter papirja in ostale komponente posušene krvi. 100 μ L supernatanta smo prenesli v inserte, ki smo jih vstavili v vialo za HPLC analizo. Po prenosu supernatanta v inserte, smo se prepričali, da ni prisotnih nobenih mehurčkov, ki bi lahko motili HPLC analizo.

Pri osnovni ekstrakciji, kjer smo DBS vzorcem dodali 170 μ L 5 % perklorne kisline, smo po končanem centrifugiranju izmerili pH supernatanta, ki je znašal 1. Tako nizek pH je problematičen za HPLC sistem, saj lahko poškoduje injektor ali kolono. Iz tega razloga smo želeli dvigniti pH proti bazičnim vrednostim. Poskusili smo 2 postopka in sicer smo poskusili dvigniti pH z zmanjšanjem volumna oz. koncentracije perklorne kisline v postopku ekstrakcije ter z dodatkom amonijaka k supernatantu.

Postopek 1: Izrezanim DBS vzorcem smo v 1,5 mL epico dodali 150 μ L 5 % perklorne kisline. Po končani centrifugaciji smo v 1,5 mL epico odpipetirali 100 μ L supernatanta in dodali 50 μ L 2,5 % raztopine amonijaka ter vorteksirali 30 sekund.

S postopkom 1 smo preverili, če bi za dvig pH-ja zadostovalo znižanje dodanega volumna perklorne kisline iz 170 na 150 μ L.

Postopek 2: Izrezanim DBS vzorcem smo v 1,5 mL epico dodali 170 μ L 2,5 % perklorne kisline. Po centrifugiranju smo najprej preverili, če se je pH supernatanta dvignil že ob samem znižanju koncentracije dodane perklorne kisline iz 5 na 2,5 % brez dodatka amonijaka. V naslednjem koraku smo v 1,5 mL epice odpipetirali po 100 μ L supernatanta vsakega vzorca in dodali različne volumne in koncentracije amonijaka, da bi ugotovili, kdaj pH supernatanta preide iz kislega v bazično območje. Raztopine smo vorteksirali 30 sekund in s pH lističi izmerili pH.

- Raztopina 1: 100 μ L supernatanta + 50 μ L 2,5 % raztopine amonijaka
- Raztopina 2: 100 μ L supernatanta + 80 μ L 2,5 % raztopine amonijaka
- Raztopina 3: 100 μ L supernatanta + 50 μ L 3 % raztopine amonijaka
- Raztopina 4: 100 μ L supernatanta + 80 μ L 3 % raztopine amonijaka
- Raztopina 5: 100 μ L supernatanta + 50 μ L 3,5 % raztopine amonijaka
- Raztopina 6: 100 μ L supernatanta + 80 μ L 3,5 % raztopine amonijaka

Ker smo z dodatkom amonijaka razredčili vzorec, smo želeli hkrati zmanjšati volumen dodane perklorne kisline in tako obdržati osnovno redčenje. Ker pa so DBS vzorci med ekstrakcijo večji del volumna dodane perklorne kisline absorbirali, mi pa smo potrebovali 100 μ L supernatanta, volumna perklorne kisline nismo mogli močno zmanjšati. Hkrati nismo želeli uporabiti večjih volumnov amonijaka, saj bi tako še bolj razredčili vzorec.

3.2.5 Analiza realnih DBS vzorcev

Realne DBS vzorce smo dobili iz Nemčije, kjer so v *in vivo* študiji na podganah preučevali vpliv rakave kaheksije na metabolizem in ledvično izločanje učinkovin. Joheksol so izbrali kot označevalec ledvične funkcije. Najprej so zdravim podganam intravensko aplicirali enkratni odmerek 100 μ L raztopine joheksola Omnipaque 300 s koncentracijo 647 mg joheksola na mL, kar ustreza odmerku 64,7 mg. Podganam so odvzeli približno 100 μ L krvi 10, 20, 30, 60, 90 in 120 minut po intravenski aplikaciji joheksola. Brizgo so pred

odvzemom krvi omočili z 0,5 M EDTA, katero so prav tako dodali v vsako 0,5 mL epruveto. Pri odvzemu krvi iz vratne vene so bile podgane pod vplivom anestezije. Za vsako časovno točko so naredili 3 DBS vzorce. Po pipetiranju 3 x 20 µL krvi na kartico Whatman 903, so DBS vzorce sušili pri sobni temperaturi vsaj 24 ur in jih nato shranili v plastične vrečke.

Podganam so nato peritonealno aplicirali rakave celice in tako inducirali rak v trebušni votlini. Postopek enkratnega odmerjanja joheksola in vzorčenja krvi so ponovili po petih dneh, ko so podgane že razvile intraperitonealni tumor, ter po desetih dneh, ko so bile podgane v sklopu raka že kahektične (57). Celoten protokol dela s podganami je prikazan v preglednici V.

Preglednica V: Protokol dela s podganami. Ob dnevu 0 (D0) so bile podgane zdrave, ob dnevu 5 (D5) so že imele razvit intraperitonealni tumor, vendar brez vidne kaheksije, ob dnevu 10 (D10) pa so podgane razvile rakavo kaheksijo.

Dan	Čas	Podgane (N = 10)
D0	pred aplikacijo joheksola	meritve telesne mase
		določanje telesne sestave
	0 minut	intravenska aplikacija joheksola (100 µL Omnipaque 300)
	10, 20, 30, 60, 90, 120 minut	3 x 20 µL krvi (DBS)
INDUKCIJA TUMORJA		
D5	pred aplikacijo joheksola	kontrola telesne mase
	0 minut	intravenska aplikacija joheksola (100 µL Omnipaque 300)
	10, 20, 30, 60, 90, 120 minut	3 x 20 µL krvi (DBS)
D10	pred aplikacijo joheksola	kontrola telesne mase
	0 minut	intravenska aplikacija joheksola (100 µL Omnipaque 300)
	10, 20, 30, 60, 90, 120 minut	3 x 20 µL krvi (DBS)
DOLOČANJE TELESNE SESTAVE, KONTROLA TELESNE MASE TER ŽRTVOVANJE ŽIVALI		

Z realnimi DBS vzorci smo določali razlike v ledvični funkciji med podganami ob dnevih 0, 5 in 10. V vsaki časovni točki smo analizirali dva DBS vzorca, pri čemer smo za vrednotenje rezultatov upoštevali povprečje obeh odzivov in s pomočjo umeritvene

krivulje standardnih DBS vzorcev izračunali koncentracije joheksola v realnih DBS vzorcih.

3.2.6 Izračun očistka joheksola

Konstante hitrosti izločanja smo izračunali kot naklon premice naravnih logaritmov koncentracije joheksola v odvisnosti od časa (enačba 3). Nato smo ocenili še volumen porazdelitve joheksola (enačba 4). Pri izračunih volumna porazdelitve smo za spremenljivko t vzeli časovno točko 30 minut po injiciranju joheksola, C pa je bila koncentracija joheksola določena pri časovni točki 30 minut po aplikaciji joheksola. Nazadnje smo izračunali še očistek joheksola na osnovi enoprostornega modela z Bröchner – Mortensenovim popravkom (enačbi 5 in 6).

$$\ln C = -k_{el} \times t \quad \text{Enačba 3}$$

$\ln C$...naklon premice; k_{el} ...konstanta hitrosti izločanja (min^{-1}); t ...čas od aplikacije joheksola (min)

$$V_d = \frac{D}{C_0} = \frac{D}{\left(\frac{C}{e^{(-k_{el} \times t)}} \right)} = \frac{D \times e^{(-k_{el} \times t)}}{C} \quad \text{Enačba 4}$$

V_d ...volumen porazdelitve (mL); D ...odmerek joheksola (μg); C_0 ...koncentracija joheksola ob času t_0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); k_{el} ...konstanta hitrosti izločanja (min^{-1}); t ...čas 30 minut od aplikacije joheksola (min); C ...koncentracija joheksola ob času 30 min od aplikacije joheksola ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

$$Cl_{\text{joheksol}} = V_d \times k_{el} \quad \text{Enačba 5}$$

Cl_{joheksol} ...očistek joheksola (mL/min); V_d ...volumen porazdelitve (mL); k_{el} ...konstanta hitrosti izločanja (min^{-1})

$$Cl_{\text{joheksol BM}} = (0,990778 \times Cl_{\text{joheksol}}) - (0,001218 \times (Cl_{\text{joheksol}})^2) \quad \text{Enačba 6}$$

$Cl_{\text{joheksol BM}}$...očistek joheksola z Bröchner – Mortensenovim popravkom (mL/min)

3.2.7 Vrednotenje rezultatov

Vse rezultate naših analiz smo obdelali s programom Microsoft Office Excel 2007. Statistični test s katerim smo ugotavljali ekperimentalne rezultate je bil Studentov t - test odvisnih vzorcev, parametrični test za ugotavljanje razlik med povprečnima vrednostnima dveh vzorcev, ki sta odvisna (58). V našem primeru smo ob posameznih dnevih pri istih podganah primerjali farmakokinetične parametre joheksola. Neodvisne spremenljivke so bile konstanta hitrosti izločanja, volumen porazdelitve in očistek joheksola z Bröchner - Mortensenovim popravkom, med seboj pa smo primerjali njihove vrednosti na dan D0 in D5, D0 in D10 ter D5 in D10. Izbrali smo stopnjo tveganja 0,05; dvostranski test.

Ničelna hipoteza: Prisotnost tumorja oz. rakave kaheksije ne vpliva na farmakokinetične parametre joheksola.

Alternativna hipoteza: Prisotnost tumorja oz. rakave kaheksije vpliva na farmakokinetične parametre joheksola.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

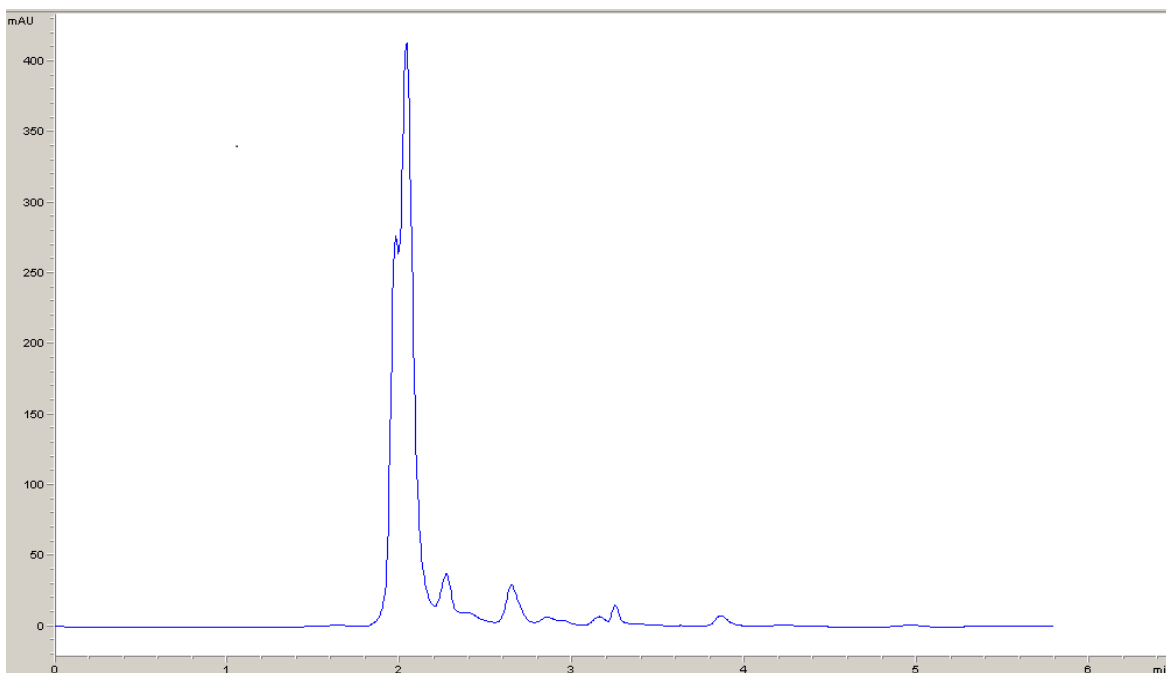
4.1 HPLC metoda

Joheksol smo določali s HPLC – UV metodo, saj je bila ta že razvita in validirana na plazemskih vzorcih in se je v večih študijah izkazala kot enostavna, hitra in zanesljiva metoda za določanje koncentracij joheksola v plazmi (5, 6).

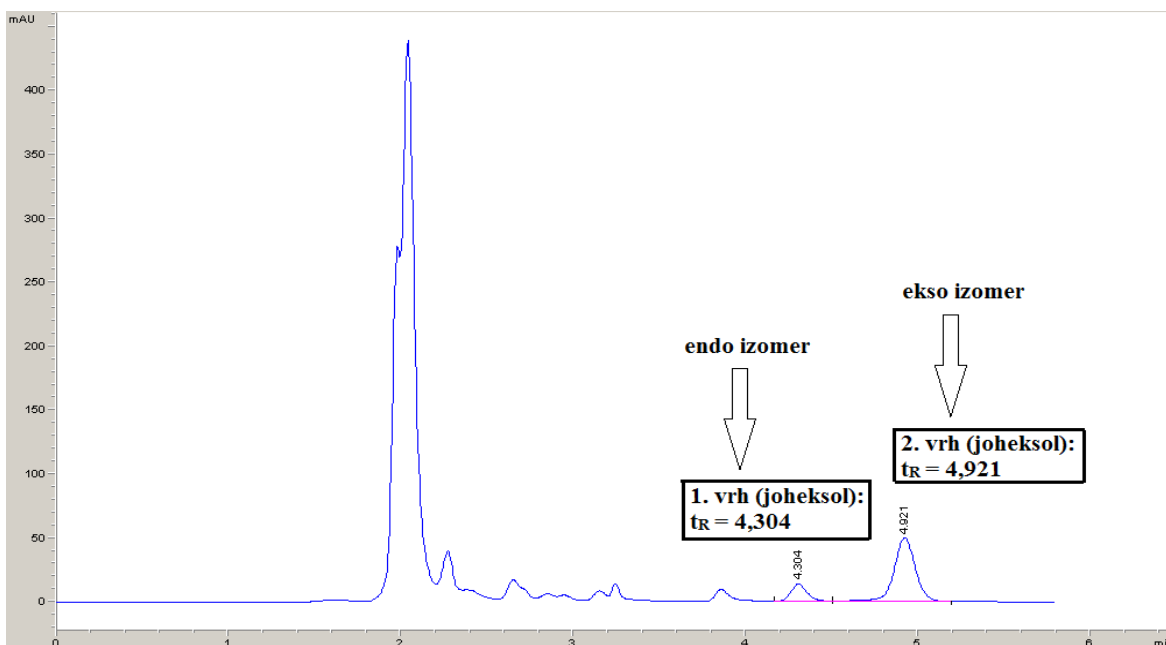
Za določanje joheksola v človeškem serumu oz. plazmi se poleg tekočinske kromatografije z UV detekcijo (LC - UV) uporabljajo tudi tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (LC - MS/MS), kapilarna elektroforeza in atomska emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (5, 59). V študijah z živalskimi modeli smo za analizo joheksola zasledili predvsem uporabo ekstrakcije na trdnih nosilcih z nadaljnjo HPLC - UV analizo in uporabo rentgenske fluorescence (21, 28, 60). Pri psih se ponavadi analizira serum ali plazmo, pri podganah pa urin, saj je vzorčenje enostavnejše, a je pred HPLC analizo potrebno redčenje vzorcev urina zaradi možnost mašenja HPLC kolone (60).

Joheksol je kiralna molekula, ki sestoji iz dveh geometrijskih izomerov, ki sta v organizmu obravnavana podobno. S HPLC – UV metodo detektiramo dva kromatografska vrha, ki predstavljata endo in ekso obliko joheksola (5, 11, 60). Za njuno ločitev se pogosto uporabljajo različni tipi C18 in C30 HPLC kolon (60). Valovna dolžina pri kateri joheksol doseže maksimum UV absorpcije je 244 nm, vendar njegova detekcija poteka pri valovni dolžini 254 nm zaradi manjšega šuma na bazni liniji (5). Sliki 4 in 5 prikazujeta kromatograma slepega vzorca in standardnega DBS vzorca s koncentracijo 100 µg/mL pri valovni dolžini 254 nm, kjer vrh 1 predstavlja endo obliko, vrh 2 pa ekso geometrijsko obliko joheksola. Čeprav pri HPLC analizi detektiramo vrhova obeh izomerov in se za kvantifikacijo lahko uporabita oba, se v praksi iz praktičnega razloga uporablja drugi, večji vrh, ki pripada ekso izomeru (5, 7, 11). Pri naši HPLC analizi z reverzno - fazno kolono s temperaturo 40 °C, mobilno fazo, sestavljeno iz 50 mM fosfatnega pufru s pH 3 in acetonitrila v razmerju 94:6 (v/v), pretoku mobilne faze 1,2 mL/min, volumnu injiciranja 50 µL in pri valovni dolžini UV detekcije 254 nm se joheksol prvič izloči pri retencijskem času 4,3 min in drugič pri retencijskem času 4,9 min. Razmerje površin obeh vrhov naj bi bilo konstantno ne glede na koncentracijo joheksola, pri čemer predstavlja drugi vrh 80 % celokupne površine vrhov obeh izomerov (5). V primeru naših analiz je drugi vrh

predstavljal približno 84 - 87 % celokupne površine obeh vrhov, kar je poleg prikaza ohranjanja razmerja površin obeh vrhov prikazano v preglednici VI. V nadaljnjih izračunih smo tudi mi upoštevali le površino drugega pika. Pri primerjavi razmerij površin obeh kromatografskih vrhov smo ugotovili, da razmerje pri koncentracijah 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$ joheksola ni konstantno in je manjše kot pri večjih koncentracijah.



Slika 4: Kromatogram slepega DBS vzorca



Slika 5: Kromatogram standardnega DBS vzorca s koncentracijo joheksola 100 $\mu\text{g/mL}$

Preglednica VI: Prikaz ohranjanja razmerja površin pod prvim in drugim kromatografskim vrhom joheksola

Nominalna koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	AUC 1 (tr = 4,3 min)	AUC 2 (tr = 4,9 min)	Razmerje AUC 2 glede na celokupno površino (%)	Razmerje površin (%)
2,5	10,3	70,6	87,3	14,6
5	21,5	139,3	86,6	15,4
10	48,7	294,7	85,8	16,5
25	143,8	740,4	83,7	19,4
50	261,8	1413,4	84,4	18,5
100	542,9	2995,3	84,7	18,1
250	1322,1	7325,5	84,7	18,0
500	2540,5	13923,0	84,6	18,2
			\bar{x}	17,3
			SD	1,7
			KV (%)	9,6

\bar{x} ...aritmetična sredina razmerja površin; SD...standardna deviacija razmerja površin; KV...koeficient variacije razmerja površin (%)

Na standardnih DBS vzorcih smo preverjali točnost, ponovljivost in linearnost uporabljene analizne metode. Pri vsaki koncentraciji standardnih DBS vzorcev smo analizirali dva vzorca in za nadaljnje izračune vzeli povprečje odzivov teh dveh meritev.

Preglednici VII in VIII prikazujeta rezultate analiz standardnih DBS vzorcev in izračunano točnost. Preglednica VII prikazuje prvo analizo DBS vzorcev, kjer smo želeli samo oceniti, katere koncentracije dajejo ustrezne rezultate. Poznali smo namreč območje linearnosti uporabljene metode za plazemske vzorce, ne pa krvnih. Pri vseh nadaljnjih analizah pa smo točnost in ponovljivost preverjali z dvema paralelama (preglednica VIII). Koncentracija 2,5 $\mu\text{g/mL}$ je bila tako nizka, da v večini primerov odziva pri HPLC analizi nismo mogli ovrednotiti.

Preglednica VII: Rezultati prve analize standardnih DBS vzorcev in izračunana točnost

Nominalna koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	AUC ($t_r = 4,9$)	Izračunana koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	Točnost (%)
5	26,6	7,9	157,2
10	43,3	11,8	117,7
25	107,4	26,7	106,8
50	210,1	50,6	101,3
75	320,8	76,4	101,9
100	426,1	101,0	101,0
250	1029,8	241,6	96,7
500	2154,1	503,6	100,7

Preglednica VIII: Rezultati analize standardnih DBS vzorcev in izračunana točnost ter RSD

Nominalna koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	AUC ($t_r = 4,9$)		Izračunana koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$)			Točnost (%)			RSD (%)
	1. paralela	2. paralela	1. paralela	2. paralela	povprečje obeh paralel	1. paralela	2. paralela	povprečje obeh paralel	
5	26,6	20,9	7,0	3,1	5,1	139,3	62,0	101,7	54,1
10	43,3	61,8	10,9	13,2	12,0	108,7	131,8	119,9	13,6
25	107,4	105,5	25,8	24,0	24,9	103,4	95,8	99,7	5,1
50	210,1	208,8	49,8	49,4	49,6	99,7	98,8	99,3	0,6
75	320,8	323,7	75,7	77,7	76,7	100,9	103,7	102,3	1,8
100	426,1	436,3	100,3	105,5	102,8	100,3	105,5	102,8	3,6
250	1029,8	970,0	241,4	237,1	239,3	96,5	94,8	95,7	1,3
500	2154,1	2056,9	504,1	505,0	504,5	100,8	101,0	100,9	0,1

V preglednicah VII in VIII vidimo, da je izračunana koncentracija joheksola pri koncentracijah 5 in 10 $\mu\text{g/mL}$ odstopala od nominalnih koncentracij za več kot 15 %. Pri koncentraciji 5 $\mu\text{g/mL}$ celo presega 20 %, kar je meja za LLOQ. Prav tako je bila pri teh koncentracijah ponovljivost metode veliko slabša v primerjavi z ostalimi koncentracijami joheksola. Ponovljivost ni bila določena idealno, saj smo jo določali le z dvema

vzorceda, morali pa bi biti vsaj trije. Razlog je bil v pomanjkanju razpoložljivih vzorcev. Pri ostalih koncentracijah joheksola sta bili točnost in ponovljivost rezultatov ustrezni.

Zaključili smo, da koncentracije 2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL pri HPLC analizi dajejo netočne in slabo ponovljive rezultate. Pri teh koncentracijah je bilo opazno tudi večje odstopanje razmerja površin pod obema kromatografskima vrhoma joheksola (preglednica VI). To razmerje bi moralo biti konstantno, ne glede na analizirano koncentracijo joheksola (5).

Območje linearnosti naše metode je od 25 - 500 µg/mL. Determinacijski koeficient (R^2) je bil 0,9986 in več. Študije z metodami za določanje joheksola v plazemskih vzorcih navajajo linearnost v območju od 10 – 750 µg/mL, 3,25 – 650 µg/mL in 1,5 – 700 µg/mL (5, 9, 53). Pri diplomski nalogi Nike Mardetko je bila metoda linearna v območju 2,5 - 500 µg/mL, kar je ustrezalo tudi območju njene metode. Ker smo imeli krvne vzorce, je bila naša spodnja meja kvantifikacije pričakovano višja v primerjavi s plazemskimi vzorci, saj smo imeli prisotne večje število nečistot (sliki 4 in 5). Za zgornjo mejo kvantifikacije pa smo že na začetku analize določili koncentracijo 500 µg/mL in vzorcev, ki bi presegli to koncentracijo, sploh nismo analizirali. To bi se zgodilo npr. pri realnih vzorcih odvzetih 10 minut po aplikaciji joheksola, saj je v preglednici XI opazno, da so nekatere izmerjene koncentracije joheksola pri časovni točki 20 minut že blizu 300 µg/mL.

4.2 Optimizacija ekstrakcije DBS vzorcev

Pri optimiziranju ekstrakcije je bil naš cilj zagotoviti optimalen pH za sam HPLC sistem, a hkrati doseči ustrezen obseg ekstrakcije joheksola. Ker po osnovnem postopku ekstrakcije pH ni bil ustrezen, smo preizkusili dva različna postopka ekstrakcije, pri čemer smo preverjali vpliv dodatka perklorne kisline in amonijaka na pH supernatanta. Spreminjali smo volumen (170 µL in 150 µL) ter koncentracijo (2,5 % in 5 %) perklorne kisline, po centrifugiranju pa volumen (50 in 80 µL) in koncentracijo (2,5 %, 3 % in 3,5 %) raztopine amonijaka. Ker je bila raztopina perklorne kisline edino topilo, ki smo ga dodali med ekstrakcijo, volumna dodane perklorne kisline nismo želeli dodatno zmanjšati, saj je določen volumen topila potreben za ustrezno omočitev in ekstrakcijo DBS vzorca. Poleg tega smo na koncu ekstrakcije potrebovali 100 µL supernatanta za HPLC analizo in ob dodatku 150 µL perklorne kisline na začetku ekstrakcije smo pri nekaterih vzorcih že imeli problem zagotoviti potreben volumen supernatanta.

Pri postopku 1 smo pri dodatku 150 μL 5 % perklorne kisline in dodatku 50 μL 2,5 % raztopine amonijaka izmerili pH 1. Torej je bil kljub dodanemu amonijaku pH še vedno veliko prenizek za nadaljnjo HPLC analizo. Prišli smo do zaključka, da je koncentracija perklorne kisline v supernatantu prevelika za želen pH in smo jo zato pri postopku 2 zmanjšali.

Pri postopku 2, ob dodatku 170 μL 2,5 % perklorne kisline brez dodatka amonijaka, smo izmerili pH 1 in prišli do zaključka, da je za optimizacijo pH vrednosti supernatanta potrebno ne le zmanjšanje koncentracije perklorne kisline, ampak je nujen tudi dodatek raztopine amonijaka k supernatantu. Supernatantu smo dodajali različne volumne in koncentracije amonijaka za doseg zvišanja pH supernatanta. Želeli smo namreč preiti iz kislega v bazično območje in s tem zagotovili ustrezno HPLC analizo, ki ne poškoduje kolone. Vpliv dodatka amonijaka na pH supernatanta je prikazan v preglednici IX. Ker nismo želeli preveč razredčiti supernatanta in s tem zmanjšati občutljivost metode, smo preizkusili zgolj manjše volumne amonijaka in sicer 50 in 80 μL ter 2,5 %, 3 % in 3,5 % koncentracijo amonijaka. Za dvig pH-ja iz kislega v nevtralno oziroma bazično območje je zadostovalo že 50 μL 2,5 % amonijaka, pri čemer smo izmerili pH 8,5.

Preglednica IX: Vrednosti pH raztopin po dodatku amonijaka k supernatantu

Raztopina	Volumen supernatanta (μL)	Volumen amonijaka (μL)	Koncentracija amonijaka (%)	pH
1	100	50	2,5	8,5
2	100	80	2,5	9
3	100	50	3	9
4	100	80	3	10
5	100	50	3,5	10
6	100	80	3,5	11

Na koncu smo torej najbolj ustrezen pH supernatanta za HPLC analizo dosegli z dodatkom 170 μL 2,5 % perklorne kisline pred ekstrakcijo vzorcev skupaj z dodatkom 50 μL 2,5 % amonijaka k supernatantu.

4.3 Analiza realnih DBS vzorcev

Pri realnih DBS vzorcih smo najprej ugotavljali katere časovne točke so najbolj primerne za analizo z našim postopkom ekstrakcije in uporabljeno HPLC - UV metodo. Na razpolago smo imeli 6 časovnih točk (10, 20, 30, 60, 90 in 120 minut), za izračun farmakokinetičnih parametrov joheksola pa smo potrebovali najmanj 3, zato smo preverjali v katerih časovnih točkah izmerjene koncentracije joheksola ustrezajo območju naše metode 25 – 500 µg/mL. Preglednica X prikazuje izračunane koncentracije joheksola pri dveh različnih analizah vzorcev iste podgane.

Preglednica X: Izračunane koncentracije joheksola v različnih časovnih točkah pri podgani 2 ob dnevu 0

PODGANA 2 OB DNEVU 0				
	1. analiza		2. analiza	
Čas (min)	AUC ($t_r = 4,9$)	Izračunana koncentracija joheksola (µg/mL)	AUC ($t_r = 4,9$)	Izračunana koncentracija joheksola (µg/mL)
20	/	/	1161,8	281,8
30	750	175,9	721,6	177,6
60	254,6	57,3	117	34,5
90	71,1	13,4	42,4	16,8
120	21,5	1,5	/	/

Iz preglednice X je razvidno, da je bila izmerjena koncentracija joheksola 120 minut po njegovi aplikaciji komaj 1,5 µg/mL, kar je izven območja naše metode 25 - 500 µg/mL. Prve časovne točke, 10 minut po aplikaciji joheksola, nismo uporabili, saj je bila pričakovana koncentracija joheksola večja od 500 µg/mL, kar je izven našega koncentracijskega območja 25 - 500 µg/mL. Iz tega razloga smo se po prvi analizi realnih vzorcev odločili, da bomo nadaljnje analize izvajali samo na časovnih točkah 20, 30, 60 in 90 minut po aplikaciji joheksola. Časovno točko 90 minut smo pri nadaljnjih analizah uporabili, kljub temu, da so bile izračunane koncentracije joheksola pri podgani 2 ob D0 izven območja naše metode, saj niso odstopale dosti in nas je zanimalo, če so koncentracije joheksola pri ostalih podganah znotraj našega območja in bi jih lahko uporabili za izračun farmakokinetičnih parametrov joheksola.

Preglednica XI prikazuje izmerjene koncentracije joheksola pri vseh podganah ob dnevih 0, 5 in 10. Izmerjene koncentracije joheksola so bile pri 90 minutah razmeroma nizke in izven območja linearnosti naše metode, kar je razlog, da smo za izračun konstant hitrosti izločanja vzeli časovne točke 20, 30 in 60 minut po aplikaciji joheksola.

Iz preglednice XI je tudi razvidno, da pri nekaterih podganah ob določenih dnevih manjkajo meritve koncentracij joheksola in posledično kasneje tudi izračuni za k_{el} , V_d in $Cl_{joheksol\ BM}$. Razlog je v tem, da ena podgana ob D5 ni razvila tumorja, dve podgani pa sta med D5 in D10 poginili.

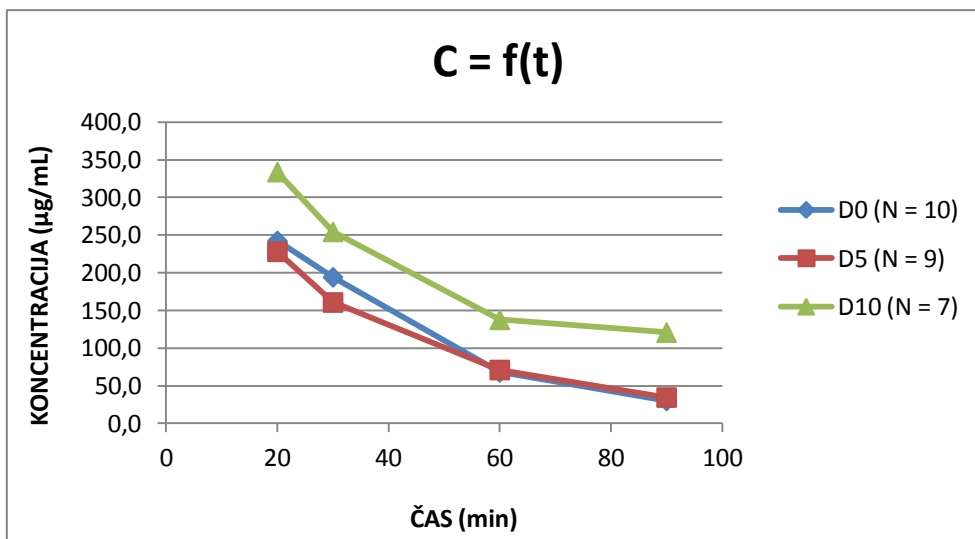
Preglednica XI: Rezultati analize vseh podgan ob D0, D5 in D10. Sivo obarvani predeli označujejo izračun konstant hitrosti izločanja le iz dveh časovnih točk.

		DAN 0			DAN 5			DAN 10		
P	ČAS	\overline{AUC}	C	lnC	\overline{AUC}	C	lnC	\overline{AUC}	C	lnC
1	20	962,9	234,7	5,5	838,1	205,2	5,3	809,3	198,2	5,3
	30	650,0	160,6	5,1	503,8	126,0	4,8	658,0	162,0	5,1
	60	176,3	48,5	3,9	202,5	54,7	4,0	289,8	73,7	4,3
	90	54,7	19,7	3,0	105,1	31,6	3,5	322,2	81,5	4,4
2	20	1161,8	281,8	5,6	815,2	199,8	5,3	Podgana je poginila.		
	30	721,6	177,6	5,2	427,8	108,0	4,7			
	60	117,0	34,5	3,5	226,0	60,3	4,1			
	90	42,4	16,8	2,8	94,7	29,2	3,4			
3	20	825,1	202,1	5,3	1031,5	251,0	5,5	665,9	163,8	5,1
	30	601,9	149,3	5,0	547,0	136,3	4,9	636,2	156,7	5,1
	60	168,8	46,7	3,8	267,9	70,2	4,3	364,6	93,1	4,5
	90	45,6	17,5	2,9	132,0	38,0	3,6	410,5	102,7	4,6
4	20	1274,5	307,7	5,7	753,2	184,5	5,2	1871,3	448,9	6,1
	30	728,2	178,5	5,2	561,0	139,0	4,9	1497,1	360,4	5,9
	60	214,6	57,1	4,0	215,2	57,2	4,0	764,8	187,2	5,2
	90	61,8	20,9	3,0	109,0	32,1	3,5	628,5	155,0	5,0
5	20	954,0	231,9	5,4	1127,4	273,0	5,6	993,5	241,3	5,5
	30	734,7	180,1	5,2	1112,5	269,4	5,6	592,8	146,5	5,0
	60	269,6	70,1	4,2	345,6	88,0	4,5	253,6	66,3	4,2
	90	77,3	24,6	3,2	121,4	35,0	3,6	74,4	23,9	3,2

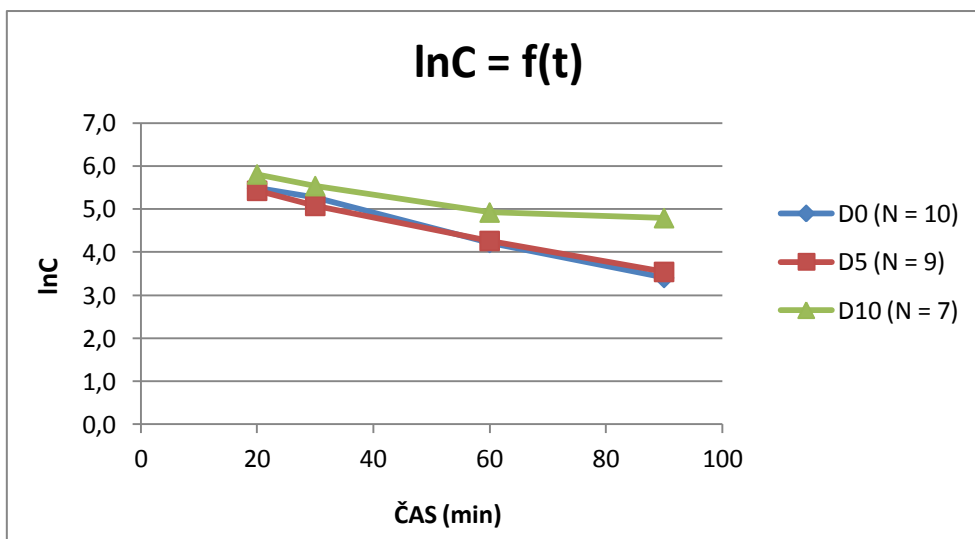
		DAN 0			DAN 5			DAN 10		
P	ČAS	\overline{AUC}	C	lnC	\overline{AUC}	C	lnC	\overline{AUC}	C	lnC
6	30	826,5	194,2	5,3	Podgana ni razvila tumorja.					
	60	349,4	80,0	4,4						
	90	89,9	17,9	2,9						
	120	39,7	5,9	1,8						
7	20	938,3	220,3	5,4	1048,6	246,0	5,5	1319,7	309,2	5,7
	30	756,1	177,9	5,2	672,3	158,3	5,1	1302,7	305,2	5,7
	60	275,2	65,8	4,2	304,2	72,6	4,3	771,4	181,4	5,2
	90	109,9	27,3	3,3	165,5	40,2	3,7	613,3	144,6	5,0
8	20	1101,7	269,6	5,6	1270,4	311,2	5,7	2559,2	628,5	6,4
	30	1015,2	248,3	5,5	1026,2	251,0	5,5	1484,0	363,8	5,9
	60	531,0	129,1	4,9	492,6	119,7	4,8	964,0	235,7	5,5
	90	390,5	94,5	4,5	250,9	60,1	4,1	839,1	205,0	5,3
9	20	1215,8	257,7	5,6	783,2	165,1	5,1	Podgana je poginila.		
	30	1157,9	245,3	5,5	565,2	118,5	4,8			
	60	319,0	65,8	4,2	239,0	48,6	3,9			
	90	159,7	31,7	3,5	79,8	14,6	2,7			
10	20	874,1	177,2	5,2	1076,4	217,8	5,4	1619,9	347,8	5,9
	30	1139,8	230,5	5,4	693,0	140,8	4,9	1339,3	287,1	5,7
	60	403,5	82,7	4,4	335,8	69,1	4,2	597,8	126,7	4,8
	90	143,3	30,5	3,4	145,3	30,9	3,4	623,0	133,5	4,9

P...podgana; \overline{AUC} ...povprečna površina pod krivuljo dveh paralel; C...koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$); lnC...naravni logaritem koncentracije joheksola

Sliki 6 in 7 prikazujeta linearno in logaritemsko odvisnost povprečnih krvnih koncentracij joheksola od časa pri vseh podganah ob D0, D5 in D10.



Slika 6: Povprečne koncentracije joheksola v odvisnosti od časa ob D0, D5 in D10



Slika 7: Povprečni naravni logaritmi koncentracij joheksola v odvisnosti od časa ob D0, D5 in D10

Povprečne koncentracije joheksola se pri podganah z rakom ob D5 niso bistveno razlikovale od koncentracij joheksola pri zdravih podganah ob D0, kar je opazno tudi na slikah 6 in 7. Pri podganah s kaheksijo ob D10 pa so bile povprečne koncentracije joheksola višje glede na D0 in D5. Na sliki 7 vidimo po intravenski aplikaciji joheksola linearano odvisnost naravnih logaritmov koncentracije joheksola od časa, iz česar smo lahko predpostavili enoprostorni farmakokinetični model joheksola in to tudi upoštevali pri nadaljnjem izračunu očistka joheksola. Opazimo tudi, da ob D10 koncentracija joheksola v krvi podgan pri časovni točki 90 minut po aplikaciji joheksola ne pada več linearno oz.

celo naraste. Pri podganah 1, 3 in 10 se je namreč zgodilo, da je bila izmerjena koncentracija joheksola v krvi podgane 90 minut po aplikaciji joheksola večja kot 60 minut po aplikaciji joheksola. To je iz vidika aplikacije enkratne intravenske injekcije nelogično. Lahko je prišlo do napak pri odvzemu krvnih vzorcev.

Za izračun konstant hitrosti izločanja smo uporabili koncentracije joheksola določene 20, 30 in 60 minut po aplikaciji joheksola. Pri nekaterih podganah smo ob določenih dnevih za izračun konstant hitrosti izločanja vzeli le dve časovni točki, kar je s sivo barvo označeno v preglednici XI. Zaradi razloga omenjenega v zgornjem odstavku smo za izračun konstant hitrosti izločanja pri podganah 1, 3 in 10 ob D10 vzeli le časovni točki 20 in 30 minut. Pri podgani 6 ob D0 pa smo za izračun konstante hitrosti izločanja upoštevali le časovni točki 30 in 60 minut, saj časovne točke 20 minut nismo imeli na voljo. Preglednica XII prikazuje izračunane konstante hitrosti izločanja joheksola in determinacijske koeficiente.

Preglednica XII: Konstante hitrosti izločanja joheksola in determinacijski koeficienti ob D0, D5 in D10

Podgana	Dan 0			Dan 5			Dan 10		
	k_{el} (min^{-1})	R^2		k_{el} (min^{-1})	R^2		k_{el} (min^{-1})	R^2	
1	0,040	0,999		0,032	0,991		0,020	1,000*	
2	0,053	0,999		0,028	0,957		/	/	
3	0,037	0,999		0,030	0,967		0,004	1,000*	
4	0,041	0,997		0,029	0,999		0,022	0,999	
5	0,030	0,999		0,030	0,973		0,031	0,989	
6	0,030	1,000*		/	/		/	/	
7	0,031	0,997		0,029	0,993		0,014	0,976	
8	0,019	0,990		0,024	0,999		0,022	0,940	
9	0,036	0,978		0,030	0,999		/	/	
10	0,023	0,881		0,028	0,990		0,019	1,000*	
	\bar{x}	SD	KV(%)	\bar{x}	SD	KV(%)	\bar{x}	SD	KV(%)
	0,034	0,010	29,4	0,029	0,002	6,9	0,019	0,008	42,1

k_{el} ...konstanta hitrosti izločanja joheksola (min^{-1}); R^2 ...determinacijski koeficient; \bar{x} ...aritmetična sredina k_{el} ; SD...standardna deviacija k_{el} ; KV...koeficient variacije k_{el} (%)

* k_{el} računana samo iz dveh časovnih točk

Ker so bile vse podgane težke približno 200 g, smo pričakovali, da bodo konstante hitrosti izločanja na isti dan podobne, vendar, še posebej ob D10, temu ni bilo tako. Delen razlog bi bil lahko v tem, da smo pri podganah 1, 3 in 10 ob D10 za izračun konstante hitrosti izločanja vzeli le dve časovni točki in sicer smo zaradi neprimernih odzivov pri časovnih točkah 60 in 90 minut, vzeli le časovni točki 20 in 30 minut po aplikaciji joheksola. Konstanta hitrosti izločanja še posebej izstopa od povprečja pri podgani 3 ob D10 ($0,004 \text{ min}^{-1}$).

V preglednici XII tudi vidimo, da sta bila pri podgani 8 ob D10 in podgani 10 ob D0 determinacijska koeficienta nekoliko nižja od ostalih. Pri podgani 8 smo ob D10 izmerili mnogo večje koncentracije joheksola v primerjavi z ostalimi podganami. Izmerjena koncentracija joheksola pri časovni točki 20 minut je celo presegala zgornjo mejo območja naše metode ($628,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Pri podgani 10 ob D0 pa je bila izmerjena koncentracija joheksola ob časovni točki 30 minut višja kot ob časovni točki 20 minut po aplikaciji joheksola. To sta bila lahko razloga za slabšo korelacijo med logaritmom koncentracije joheksola in časom ter posledično nižji determinacijski koeficient.

S parnim t – testom smo ugotovili značilno razliko v konstanti hitrosti izločanja med zdravimi podganami (D0) in podganami z razvito kaheksijo (D10) ter podganami z rakom (D5) in podganami z razvito kaheksijo (D10) (preglednica XIII). Na podlagi tega lahko zaključimo, da se v prisotnosti rakave kaheksije konstanta hitrosti izločanja joheksola zmanjša. Značilne razlike med zdravimi podganami (D0) in podganami z rakom (D5) nismo dokazali, torej prisotnost intraperitonealnega tumorja ne vpliva značilno na konstanto hitrosti izločanja joheksola.

Preglednica XIII: Rezultati parnega t – testa primerjave konstant hitrosti izločanja joheksola med D0, D5 in D10

	n - 1	$k_{el} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	
		p	SPR/SNR
D0 in D5	9	0,116	SNR
D5 in D10	8	0,023	SPR
D0 in D10	6	0,044	SPR

D0...dan 0; D5...dan 5; D10...dan 10; k_{el} ...konstanta hitrosti izločanja joheksola (min^{-1}); n - 1...stopinje prostosti; p...p – vrednost ($\alpha = 0.05$, dvostranski test); SPR...statistično pomembna razlika; SNR...statistično nepomembna razlika

Na podlagi konstant hitrosti izločanja smo izračunali še volumne porazdelitve joheksola, ki so prikazani v preglednici XIV. Preglednica XV prikazuje rezultate parnega t – testa primerjave volumnov porazdelitve joheksola ob D0, D5 in D10.

Preglednica XIV: Volumni porazdelitve joheksola ob D0, D5 in D10

V _d (mL)									
Podgana	dan 0			dan 5			dan 10		
1	123,0			197,5			218,2		
2	74,2			262,2			/		
3	142,4			195,3			361,6		
4	105,4			193,0			93,2		
5	144,8			96,6			174,5		
6	137,2			/			/		
7	144,0			168,7			138,2		
8	146,5			125,1			91,4		
9	88,5			219,7			/		
10	142,8			201,1			126,7		
	\bar{x}	SD	KV(%)	\bar{x}	SD	KV(%)	\bar{x}	SD	KV(%)
	124,9	26,4	21,2	184,4	49,3	26,7	172,0	94,9	55,2

\bar{x} ...aritmetična sredina V_d; SD...standardna deviacija V_d; KV...koeficient variacije V_d (%); V_d...volumen porazdelitve joheksola (mL)

Preglednica XV: Rezultati parnega t – testa primerjave volumnov porazdelitve joheksola med D0, D5 in D10

	V _d (mL)		
	n - 1	p	SPR/SNR
D0 in D5	9	0,036	SPR
D5 in D10	8	0,918	SNR
D0 in D10	6	0,341	SNR

D0...dan 0; D5...dan 5; D10...dan 10; V_d...volumen porazdelitve (mL); n - 1...stopinje prostosti; p...p - vrednost ($\alpha = 0,05$, dvostranski test); SPR...statistično pomembna razlika; SNR...statistično nepomembna razlika

S parnim t - testom smo ugotovili značilno razliko v volumnu porazdelitve med zdravimi podganami (D0) in podganami z rakom (D5). Prisotnost intraperitonealnega tumorja torej poveča volumen porazdelitve joheksola, kar bi lahko povezali z serozno tekočino, ki se je nabrala v trebušni votlini podgan z rakom. Povečan volumen porazdelitve ob D5 je bil v tej študiji opažen tudi pri drugi skupini podgan, pri katerih so spremljali vpliv raka in rakave kaheksije na jetrni očistek učinkovin (57). Razlike v volumnu porazdelitve med podganami prikazuje koeficient variacije v preglednici XIV, ki je relativno velik ob vseh treh dneh, še posebej pa ob D10. Na volumen porazdelitve bi poleg spremembe telesne sestave prav tako lahko vplivala koncentracija plazemskih proteinov, ki je odvisna od različnih zdravstvenih stanj. Patološki stanji, ki povečata koncentracijo plazemskih proteinov sta vnetje in dehidracija, medtem ko jo jetrna in ledvična obolenja, malabsorpcija, hipertiroidizem in hujše opeklne zmanjšajo (61). Vezava joheksola na plazemske proteine je manjša od 2 % (7, 13). Med podganami z rakom (D5) in podganami z razvito kaheksijo (D10) ter zdravimi podganami (D0) in podganami z razvito kaheksijo (D10) značilne razlike v volumnu porazdelitve nismo dokazali, torej razvoj rakave kaheksije ne vpliva na volumen porazdelitve joheksola.

Preglednica XVI prikazuje izračunane očistke joheksola z Bröchner – Mortensenovim popravkom. Očistke joheksola smo računali na osnovi enoprostornega farmakokinetičnega modela in pri tem upoštevali Bröchner – Mortensenov popravek. V študijah je bila dokazana dobra korelacija med očistki joheksola na osnovi dvoprostornega modela in enoprostornega modela z Bröchner – Mortensenovim popravkom (9). Preglednica XVII prikazuje rezultate parnega t - testa primerjave očistkov joheksola z Bröchner - Mortensenovim popravkom, določenih ob posameznih dnevih.

Preglednica XVI: Očistki joheksola z Bröchner – Mortensenovim popravkom ob D0, D5 in D10

Cl _{joheksol BM} (mL/min)									
Podgana	dan 0			dan 5			dan 10		
1	4,8			6,2			4,3		
2	3,9			7,1			/		
3	5,2			5,7			1,6		
4	4,3			5,6			2,0		
5	4,3			2,9			5,3		
6	4,0			/			/		
7	4,4			4,9			1,9		
8	2,8			3,0			2,0		
9	3,2			6,6			/		
10	3,2			5,4			2,4		
	\bar{x}	SD	KV(%)	\bar{x}	SD	KV(%)	\bar{x}	SD	KV(%)
	4,0	0,8	19,1	5,3	1,5	27,8	2,8	1,4	51,1

\bar{x} ...aritmetična sredina Cl_{joheksol BM}; SD...standardna deviacija Cl_{joheksol BM}; KV...koeficient variacije Cl_{joheksol BM} (%); Cl_{joheksol BM}...očistek joheksola z Bröchner – Mortensenovim popravkom (mL/min)

Preglednica XVII: Rezultati parnega t - testa primerjave očistkov joheksola z Bröchner - Mortensenovim popravkom med D0, D5 in D10

	Cl _{joheksol BM} (mL/min)		
	n - 1	p	SPR/SNR
D0 in D5	9	0,039	SPR
D5 in D10	8	0,053	SNR
D0 in D10	6	0,061	SNR

D0...dan 0; D5...dan 5; D10...dan 10; Cl_{joheksol BM}...očistek joheksola z Bröchner – Mortensenovim popravkom (mL/min); n - 1...stopinje prostosti; p...p - vrednost ($\alpha = 0.05$, dvostranski test); SPR...statistično pomembna razlika; SNR...statistično nepomembna razlika

V fazi raka ob D5 smo opazili značilno povečan očistek joheksola glede na D0. Povečanje očistka joheksola ob D5 bi lahko bila posledica prehodno povečanega minutnega volumna srca, ki je značilen za zgodnje faze raka (42, 62). V fazi kaheksije ob D10 se je očistek joheksola glede na D0 in D5 zmanjšal. Zmanjšanje očistka v fazi kaheksije sicer ni značilno, je pa ta trend opazen pri vseh podganah razen pri eni. Pri parnem t - testu smo

med D5 in D10 določili p - vrednost 0,053 med D0 in D10 pa 0,061 (preglednica XVII), kar je zelo blizu kritične vrednosti 0,05. V primeru večjega vzorca, če bi imeli ob D10 isto število podgan kot ob D0, bi značilno razliko morda lahko dokazali. Tako pa smo imeli ob D10 3 podgane manj kot ob D0. Ena podgana med študijo ni razvila tumorja, dve podgani pa sta poginili. To je lahko vzrok, da statistične razlike nismo dokazali, saj so rezultati statističnih testov močno odvisni od velikosti vzorca (63). Zmanjšan očistek joheksola ob D10 nakazuje zmanjšanje ledvične funkcije, ki je tudi lahko posledica zmanjšanega minutnega volumna srca, ki je značilno znižan pri kaheksiji, kar lahko prispeva k zmanjšanju pretoka krvi skozi ledvice (42, 46, 62). Zaključimo torej lahko, da prisotnost intraperitonealnega tumorja poveča očistek joheksola, razvoj rakave kaheksije pa očistek zmanjša.

V *in vivo* študiji na podganah, iz katere smo pridobili DBS vzorce za našo nalogo, so pri preučevanju vpliva rakave kaheksije na očistek joheksola spremljali tudi telesno maso podgan. Zmanjšan očistek joheksola pri podganah z razvito kaheksijo ob D10 je verjetno povezan tudi z izgubo telesne mase, tako puste kot tudi maščobne, in kaže na to, da so podgane z večjo izgubo telesne mase bolj nagnjene k poslabšanju ledvične funkcije pri rakavi kaheksiji (42, 57).

Metoda posušenega krvnega madeža se je izkazala za uporabno in zanesljivo metodo pri določanju koncentracij joheksola za oceno GFR pri podganah. Jasnih zaključkov zaradi relativno velike variabilnosti rezultatov med podganami in majhne velikosti vzorca nismo mogli postaviti. Za še bolj natančno določitev GFR bi bilo smiselno izračunati očistek joheksola iz več časovnih točk, kar pa pomeni, da bi morali razširiti območje linearnosti naše metode (25 – 500 µg/mL). Poleg tega bi bilo potrebno v študijo vključiti večje število podgan.

Prva definicija kaheksije se je pojavila šele v letu 2008, kar je lahko tudi razlog da njen vpliv na farmakokinetiko učinkovin ni veliko preučevan, še zlasti pri živalih. Naše rezultate smo težko primerjali s podatki iz literature, saj smo našli zelo malo študij, ki so neposredno preučevale spremembe ledvične funkcije pri kaheksiji in še te niso dajale jasnih zaključkov (41, 42, 57, 64). Ker je določitev ledvične funkcije zelo pomembna pri pravilnem odmerjanju učinkovin, bi bilo nujno potrebno podrobneje raziskati tudi spremembe ledvične funkcije pri kaheksiji (41, 42).

5 SKLEPI

- Že razvita in validirana HPLC - UV metoda za določanje plazemskih koncentracij joheksola, se je izkazala za uporabno tudi pri določanju koncentracij joheksola v posušenem krvnem madežu podgan. Metoda je v območju od 25 do 500 $\mu\text{g/mL}$ linearna, točna in ponovljiva.
- Ekstrakcija joheksola iz posušenih krvnih madežev podgan je vključevala obarjanje plazemskih proteinov s perklorno kislino, vorteksiranje, sonifikacijo v ultrazvočni kadički, centrifugiranje in nazadnje še pufranje supernatanta z 2,5 % amonijakom.
- Pri optimizaciji ekstrakcije se je izkazalo, da najbolj ustrezen pH supernatanta dosežemo, če pred ekstrakcijo uporabimo 170 μL 2,5 % perklorne kisline in nato supernatantu dodamo 50 μL 2,5 % amonijaka.
- Ugotovili smo, da prisotnost intraperitonealnega tumorja pri podganah značilno poveča volumen porazdelitve in očistek joheksola.
- Dokazali smo, da prisotnost rakave kaheksije pri podganah značilno zmanjša konstanto hitrosti izločanja joheksola, medtem ko je pri očistku joheksola pri večini podgan opazno njegovo zmanjšanje, a značilne razlike nismo uspeli dokazati.
- Za postavitev bolj jasnih zaključkov bi morali študijo razširiti na večje število podgan in izračunati očistek joheksola iz več časovnih točk.
- V bodoče bi bilo potrebno vpliv kaheksije na ledvično funkcijo bolje raziskati, saj študij na to temo primanjkuje.

6 LITERATURA

1. Stevens LA, Levey AS: Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(11): 2305–13.
2. Patra PA, Amle D, Jain A: Measurement of glomerular filtration rate by exogenous and endogenous filtration markers. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 2015; 15-7.
3. Berg UB, Bäck R, Celsi G et al: 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.
4. Sabotin M: Ocenjevanje ledvične funkcije – predavanja FFA, Ljubljana.
5. Soman RS, Zahir H, Akhlaghi F: Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 816(1-2): 339-43.
6. Cavalier E, Rozet E, Dubois N et al: Performance of iohexol determination in serum and urine by HPLC: validation, risk and uncertainty assessment. *Clin Chim Acta* 2008; 396(1-2): 80-5.
7. Schwartz GJ, Furth S, Cole SR, Warady B, Muñoz A: Glomerular filtration rate via plasma iohexol disappearance: pilot study for chronic kidney disease in children. *Kidney Int* 2006; 69(11): 2070-7.
8. Tanaka A, Suemaru K, Araki H: A new approach for evaluating renal function and its practical application. *J Pharmacol Sci* 2007; 105(1):1-5.
9. 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.
10. 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; 46(1-2): 31–6.

11. Nilsson-Ehle P: Iohexol clearance for the determination of glomerular filtration rate:15 years' experience in clinical practice. *eJIFCC* 2002; 13(2).
12. <http://www.drugs.com/mmx/iohexol.html>, dostopano: 28. 1. 2016.
13. <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-008771.pdf&dir=smpc>, dostopano: 28. 1. 2016.
14. Haria M, Brogden RN: Iohexol: a review of its pharmacological properties and use as a contrast medium in myelography and neuroangiography. *CNS Drugs* 1997; 7(3): 229-55.
15. European pharmacopoeia 7th edition; 2264-6.
16. Likar P, Klemenc M: Kontrastna nefropatija in biološki označevalci. *Zdrav Vestn* 2013; 82(7): 497–506.
17. Swan SK: The search continues—an ideal marker of GFR. *Clin Chem* 1997; 43(6): 913-4.
18. 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.
19. Frennby B, Sterner G: Contrast media as markers of GFR. *Eur Radiol* 2002; 12(2): 475-84.
20. Sterner G, Frennby B, Hultberg B, Almen T: Iohexol clearance for GFR-determination in renal failure - single or multiple plasma sampling? *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(3): 521-5.
21. Goy-Thollot I, Besse S, Garnier F, Marignan M, Barthez PY: Simplified methods for estimation of plasma clearance of iohexol in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2006; 20(1):52–6.
22. Moe L, Heiene R: Estimation of glomerular filtration rate in dogs with ^{99m}Tc-DTPA and iohexol. *Res Vet Sci* 1995; 58(2): 138-43.
23. Nesje M, Flåøyen A, Moe L: Estimation of glomerular filtration rate in normal sheep by the disappearance of iohexol from serum. *Vet Res Commun* 1997; 21(1): 29-35.

24. Meucci V, Gasperini A, Soldani G, Guidi G, Giorgi M: 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; 42(2): 107-11.
25. Von Hendy-Willson VE, Pressler BM: An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Vet J* 2011; 188(2): 156-65.
26. Meucci V, Sgorbini M, Bonelli F et al: Determination of glomerular filtration rate in adult horses and donkeys by single IV administration of iohexol. *Journal of Equine Veterinary Science* 2015; 35(1): 36-40.
27. Tabatabaei Naeini A, Daroukolaei NZ: Effect of iohexol on tear production and the fluctuations of Schirmer tear test values in clinically normal donkeys. *Comp Clin Pathol* 2009; 18:59-61.
28. Gleadhill A, Michell AR: Evaluation of iohexol as a marker for the clinical measurement of glomerular filtration rate in dogs. *Res Vet Sci* 1996; 60(2): 117-21.
29. Dried blood spots in drug development.
<http://www.eurofins.com/media/2312136/whitepaper%20dried%20blood%20spots%20web.pdf>, dostopano: 28. 1. 2016.
30. Boost drug discovery efficiency – switching from plasma to dried blood spots.
http://www.tandemlabs.com/documents/DBS_WhitePaper_Final.pdf, dostopano: 28. 1. 2016.
31. Bioanalytical services DBS.
http://www.criver.com/files/pdfs/pcs/lab/pc_ls_r_dbs.aspx, dostopano: 28. 1. 2016.
32. Burnett JE: Dried blood spot sampling: practical considerations and recommendation for use with preclinical studies. *Bioanalysis* 2001; 3(10): 1099-107.
33. Cvan Trobec K, Trontelj J, Springer J, Lainscak M, Kerec Kos M: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of bisoprolol, ramiprilat, propranolol and midazolam in rat dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; 958: 29-35.

34. Kurawattimath V, Pocha K, Mariappan TT, Trivedi RK, Mandlekar S: A modified serial blood sampling technique and utility of dried-blood spot technique in estimation of blood concentration: application in mouse pharmacokinetics. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2012; 37(1): 23-30.
35. Emmons G, Rowland M: Pharmacokinetic considerations as to when to use dried blood spot sampling. *Bioanalysis* 2010; 2(11): 1791-6.
36. Perše M: Ne ubijaj – poskusi na živalih. *eSinapsa* 2014; št. 8.
37. Spooner N: A glowing future for dried blood spot sampling. *Bioanalysis* 2010; 2(8): 1343-4.
38. Dried blood spot technology. <http://www.spotonsciences.com/dbstechnology/>, dostopano: 29. 1. 2016.
39. Fan L, Lee JA: Managing the effect of hematocrit on DBS analysis in a regulated environment. *Bioanalysis* 2012; 4(4): 345-7.
40. Wilhelm AJ, den Burger JC, Swart EL: Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions. *Clin Pharmacokinet* 2014; 53(11): 961-73.
41. Trobec K, Kerec Kos M, von Haehling S et al: Pharmacokinetics of drugs in cachectic patients: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8(11): e79603.
42. Cvan Trobec K, Kerec Kos M, Trontelj J et al: Influence of cancer cachexia on drug liver metabolism and renal elimination in rats. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2015; 6(1): 45-52.
43. Evans WJ, Morley JE, Argilés J et al: Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008; 27(6): 793-9.
44. Rotovnik Kozjek N, Mrevlje Ž, Koroušič Seljak B et al.: Kaheksija pri bolnikih z rakom. *Zdrav Vestn* 2013; 82: 133-41.
45. Farkas J, von Haehling S, Kalantar-Zadeh K et al: Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2013; 4(3): 173-8.

46. Volčanšek Š, Vidmar D, Vozlič D et al.: Terminalna faza paliativnega zdravljenja – seminar 2007. Medeno srce.
47. Kogovšek K: Obravnava kaheksije pri bolnikih z rakom: multimodalni pristop. Enota za klinično prehrano, Onkološki inštitut Ljubljana.
48. Fearon K, Strasser F, Anker SD et al: Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 2011; 12(5): 489-95.
49. Črne-Finderle N, Zorec R: Lastnosti neoplastičnih celic, invazivnost in metastaziranje. Temelji patološke fiziologije; UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2011: 130-1.
50. Morley JE, Thomas DR, Wilson MMG: Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 735– 43.
51. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Nakamura N, Inui A: Cancer cachexia-pathophysiology and management. *J Gastroenterol* 2013; 48(5): 574-94.
52. Fearon KC: Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. *Eur J Cancer* 2008; 44(8): 1124-32.
53. Marđetko N: Določanje plazemskih koncentracij kontrastnega sredstva joheksola za oceno hitrosti glomerulne filtracije - diplomska naloga, Ljubljana 2012.
54. 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, 2013.
55. Cesar J: Validacija analiznih metod – predavanja FFA, Ljubljana.
56. Mafham MM, Niculescu-Duvaz I, Barron J et al: A practical method of measuring glomerular filtration rate by iohexol clearance using dried capillary blood spots. *Nephron Clin Pract* 2007; 106(3): c104-12.
57. Čvan Trobec K: Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksije na farmakokinetiko bisoprolola in ramiprila in na oceno ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem - doktorska disertacija, Ljubljana 2014.

58. Kovačič M: On-line slovarček statističnih pojmov.
<http://www.ljudmila.org/matej/statistika/mva.html>, dostopano: 1. 2. 2016.
59. Annesley TM, Clayton LT: Ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for iohexol in human serum. *Clin Chem* 2009; 55(6): 1196–202.
60. Klenner S, Bergmann C, Strube K, Ternes W, Spillmann T: SPE for endo- and exo-iohexol analysis with HPLC in canine serum and rat urine. *J Chromatogr* 2007; 65(11): 733-6.
61. Kerec Kos M: Distribucija zdravilnih učinkovin v organizmu – predavanja FFA, Ljubljana.
62. Fernandez R, Piechnik J, Fabris R, Malnic G, Fernandes LC: Effect of chronic fish oil supplementation on renal function of normal and cachectic rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(10): 1481-9.
63. Cankar G, Bajec B: Velikost učinka kot dopolnilo testiranju statistične pomembnosti razlik. *Psihološka obzorja (Ljubljana)* 2003; 2(2): 97-112.
64. von Haehling S, Anker SD: Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2010; 1(1): 1-5.