

Vaja: METODA REZIDUALOV

1. UVOD

Pomemben del preučevanja usode zdravila v telesu je farmakokinetična analiza eksperimentalnih podatkov. V študijah farmakokinetike učinkovin dobimo podatke, ki opisujejo časovne poteke njihovih koncentracij v posameznih telesnih tekočinah (krvi, urinu, tkivih...). Obdelava informacije teče v smeri postavitve farmakokinetičnega modela ter določevanja vrednosti njegovih parametrov. Pri tem se poslužujemo metod grafične in numerične analize. Namen vaje je predstaviti **metodo rezidualov** kot eno izmed orodij za pridobivanje farmakokinetičnih parametrov iz eksperimentalnih podatkov.

Farmakokinetični procesi potekajo v kompleksnem biološkem sistemu. Zato njihovo spremljanje in razlaga nujno potrebuje poenostavitve, ki omogočijo, da si organizem lahko predstavljamo kot "črno škatlo" z definiranim vhodom in izhodom. Tako pridemo do modeliranja, postopka, ki je uveljavljen v večini modernih znanosti. Modeliranje pomeni iskanje, izgradnjo, študij in preverjanje **modela**, t.j. strukture, ki v bistvenih lastnostih zadovoljivo predstavlja dogajanje v sistemu, ki ga proučujemo. Model temelji na matematičnih relacijah, ki opisujejo odvisnost izbrane spremenljivke (npr. krvne koncentracije) od neodvisne spremenljivke (npr. časa). Cilj modeliranja je torej pridobivanje pregledne, matematično izražene in eksperimentalno preverjene predstave o preučevanem biološkem sistemu.

Modeli imajo svojo **strukturo** in svoje **parametre**. Struktura je prisotna v matematičnih relacijah (funkcijah), ki definirajo odvisnost med spremenljivkami v modelu, npr. med časom in koncentracijo. Parametri so koeficienti enačb, npr. hitrostne in sorazmernostne konstante.

Modele delimo na:

- empirične in eksplikativne: Empiričnim modelom je edini cilj redukcija informacije v eksperimentalnih podatkih. Na drugi strani eksplikativni (mehanistični) modeli skušajo prodreti v notranjo strukturo preučevanih sistemov in matematično opisati mehanizme, ki v njih potekajo.
- statične in dinamične: Prvi opisujejo časovno neodvisne pojave kakršna so na primer ravnotežja procesa. Dinamični modeli privzemajo čas kot neodvisno spremenljivko.
- deterministične in stohastične: Deterministični modeli predpostavljajo, da so količine, ki v njih nastopajo, enolično določene, drugi pa vpeljujejo tudi eno ali več slučajnostnih komponent kot na primer eksperimentalno napako ali spremenljivost nekega parametra med posameznimi osebki iste populacije.
- linearne in nelinearne: Linearni modeli so tisti, ki predstavljajo časovno neodvisnost vrednosti in števila parametrov modela. Za razliko od njih vključujejo nelinearni modeli tudi spremenljive parametre. Primer nelinearnega modela je farmakokinetični model, ki opisuje izločanje učinkovine pri pacientu z zmanjšano ledvično funkcijo v času pred, med in po priključitvi na umetno ledvico. V času med priključitvijo na umetno ledvico vpliva poleg pacientovega telesnega klirensa na izločanje učinkovine tudi klirens aparature.

V nadaljevanju nas bodo zanimali **farmakokinetični prostorski modeli**, ki so glede na zgornje opredelitve eksplikativni, dinamični, deterministični in linearni. Pri teh modelih se biološki organizem poenostavi do nivoja homogenega prostora z določenim volumnom. Prostorov je v takem modelu lahko tudi več, vsi pa so povezani v smislu dinamičnega ravnotežja.

V primeru linearnih prostorskih modelov lahko hitrost spreminjanja količine učinkovine v posameznem prostoru opišemo s sistemom linearnih diferencialnih enačb, pri čemer je število diferencialnih enačb enako številu prostorov (n). Linearna diferencialna enačba splošne oblike se glasi:

$$\frac{dm_i}{dt} = \sum_{j=1}^n k_{ji} \cdot x_j - \sum_{j=1}^n k_{ij} \cdot x_i - k_{i0} \cdot x_i + m_i(t)$$

m_i predstavlja količino učinkovine v prostoru i , parametri k_{ij} so hitrostne konstante, ki predstavljajo intenzivnost transporta učinkovine iz i -tega v j -ti prostor, k_{ji} hitrostne konstante, ki predstavljajo intenzivnost transporta iz j -tega v i -ti prostor, k_{i0} predstavlja hitrostno konstanto eliminacije učinkovine, $m_i(t)$ pa aplicirano dozo učinkovine. Če poznamo volumne prostorov (V_i), lahko izračunamo koncentracije učinkovine v posameznih prostorih (c_i).

Sistem diferencialnih enačb predstavlja **matematični model**, katerega rešitev je **poliekspponentialna funkcija** oblike:

$$m_i(t) = A_{1i} e^{-\lambda_1 t} + A_{2i} e^{-\lambda_2 t} + \dots + A_{ni} e^{-\lambda_n t} \quad i = 1, 2, \dots, n$$

V vsakem prostoru lahko torej izrazimo časovne poteke učinkovine kot vsoto eksponentialnih funkcij. Konstantam A_{ij} pravimo **komponente lastnega vektorja** A_i , konstantam λ pa **lastne vrednosti**. Oboji so funkcije parametrov modela k_{ij} .

Na osnovi te zveze lahko večino farmakokinetičnih profilov tretiramo kot poliekspponentialne funkcije. Pri dvoprostornem farmakokinetičnem modelu z intravensko aplikacijo obsega poliekspponentialna enačba prva dva člena. Po peroralni aplikaciji dobimo dodatni tretji člen z negativnim predznakom. Takšne modelne funkcije lahko uporabljamo za simulacijo nivojev učinkovine v posameznih prostorih sistema. V vzorčenih prostorih (npr. krvi) lahko odziv modela (vrednosti modelne funkcije) primerjamo z eksperimentalnimi vrednostmi in na ta način ocenjujemo ustreznost modela. V nevezorčenih prostorih pa lahko z modelnimi funkcijami dobimo informacijo o nivojih učinkovine.

2. METODA REZIDUALOV

Metoda rezidualov predstavlja orodje za pridobivanje vrednosti lastnih vrednosti in lastnih vektorjev poliekspponentialnih krivulj. Splošna enačba poliekspponentialne krivulje se glasi:

$$c_p(t) = A_1 \cdot e^{-\lambda_1 t} + A_2 \cdot e^{-\lambda_2 t} + A_3 \cdot e^{-\lambda_3 t} + \dots + A_n \cdot e^{-\lambda_n t}$$

Člene poliekspponentialne krivulje razdelimo po velikosti:

$$\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 > \dots > \lambda_n$$

Po določenem času t^* vsi členi funkcije razen zadnjega postanejo enaki nič, torej po času t^* velja:

$$c_p(t) = A_n \cdot e^{-\lambda_n \cdot t}$$

Po logaritmiranju obeh strani dobimo enačbo premice:

$$\ln(c_p(t)) = \ln(A_n) - \lambda_n \cdot t$$

V **semilogaritemskem nanosu** torej v zadosti dolgem času iz poliekspencialne krivulje dobimo premico z naklonom λ_n . To je zadnji, najpočasnejši člen krivulje. Če ga odštejemo od krivulje $c_p(t)$, dobimo količino, ki jo imenujemo **preostanek ali rezidual** $c'_p(t)$:

$$c'_p(t) = c_p(t) - A_n e^{-\lambda_n \cdot t} = A_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} + \dots + A_{n-1} \cdot e^{-\lambda_{n-1} \cdot t}$$

Dobljene vrednosti rezidualov naneseemo v semilogaritemski diagram napram času in ponovno ugotovimo, da točke v časih, ki so večji od določenega časa t^{**} , iz krivulje oblikujejo premico. Ta premica podaja parametra predzadnjega člena poliekspencialne funkcije. Postopek nato ciklično ponavljamo in na ta način pridemo do vseh parametrov poliekspencialne krivulje. Od tod v angleški literaturi za metodo rezidualov termin "stripping" ali "peeling off".

V praktičnih situacijah nimamo opravka s krivuljami, marveč s skupinami točk (eksperimentalnimi meritvami). Pri tem poskušamo v vsaki fazi strippinga grafično ali analitično potegniti najboljšo premico skozi zadnje točke v nanosu koncentracij ali rezidualov v semilogaritemskih diagramih.

Izvedbo metode bomo spoznali na spodnjem primeru.

PRIMER: Po intravenski aplikaciji smo v plazmi izmerili naslednje koncentracije učinkovine:

t (h)	plazemske konc. (mg/l)	ekstrapolirane konc. (mg/l)	reziduali (mg/l)	odziv modela (mg/l)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
0.5	244	35	209	251
1	203	34	169	189
2	102	33	69	113
3	70	31	39	72
4	48	30	18	51
6	28	-	-	32
8	23	-	-	26
10	23	-	-	22
12	19	-	-	20

Podatke iz kolon (1) in (2) vnesemo v semilogaritemski papir in skozi zadnje štiri točke potegnemo premico. Premico ekstrapoliramo na ordinato in tako dobimo vrednost $A_2 = 36 \text{ mg/l}$. Iz naklona premice ocenimo $\lambda_2 = 0.049 \text{ h}^{-1}$ ter določimo razpolovno dobo terminalne faze diagrama, ki znaša 14.1 h.

Počasni eksponencialni člen je torej $A_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} = 36 \cdot e^{-0.049 \cdot t}$ oz. grafični zapis premice je $\ln 36 - 0.049 \cdot t$. V nadaljevanju določimo tej premici ekstrapolirane vrednosti za čase, ki so manjši od t^* in so enaki časom vzorčenja (kolona 3). Njihove vrednosti odštejemo od meritev in dobimo rezidualne (kolona 4). Vrednosti rezidualov znova vnesemo v semilogaritemski diagram in dobimo novo premico z večjim naklonom in večjim odsekom na ordinati ($A_1 = 300 \text{ mg/l}$, $\lambda_1 = 0.66 \text{ h}^{-1}$).

Biekspencialna enačba se torej glasi:

$$c_p(t) = 300 \cdot e^{-0.66 \cdot t} + 36 \cdot e^{-0.049 \cdot t} \quad (\text{mg/l})$$

Dobljena biekspencialna enačba opisuje potek koncentracij učinkovine v plazemskem prostoru, iz katerega smo vzorčili po intravenski aplikaciji. Tovrstna enačba pripada dvoprostornemu farmakokinetičnemu modelu. Počasni del krivulje pripisujemo sistemski eliminaciji, hitri del pa porazdelitvi učinkovine v sistemu. Govorimo tudi o počasni, terminalni beta fazi in hitri alfa fazi krivulje. S to enačbo lahko ob vstavljanju ustreznih vrednosti za čas (kolona 1) dobimo odzive modelne funkcije oz. simulirane krvne nivoje učinkovine (kolona 5). Iz parametrov A_1 , A_2 , λ_1 , λ_2 z ustreznimi algoritmi dobimo parametre modela.

Naklone premic in odseke na ordinatah lahko izračunamo tudi z metodo linearne regresije najmanjših kvadratov. Ta metoda je seveda pravilnejša, predpostavlja pa uporabo ustreznih regresijskih algoritmov.

Podoben pristop imamo tudi pri strippingu krivulj, pridobljenih iz podatkov po peroralni aplikaciji učinkovine. Pri teh je padajoči del krivulje seveda pod ekstrapoliranim delom terminalne krivulje. Rezidualom, dobljenim v tem diagramu, obrnemo predznak, zato ima tudi koeficient A_1 v tem primeru negativen predznak. V primeru enoprostornega modela s peroralno aplikacijo velja $A_1 = -A_2$, kar izpolnjuje začetni pogoj: $t = 0$, $c = 0$.

NALOGA 1:

Po peroralni aplikaciji 200 mg zdravilne učinkovine smo v plazmi izmerili naslednje koncentracije učinkovine:

t (h)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	6	8
c _p (mg/l)	0	3.90	6.13	7.67	6.36	4.24	2.66	1.63	0.99	0.37

S pomočjo metode rezidualov določi konstanto hitrosti absorpcije, konstanto hitrosti eliminacije in biološko razpolovno dobo učinkovine v plazmi. Ob predpostavki, da je volumen distribucije učinkovine 12 litrov, izračunaj tudi faktor absorpcije učinkovine.

Rešitev:

t (h)	plazemska konc. (mg/l)	ekstrapolirana konc. (mg/l)	reziduali (mg/l)	odziv modela (mg/l)
0	0			
0,25	3,9			
0,5	6,13			
1	7,67			
2	6,36			
3	4,24			
4	2,66			
5	1,63			
6	0,99			
8	0,37			

Enačba modela:

Izračuni:

Rezultati:
k_a =
k_{el} =
t_{1/2} =
F =

Parametri modela.

parameter	vrednost	enota

Enačba modela: