

Model dwukompartментowy - założenia teoretyczne. Symulacja dyspozycji leku z wykorzystaniem modelu hydraulicznego

Cel ćwiczenia

Wyznaczenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych opisujących dwukompartментowy model dyspozycji oraz ocena wpływu zmiany tych parametrów na stężenie leku w ustroju.

Wymagane zagadnienia

Farmakokinetyka leku po jednorazowym podaniu dożylnym i pozanaczyniowym w modelu jedno- i dwukompartментowym. Znajomość podstawowych parametrów farmakokinetycznych: klirens, pozorna objętość dystrybucji, stała szybkości eliminacji i jej wyznaczenie, biologiczny okres półtrwania.

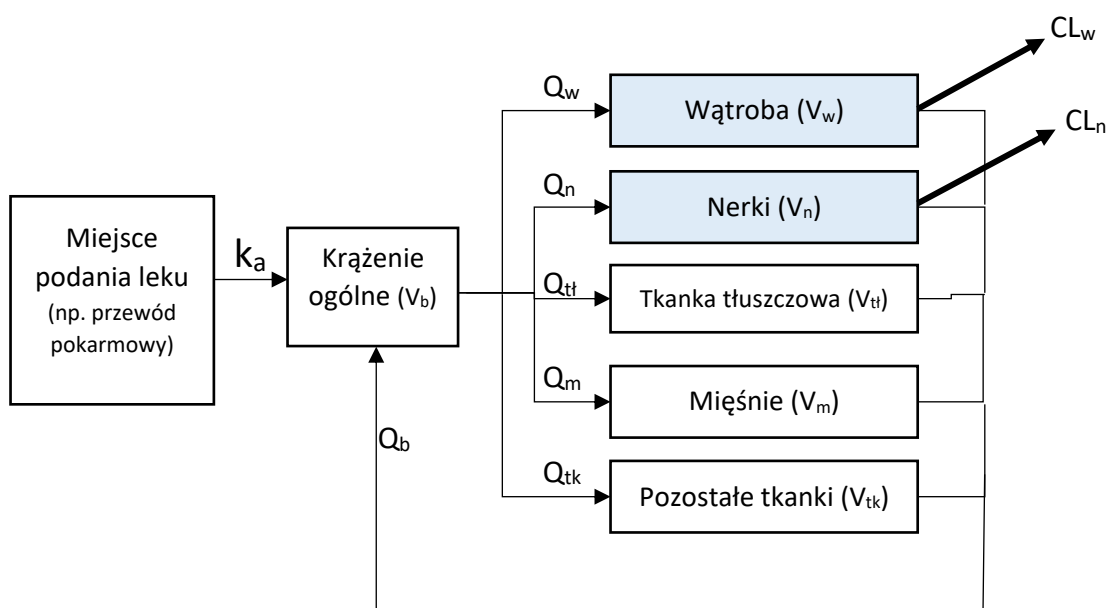
Opracowanie

dr hab. Dorota Danielak, dr hab. Katarzyna Kosicka-Noworzyń, dr hab. Marta Karaźniewicz-Łada,
prof. dr hab. Franciszek Główka

Wprowadzenie

Modele farmakokinetyczne umożliwiają relatywnie proste przedstawienie bardzo złożonych procesów zachodzących w organizmie po podaniu leku – procesów związanych z wchłanianiem, dystrybucją i eliminacją leku. Tworzenie modeli farmakokinetycznych jest uproszczeniem tych procesów, jest jednak konieczne, gdyż ekstremalnie trudnym byłoby zmierzenie szybkości, z jaką rzeczywiste procesy zachodzą w poszczególnych tkankach organizmu.

Najbardziej zaawansowane modele farmakokinetyczne to tak zwane modele fizjologiczne. Dzięki znajomości m.in. masy poszczególnych organów, szybkości przepływu krwi przez te narządy (perfuzji) lub aktywności układów enzymatycznych można bardzo szczegółowo opisać to, jak lek rozmieszcza się w ustroju. Możliwe jest nawet przedstawienie każdego narządu lub tkanki jako oddzielnych kompartmentów. Przykład takiego modelu przedstawiono na Rycinie 3.1

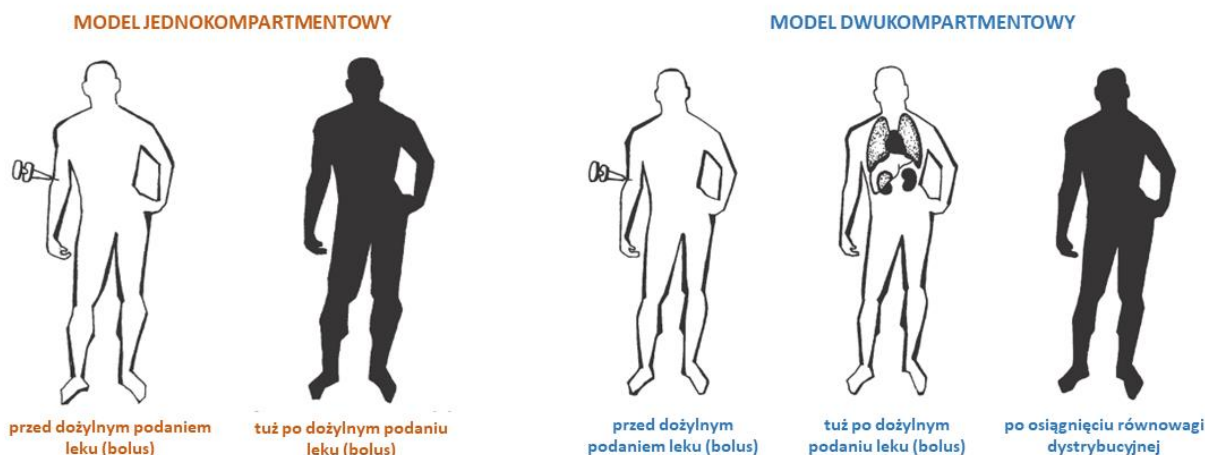


Ryc. 3.1. Przykład uproszczonego modelu fizjologicznego, gdzie: CL – klirens, k_a – stała szybkości wchłaniania, Q – szybkości przepływu krwi przez dany narząd, V – objętości dystrybucji/tkanki, b – krew, w- wątroba, n - nerka, tł - tkanka tłuszczowa, m – mięśnie, tk - pozostałe tkanki.

Po podaniu leku, na przykład po doustnym zażyciu tabletki, lek wchłania się z przewodu pokarmowego ze stałą szybkości k_a . Trafia potem do krążenia ogólnego i jest rozprowadzany w całej objętości krwi (V_b), która przepływa z szybkością Q_b . Każdy narząd lub tkanka perfundowane są ze specyficzną szybkością (Q) i mają określone objętości (V). Ponadto model ten zakłada, że jedynymi narządami odpowiedzialnymi za eliminację są nerki i wątroba. Ujęcie tych zależności w równania matematyczne jest bardzo trudne, a obliczenie wartości parametrów farmakokinetycznych wymaga dużej mocy obliczeniowej. Stąd poszukuje się sposobów na matematyczne jego uproszczenie. Ma to swoje uzasadnienie w fizjologii. Często bowiem nie obserwuje się znaczących różnic w zachowaniu leku pod względem kinetycznym w różnych tkankach, co pozwala na zastosowanie modeli o mniejszej liczbie kompartmentów.

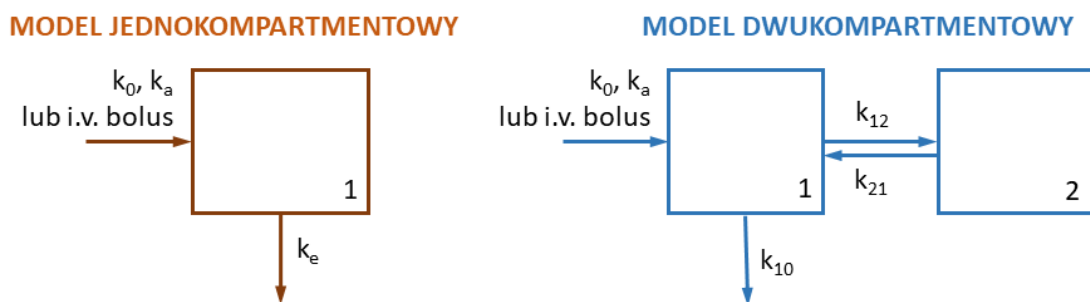
Zarówno model jedno- jak i dwukompartamentowy są takimi uproszczeniami. Model dwukompartamentowy jest modelem farmakokinetycznym bardziej zbliżonym do warunków fizjologicznych niż model jednokompartamentowy. Różnica polega na tym, że w modelu jednokompartamentowym lek po wchłonięciu ulega niemiernie szybko dystrybucji w całym organizmie (zakładamy, że rozprzestrzenienie leku w całym organizmie następuje natychmiast po dotarciu przez lek do krążenia ogólnego). W rzeczywistości osiągnięcie stanu równowagi pomiędzy ilością leku we wszystkich płynach ustrojowych i miejscach wiązania leku może trwać dłużej. Schematycznie proces

dystrybucji leku w organizmie ludzkim przedstawia Ryc. 3.2: w modelu 1-kompartmentowym dystrybucja leku jest natychmiastowa, w modelu 2-kompartmentowym najpierw lek rozprzestrzenia się w kompartencie centralnym, a dystrybucja do kompartentu tkankowego jest dłuższa (mierzalna).



Rycina 3.2. Schemat procesu dystrybucji w modelu jedno- oraz dwukompartmentowym (zaczepnięto z [3], w modyfikacji własnej).

Modele jedno- i dwukompartmentowy można przedstawić również w sposób pokazany na Rycinie 3.3.

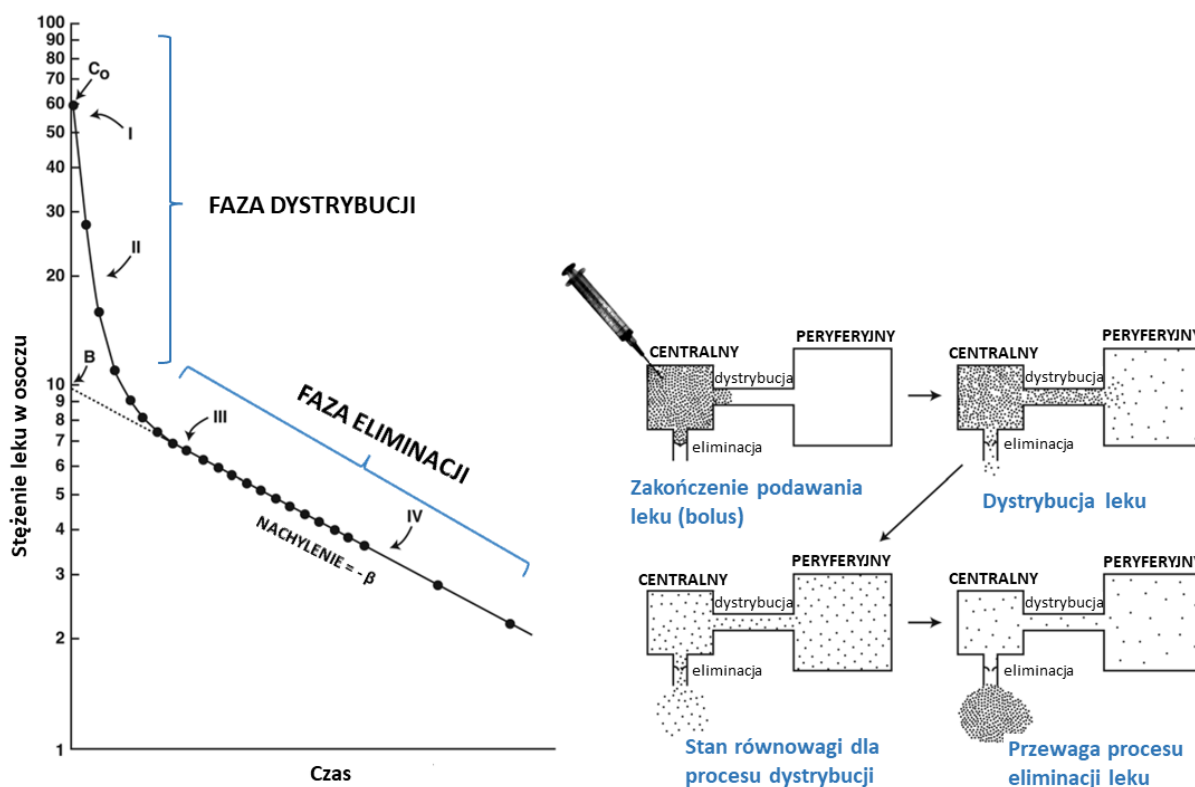


Rycina 3.3. Model jedno- oraz dwukompartmentowy. Na schematach zaznaczono różne warianty podania leku: k_0 – stała szybkości podawania leku (stała zerowego rzędu), związana jest z podaniem leku ze stałą szybkością (np. w postaci wlewu dożylnego); k_a – stała szybkości wchłaniania (pierwszego rzędu), związana z podaniem pozanaczyniowym leku (np. doustne podanie leku w postaci tabletki), i.v. bolus – gdy lek podawany jest w postaci szybkiej iniekcji dożylniej. W modelu jednokompartmentowym k_e oznacza stałą eliminacji pierwszego rzędu. W modelu dwukompartmentowym oznaczono kolejno stałe szybkości pierwszego rzędu: k_{12} - dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do tkankowego, k_{21} – dystrybucji leku z kompartmentu tkankowego do centralnego, k_{10} - eliminacji leku z kompartmentu centralnego.

Farmakokinetyka podania jednorazowego w modelu dwukompartamentowym

W modelu dwukompartamentowym, po podaniu szybkiej iniekcji dożyłnej, kiedy całą dawkę leku podaje się bezpośrednio do krążenia systemowego, półlogarytmiczny wykres zmian stężenia leku jako funkcji czasu ma przebieg dwufazowy (Ryc. 3.4) – wyróżniamy na nim szybszą fazę dystrybucji oraz wolniejszą fazę eliminacji. Bardziej szczegółowo losy leku w ustroju można w takim przypadku opisać w czterech etapach (są one zaznaczone na Ryc. 3.4 literami rzymskimi):

- Etap I: podanie dożylnie leku w postaci bolusa właśnie zostało zakończone, a ilość leku w kompartmentie centralnym jest najwyższa. Dystrybucja i eliminacja leku dopiero się rozpoczęły.
- Etap II: w trakcie trwania procesu dystrybucji ilość leku w kompartmentie centralnym gwałtownie spada, głównie z powodu szybkiej dystrybucji leku poza kompartment centralny - do kompartmentu peryferyjnego. Równowaga dystrybucyjna nie została jeszcze osiągnięta.
- Etap III: Równowaga dystrybucyjna została osiągnięta. Dystrybucja leku w obu kierunkach nadal ma miejsce, ale stosunek ilości i stężeń leku w kompartmentach centralnym i peryferyjnym pozostaje niezmienny. W tym momencie głównym sprawcą spadku stężenia leku w kompartmentie centralnym staje się proces eliminacji; we wcześniejszych etapach spadek stężenia w kompartmentie centralnym determinowany był głównie przez proces dystrybucji.
- Etap IV: podczas tej fazy eliminacji lek jest „drenowany” z obu kompartmentów na zewnątrz ciała (przez kompartment centralny) z taką samą stałą szybkości, równą stałej β . W rezultacie zmiany stężeń leku w kompartmentie centralnym i peryferyjnym przebiegają równoległe na wykresie półlogarytmicznym.

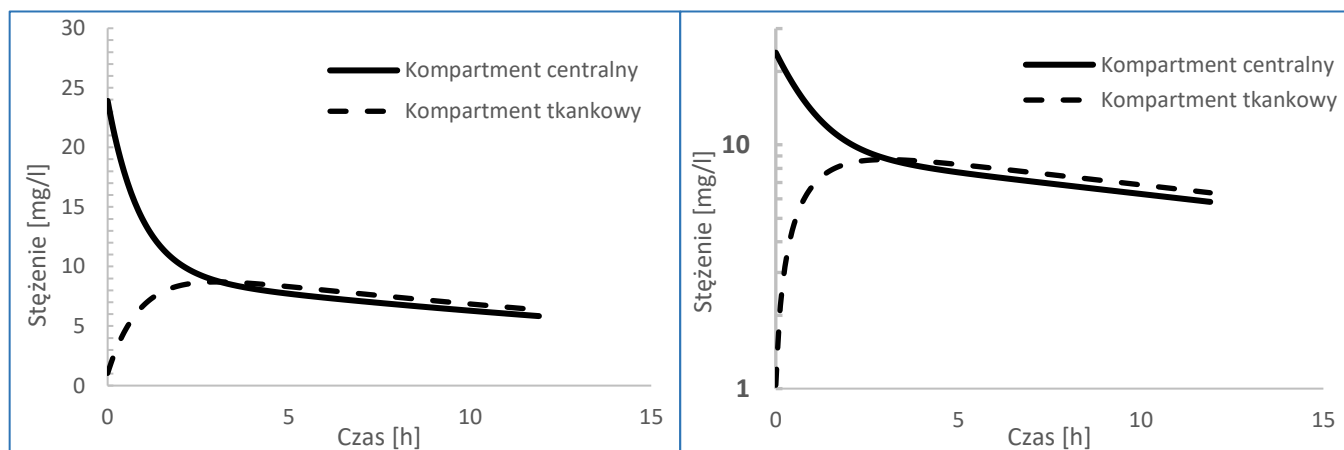


Ryc. 3.4. Zmiany stężenia leku w kompartmentie centralnym i kompartmentie tkankowym po jednorazowym bolusie (szybkiej iniekcji dożyłnej) do kompartmentu centralnego (zaczerpnięto z [3], w modyfikacji własnej).

Silnie perfundowane narządy i tkanki (Tabela 1), takie jak wątroba, nerki i mózg, powinny być podatne na szybką dystrybucję leków. Krew i łatwo dostępne dla leku płyny i tkanki silnie ukrwione można uważać za jednostkę kinetycznie homogeniczną, zwaną **kompartmentem centralnym**. Należy pamiętać jednak, że homogenność kinetyczna nie oznacza, że stężenia leku we wszystkich tkankach kompartmentu **centralnego** w danym momencie są takie same. Oznacza to, że zmiana stężenia leku w osoczu znajduje swój ilościowy wyraz w zmianie stężenia w pozostałych tkankach zaliczanych do kompartmentu centralnego, tzn. stosunek stężeń leku jest zawsze taki sam. Natomiast stężenie leku w słabo ukrwionych tkankach (Tabela 1), stanowiących kompartment tkankowy, najpierw się zwiększa do osiągnięcia maksimum, a następnie ulega zmniejszeniu podczas fazy eliminacji. Z chwilą osiągnięcia równowagi postdystrybucyjnej, w kompartmentach centralnym i tkankowym, ubytek leku z osocza następuje zgodnie z równaniem monowykładniczym, wskazującym na kinetyczną homogeniczność w odniesieniu do stężeń leku we wszystkich płynach ustrojowych. Zmiany stężenia leku w obu kompartmentach przedstawiają wykresy na Ryc. 3.5.

Tabela 1. Umowny, najczęściej przyjmowany podział tkanek w organizmie człowieka ze względu na ukrwienie [1]

Poziom ukrwienia tkanek	tkanki	Masa tkanki [% całkowitej masy ciała]
Silnie perfundowane	Serce, mózg, wątroba, nerki, gruczoły endokrynne	9
	Skóra i mięśnie	50
	Tkanka tłuszczowa i szpik kostny	19
Słabo perfundowane	Kości, więzadła, ścięgna, tkanka chrzęstna, zęby, włosy	22



Ryc. 3.5. Zmiany stężenia leku w czasie w kompartmentie centralnym (linia ciągła) i tkankowym (linia przerywana) po jednorazowym podaniu dożylnym leku. Zależności przedstawione na wykresach w **skali liniowej** – wykres lewy, a także **półlogarytmicznej** – wykres prawy.

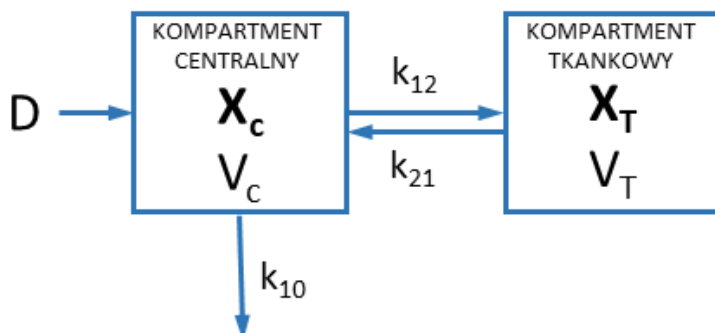
Przykład praktyczny

Wykorzystanie modelu, który dzieli organizm na dwie przestrzenie – kompartmenty, pomiędzy którymi zachodzi wyraźna faza dystrybucji, jest niezbędne do wyjaśnienia zachowania m.in. digoksyny (glikozyd nasercowy stosowany w zaawansowanej niewydolności serca). Efekt farmakodynamiczny po podaniu digoksyny koreluje z jej stężeniem w surowicy, ale dopiero po osiągnięciu równowagi dystrybucyjnej między kompartmentem centralnym, który obejmuje krew, a kompartmentem tkankowym (tkanka serca). Digoksyna jest stosunkowo dużą cząsteczką i osiągnięcie równowagi wymaga czasu – dystrybucja może trwać nawet do 10 godzin. Przyjmuje się, że zakres terapeutyczny dla digoksyny wynosi 0,8 – 2,0 µg/L i jest to zakres stężeń w surowicy, który zapewnia poziomy terapeutyczny w tkance serca. Jeśli stężenie digoksyny w surowicy zmierzmy zbyt szybko - przed zakończeniem dystrybucji, będzie ono zbyt wysokie w porównaniu ze stężeniem w mięśniu sercowym. Interpretując taki wynik przeszacujemy oczekiwany efekt farmakologiczny i co za tym idzie skuteczność leczenia. Dlatego też, próbkę krwi do monitorowania stężenia digoksyny pobiera się nie wcześniej niż po 8-12 h od podania leku.

Farmakokinetyka jednorazowego podania dożylnego

Najprostszy przykład modelu dwukompartamentowego to podanie leku w postaci szybkiej iniekcji dożylną bezpośrednio do kompartmentu centralnego (Ryc. 3.6). Jego założenia to:

- Dyspozycja (dystrybucja i eliminacja) zachodzą zgodnie z kinetyką 1-rzędu,
- Ilość leku monitorujemy na podstawie pomiarów z kompartmentu centralnego,
- Eliminacja leku zachodzi wyłącznie z kompartmentu centralnego.



Rycina 3.6. Blokowy model dyspozycji zgodnej z modelem dwukompartamentowym po szybkiej iniekcji dożylną. X_c i X_T – ilość leku w kompartmentie centralnym i tkankowym, V_c i V_T – objętości kompartmentów centralnego i tkankowego; k_{12} , k_{21} , k_{10} – stałe szybkości pierwszego rzędu kolejno: dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do tkankowego, z tkankowego do centralnego, i eliminacji leku z kompartmentu centralnego.

Wtedy, **zmiany ilości** leku w poszczególnych kompartmentach można opisać za pomocą równań różniczkowych:

$$\frac{dX_c}{dt} = k_{21} \cdot X_T - (k_{12} + k_{10}) \cdot X_c$$

$$\frac{dX_T}{dt} = k_{12} \cdot X_c - k_{21} \cdot X_T$$

Po scałkowaniu i pewnych podstawieniach powyższych równań otrzymuje się wyrażenie dwuwykładnicze, które opisuje **stężenie** leku w osoczu w funkcji czasu:

$$C = \underbrace{A \cdot e^{-\alpha t}}_{\text{dystrybucja}} + \underbrace{B \cdot e^{-\beta t}}_{\text{eliminacja}}$$

Na wykresie $C=f(t)$ (Ryc. 3.4) szybkie zmiany stężenia leku w osoczu ilustrują głównie fazę dystrybucji leku w organizmie, natomiast końcowy liniowy odcinek wykresu obrazuje tzw. fazę eliminacji leku z krwi różnymi możliwymi drogami. Stąd przebieg zmian stężenia leku we krwi w modelu dwukompartментowym opisuje przedstawione powyżej równanie dwuwykładnicze. W równaniu tym pojawiają się stałe A , B , α i β – są to tzw. stałe hybrydowe wynikające ze stałych szybkości dystrybucji i eliminacji leku; D – oznacza ilość leku w miejscu podania.

$$A = \frac{D \cdot (\alpha - k_{21})}{V_d \cdot (\alpha - \beta)}$$

$$B = \frac{D \cdot (k_{21} - \beta)}{V_d \cdot (\alpha - \beta)}$$

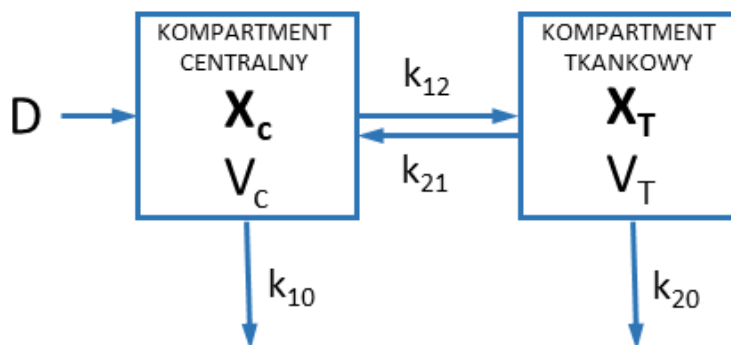
$$\alpha \cdot \beta = k_{21} \cdot k_{10}$$

$$\alpha + \beta = k_{12} + k_{21} + k_{10}$$

Ilość leku w kompartmentie tkankowym opisana jest równaniem:

$$X_T = \frac{D \cdot k_{12}}{\alpha - \beta} \cdot (e^{-\beta t} - e^{-\alpha t})$$

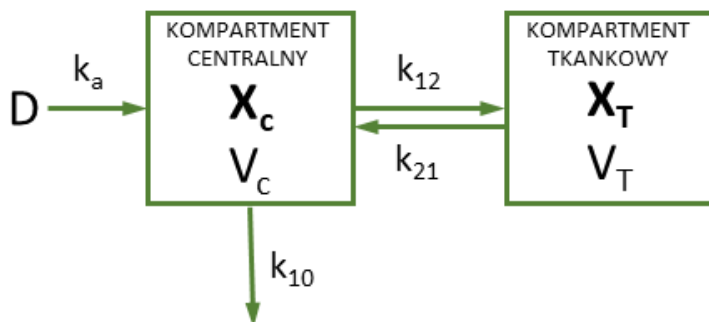
Należy tutaj zaznaczyć, że schemat przedstawiony na Ryc. 3.6 jest najczęściej spotykany w piśmiennictwie. Zakłada on, że eliminacja leku zachodzi tylko z kompartmentu centralnego, zgodnie ze stałą szybkości k_{10} . Jednak w niektórych przypadkach może dochodzić do niej również z poziomu kompartmentu tkankowego. Przykładowo – lek może być metabolizowany w tkance. Wtedy schemat ten będzie wyglądał tak jak przedstawiono na Ryc. 3.7.



Rycina 3.7. Alternatywny model dwukompartментowy uwzględniający eliminację zarówno z kompartmentu centralnego, jak i z kompartmentu tkankowego. X_c i X_T – ilość leku w kompartmentie centralnym i tkankowym, V_c i V_T – objętości kompartmentów centralnego i tkankowego; k_{12} , k_{21} , k_{10} , k_{20} – stałe szybkości pierwszego rzędu kolejno: dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do tkankowego, z tkankowego do centralnego, eliminacji leku z kompartmentu centralnego, eliminacji leku z kompartmentu peryferyjnego (tkankowego).

Farmakokinetyka jednorazowego podania pozanaczyniowego

Na Ryc. 3.8. przedstawiono model dwukompartmentowy dla leku podanego w postaci jednorazowej dawki pozanaczyniowej, uwzględniający dodatkowo fazę wchłaniania, która zachodzi zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu.



Ryc. 3.8. Model dwukompartmentowy dla leku podanego w jednorazowej dawce pozanaczyniowej. D – ilość leku w miejscu podania (np. w żołądku, jelitach, mięśniach), X_c i X_T – ilość leku w kompartmentcie centralnym i tkankowym, V_c i V_T – objętości kompartmentów centralnego i tkankowego; k_a – stała szybkości wchłaniania, k_{12} , k_{21} , k_{10} – stałe szybkości pierwszego rzędu kolejno: dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do tkankowego, z tkankowego do centralnego, i eliminacji leku z kompartmentu centralnego.

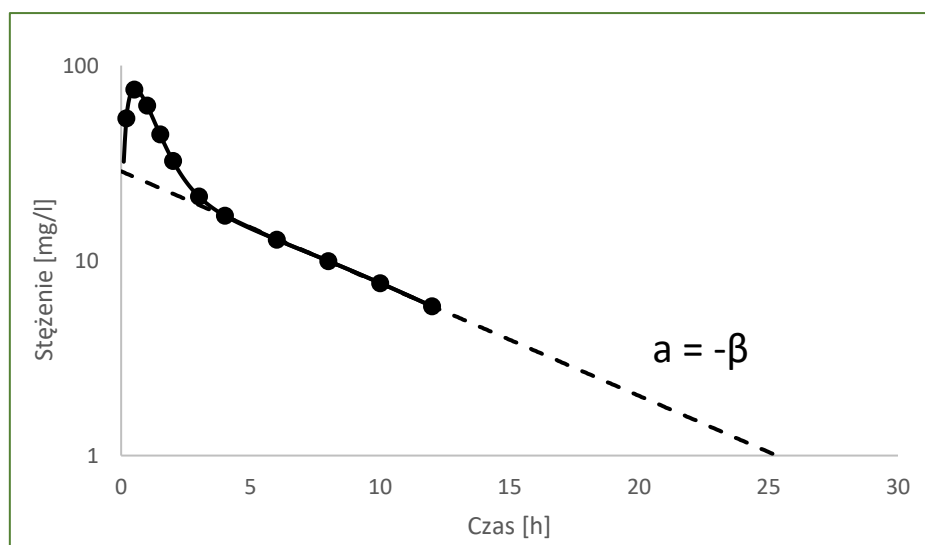
Do opisu zmian stężenia leku we krwi w funkcji czasu po podaniu pozanaczyniowym w modelu dwukompartmentowym stosuje się poniższy wzór. W równaniu można wyróżnić trzy człony będące matematycznym odzwierciedleniem zmian stężenia wynikających z kolejno dystrybucji, eliminacji i wchłanianiu leku z miejsca podania.

C_0 – stężenie początkowe leku w miejscu podania pozanaczyniowego (np. w mięśniu)

A , B , α i β – tzw. stałe hybrydowe wynikające ze stałych szybkości dystrybucji i eliminacji leku

$$C = \underbrace{A \cdot e^{-\alpha t}}_{\text{dystrybucja}} + \underbrace{B \cdot e^{-\beta t}}_{\text{eliminacja}} - \underbrace{C_0 \cdot e^{-k_a t}}_{\text{absorpcja}}$$

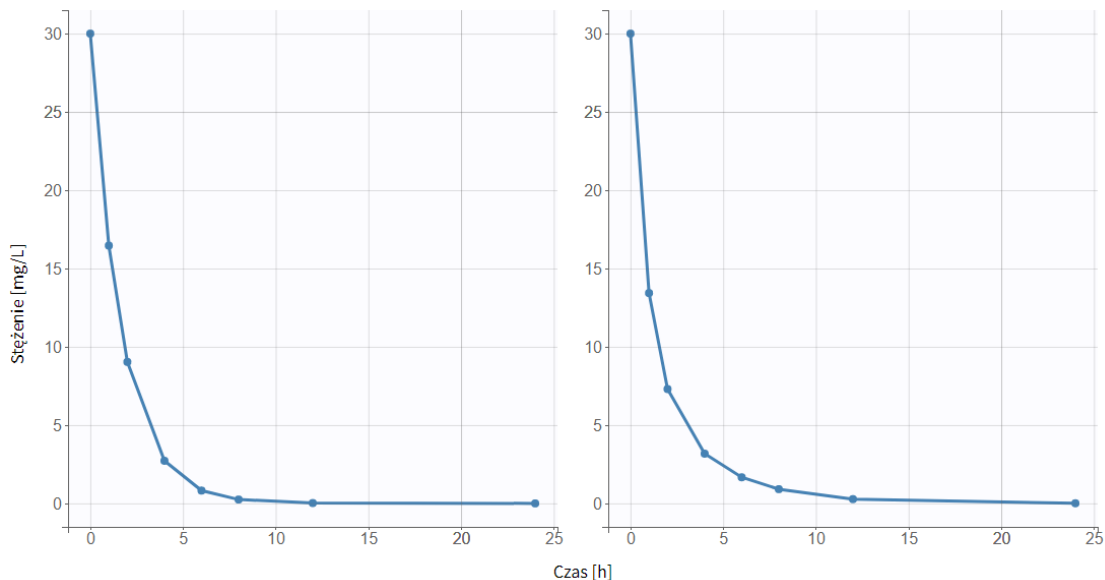
Zmiany stężenia leku we krwi zachodzące wg powyższego równania obrazuje Ryc. 3.7. Z nachylenia terminalnego, prostoliniowego odcinka fazy eliminacji można obliczyć stałą β .



Ryc. 3.7. Półlogarymiczna zależność zmian stężenia leku w osoczu krwi jako funkcja czasu w otwartym modelu dwukompartmentowym, po podaniu jednorazowej dawki pozanaczyniowej.

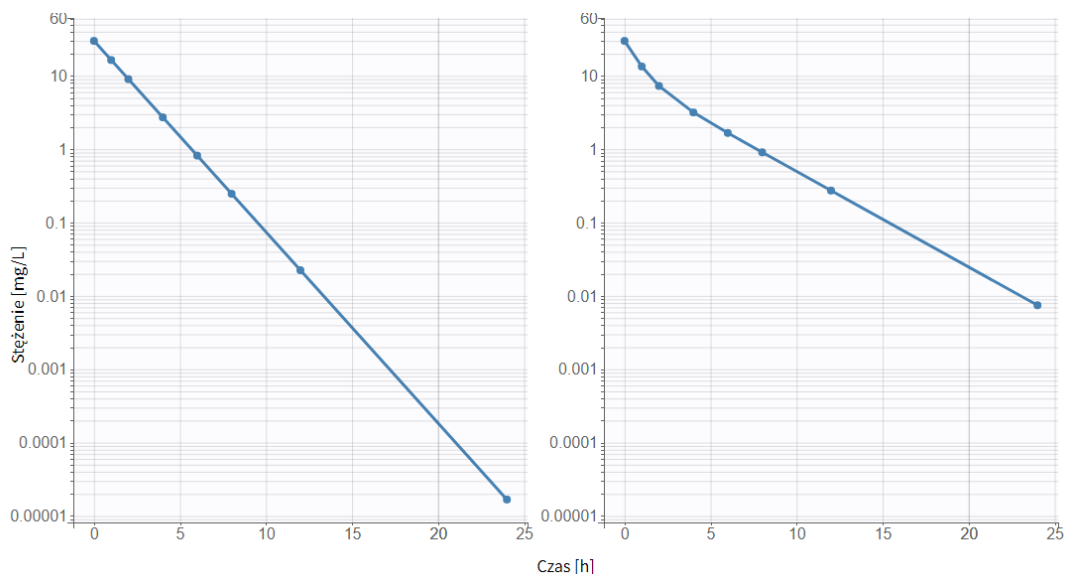
Porównanie modelu jedno- i dwukompartmentowego na przykładzie podania dożylnego

Opisując farmakokinetykę danego leku, dość często staje się przed wyborem pomiędzy modelem jedno- i dwukompartmentowym. Jednym z najprostszych sposobów na określenie, który model lepiej opisuje dane kliniczne, jest wizualna ocena danych. Na poniższej rycinie przedstawiono wykresy w skali liniowej dla leku podanego w jednorazowym bolusie dożylnym.



Ryc. 3.8. Porównanie dyspozycji w modelu jedno- i dwukompartmentowym po jednorazowym bolusie dożylnym dawki 300 mg na wykresach w skali liniowej. Parametry modelu jednokompartmentowego: $V = 10$ L, $CL = 6$ L/h. Parametry modelu dwukompartmentowego: $V_1 = 10$ L, $V_2 = 5$ L, $CL = 6$ L/h, $Q = 5$ L/h.

Oba wykresy prezentują się niemal identycznie i trudno jednoznacznie stwierdzić, z którym modelem mamy do czynienia. Różnica pojawia się dopiero, gdy oś Y przedstawimy w skali logarytmicznej (Ryc. 3.9). Wtedy wyraźnie można wyróżnić fazy dystrybucji i eliminacji na prawym panelu. Natomiast lewy panel przedstawia tylko linię prostą, ponieważ model jednokompartmentowy będący jego podstawą zakłada natychmiastową dystrybucję leku.



Ryc. 3.9. Porównanie dyspozycji w modelu jedno- i dwukompartmentowym po jednorazowym bolusie dożylnym dawki 300 mg na wykresach w skali półlogarytmicznej. Parametry modelu jednokompartmentowego: $V = 10$ L, $CL = 6$ L/h. Parametry modelu dwukompartmentowego: $V_1 = 10$ L, $V_2 = 5$ L, $CL = 6$ L/h, $Q = 5$ L/h.

Pytania, jakie badacz powinien sobie zadać przy wizualnej ocenie dobroci dopasowania modelu do opisu farmakokinetyki leku zawiera Tabela 2.

Tabela 2. Najważniejsze różnice pomiędzy modelem jedno- i dwukompartментowym

Model jednokompartментowy	Model dwukompartментowy
<i>Czy na wykresie $C=f(t)$ w początkowej fazie (lub po zakończeniu fazy wchłaniania) widać szybszy spadek stężenia leku niż w fazie późniejszej?</i>	
NIE	TAK
Równowaga dystrybucyjna jest osiągnięta natychmiast	Równowaga dystrybucyjna osiągnięta jest powoli, wymaga czasu
<i>Czy wykres $C=f(t)$ w skali półlogarytmicznej ma przebieg liniowy w całym zakresie?</i>	
TAK	NIE
Wyróżnia się jedną fazę dyspozycji leku - fazę eliminacji. Wykres $C=f(t)$ w skali półlogarytmicznej ma przebieg liniowy.	Można rozróżnić dwie fazy dyspozycji leku: fazę dystrybucji oraz fazę eliminacji. Na wykresie $C=f(t)$ w skali półlogarytmicznej widać przebieg krzywoliniowy (szybki spadek stężenia) odpowiadający fazie dystrybucji oraz w późniejszym czasie przebieg liniowy odpowiadający fazie eliminacji leku.

Poza wizualną oceną, profesjonalne programy farmakokinetyczne uwzględniają także statystyczną ocenę dobroci dopasowania modelu. Na ich podstawie badacz może zdecydować, który model lepiej opisuje zmiany stężeń oznaczone np. u pacjenta w badaniu klinicznym. Wśród takich testów można wymienić:

- współczynnik determinacji (R^2) pomiędzy wartościami eksperymentalnymi a przewidywanymi przez model – wartość R^2 wynosząca 1 świadczy o idealnej zgodności i dobrym dopasowaniu modelu
- test Akaike (AIC, *Akaike Information Criterion*) – preferowany jest model z jak najniższą wartością funkcji testowej
- test Schwarz (SIC, *Schwarz Information Criterion* lub BIC, *Bayesian Information Criterion*) – preferowane są modele z niższą wartością funkcji testowej
- wartość błędu kwadratowego – im niższy błąd, tym lepsze dopasowanie modelu

Pytania kontrolne

1. Wybór odpowiedniego modelu wymaga pewnego doświadczenia. Jednak krytycznym elementem jest prawidłowe zaplanowanie badania farmakokinetycznego. Wyobraź sobie sytuację, gdy badacz zaplanował, że będzie pobierać próbki od pacjenta co godzinę. Pierwsza próbka zostanie pobrana po godzinie od podania leku, ostatnia próbka po 12 godzinach od podania.

Zastanów się jakie znaczenie może to mieć w przypadku, gdy:

- dystrybucja leku trwa zazwyczaj kilkanaście minut
- dystrybucja leku wynosi średnio około 1,5 h
- dystrybucja leku trwa średnio około 4-6 godzin

2. Czy zmniejszeniu klirensu leku na ogół towarzyszy wzrost stężenia leku w osoczu, niezależnie od modelu (jedno- czy wielokompartmenowego), który opisuje farmakokinetykę leku?

Odpowiedź brzmi: Tak. Zmniejszenie klirensu leku powoduje, że mniej leku jest usuwane z organizmu w jednostce czasu. Eliminacja leku jest niezależna od modelu. Dlatego stężenie leku w osoczu powinno być wyższe u osób ze zmniejszonym klirensiem leku w porównaniu z osobami z prawidłowym klirensiem leku, niezależnie od zastosowanego modelu jedno- czy wielokompartmentowego.

Piśmiennictwo:

1. Shargel L., Yu A.B.C. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. 7th Edition.* The McGraw Hill Education, 2016.
2. Jambhekar S.S., Breen P.J. *Basic Pharmacokinetics.* Pharmaceutical Press, 2009.
3. Southwood R., Fleming V.H., Huckaby G. *Concepts in Clinical Pharmacokinetics. 7th Edition.* American Society of Health-System Pharmacists (AHSP) Publications, Bathesda, 2018.
4. Hermann T.W. *Farmakokinetyka. Teoria i praktyka.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
5. Derendorf H., Schäfer H.G., Staab A. (aut). Wyska E. (red). *Farmakokinetyka. Podstawy i znaczenie praktyczne.* MedPharm Polska, Wrocław 2013.
6. Skibińska Ł., Hermann T.W. *Ćwiczenia z farmakokinetyki.* Wydawnictwa Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego, Poznań 2003.
7. Ritschel W.A., Kearns G.L. *Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications.* American Pharmaceutical Association, Washington 1999.