

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Stanovení cytostatik používaných v léčbě retinoblastomu pomocí
vysokoučinné kapalinové chromatografie**

Vypracovala:

Eva Tesařová

Školitel:

Ing. Eva Klapková, Ph.D.

Studijní obor:

Zdravotní laborant

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví

Prohlašuji, že jsem v předložené práci použila jen pramenů, které cituji a uvádím
v seznamu použité literatury.

V Praze dne 18.dubna 2008

.....

podpis

SOUHRN

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout a validovat novou metodu umožňující stanovení etoposidu v plazmě a ve sklivci.

Etoposid patří mezi cytostatika, která se užívají k léčbě retinoblastomu a jiných nádorů. Etoposid je možno stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, enzymoimunoanalyticky nebo radioimunoanalýzou. Etoposid se v plazmě až z 95% váže na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin a volná koncentrace léčebné dávky je proto nízká. Monitorování hladiny etoposidu umožňuje efektivnější a bezpečnější možnost léčby.

Etoposid byl stanovován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí při 229 nm. V průběhu vývoje metody byla zjišťována její přesnost, robustnost, linearita a rozsah a mez detekce. Metoda byla vyzkoušena na přibližně 200 vzorcích plazmy a sklivce králíků. Kalibrační křivka je lineární do 80 µg/ml a to jak v plazmě, tak i ve sklivci. Variační koeficient u opakovatelnosti, reprodukovatelnosti i robustnosti byl nižší než 10%. Bylo zjištěno, že opakované rozmrazování vzorku nemá na stanovení etoposidu žádný vliv.

Tato metoda je vhodná pro stanovení etoposidu ve sklivci a v plazmě.

Klíčová slova: etoposid, retinoblastom, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UV detekce

SUMMARY

The goal of this bachelor's thesis was to develop and validate a new method enabling detection of etoposide in plasma and the vitreous humour.

Etoposide belongs to the group of cytostatics used for retinoblastoma and other tumours treatment. It is possible to determine etoposide by high performance liquid chromatography, enzimoimmunoanalytically, or by radioimmunoanalysis. Etoposide is tied in plasma up to 95% to plasmatic proteins, namely albumin, and that is why the drug dosage is low.

Monitoring of the etoposide level enables more effective and safer possibilities of treatment.

Etoposide is determined by high performance liquid chromatography with UV detection at 229 nm. During the evaluation of the method its accuracy, robustness, linearity and range and limit of detection was checked. The method was checked on 200 plasma and vitreous humour of rabbits. Calibrating curve is linear up to 80 µg/ml in plasma as well as in the vitreous humour. Variation coefficient regarding the repeatability, reproducibility and robustness was lower than 10%. It was found out that repeated de-freezing of the sample does not effect the etoposide determination.

This method is suitable for determination of etoposide in vitreous humour and plasma.

Keywords: etoposide, retinoblastoma, high performance liquid chromatography, UV detection

Především bych chtěla poděkovat mé školitelce Ing. Evě Klapkové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a všestrannou pomoc, kterou mi během mojí práce poskytla.

Dále děkuji všem pracovníkům Ústavu klinické biochemie a patobiochemie FN Motol za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Ráda bych také poděkovala svým rodičům, za jejich podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

OBSAH

	strana
1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Retinoblastom	2
2.1.1 Histologie	2
2.1.2 Klinický obraz	2
2.1.3 Diagnóza	4
2.1.4 Léčba	4
2.1.5 Prognóza	5
2.2 Etoposid	6
2.2.1 Cytostatika	6
2.2.2 Charakteristika	6
2.2.3 Farmakokinetika	7
2.2.3.1 Absorpce a distribuce	7
2.2.3.2 Metabolismus a vylučování	8
2.2.4 Indikace	9
2.2.5 Nežádoucí účinky	9
2.2.6 Dávkování	10
2.2.6.1 Způsob podávání	10
2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC	11
2.3.1 Základní definice a rozdělení chromatografických metod	11
2.3.2 Kapalinová chromatografie	11
2.3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	12
2.3.4 Způsoby detekce etoposidu	14
2.3.4.1 Detekce pomocí HPLC	14
2.3.4.2 Detekce pomocí imunochemických metod	15

2.4 Validace metody	17
2.4.1 Linearita a rozsah	17
2.4.2 Mez detekce	18
2.4.3 Přesnost	18
2.4.4 Robustnost	19
2.4.5 Správnost (pravdivost)	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1 Materiál a metody	20
3.1.1 Přístroje	20
3.1.2 Ostatní materiál	21
3.1.3 Reagencie	21
3.1.4 Příprava reagensů	22
3.1.4.1 Příprava mobilní fáze	22
3.1.4.2 Příprava zásobního roztoku etoposidu	22
3.1.4.3 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu	23
3.1.5 Vzorok pro HPLC	23
3.1.6 Příprava vzorku pro stanovení HPLC	24
3.1.7 Chromatografická analýza vzorku	24
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	26
4.1 Výsledky validace metody	26
4.1.1 Linearita a rozsah	26
4.1.2 Mez detekce	28
4.1.3 Přesnost	29
4.1.4 Robustnost	31
4.1.5 Správnost (pravdivost)	32
4.2 Výsledky stanovení etoposidu	33
4.2.1 Výsledky stanovení etoposidu v plazmě	33
4.2.2 Výsledky stanovení etoposidu ve sklivci	40

5. ZÁVĚR	45
6. LITERATURA	46
7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	49

1. ÚVOD

Retinoblastom je nejčastější intraokulární maligní nádor u dětí. Přibližně 60-70% nádorů vzniká nedědičně na podkladě sekundárních mutací a dochází k jednostrannému postižení. Oboustranný nádor vzniká ve 30-40% a je způsoben dědičně přítomností Rb1 genu. Nádor je charakteristický rychlým růstem a následným vytvářením metastáz v CNS, plicích, kostech a mozku. Včasná diagnóza je nezbytná pro celkovou záchranu života pacienta. Léčba retinoblastomu prošla v posledních letech výraznou změnou ve vývoji a léčebných možnostech. Cílem léčby je v první řadě zachránit život pacienta a sekundárně oko. V dnešní době máme několik možností léčby spočívající v laserové terapii, radioterapii, chirurgické léčbě a chemoterapii. Hlavní složkou léčebného protokolu je chemoterapie a radioterapie. Chemoterapie se považuje za nejúčinnější léčebnou metodu. Nejčastěji používanými cytostatiky jsou karboplatina, cysplatina a etoposid^{1,2,3,4,5,6}.

Etoposid je derivát podofylotoxinu s glykosidicky navázanými substituenty. Patří do skupiny cytostatik poškozující DNA inhibicí topoizomerázy. Etoposid se v plazmě až z 95% váže na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin a volná koncentrace léčebné dávky je proto nízká. Detekován byl ve slinách, játrech, slezině, ledvinách, myometriu, zdravé mozkové tkáni a mozkových tumorech. Přibližně 30-50% etoposidu se vylučuje v nezměněné formě močí. Zbytek se metabolizuje primárně na hydroxykyselinu etoposidu a glukuronidové a sulfátové konjugáty. Etoposid je indikován k monoterapii nebo ke kombinované terapii s dalšími cytostatickými látkami (vincistrin, karboplatina a jiné)^{7,8,9,10,11}.

Stanovení hladin léků umožňuje bezpečnější a účinnější léčbu. Vysokou účinná kapalinová chromatografie představuje hlavní metodické zajištění kvantitativní analýzy léčiv a jejich metabolitů v biologických tekutinách^{12,13}.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Retinoblastom

Retinoblastom je primární zhoubný nádor sítnice, který vychází z embryonálních nediferencovaných i diferencovaných retinoblastů⁴. Je nejčastějším primárním intraokulárním maligním nádorem u dětí². Jeho frekvence je zhruba 1:20 000 porodů^{1,3}. Retinoblastomy jsou v 70% jednostranné (unilaterální), většinou na podkladě nedědičné somatické mutace. Další možnosti vzniku nádoru jsou dědičné (mutace jednoho ze zdravých rodičů a přenos chromozomální poruchy, což je delece intermediární části dlouhého raménka 13. chromozomu 13 q), týká se to hlavně oboustranných (bilaterálních) retinoblastomů^{1, 2, 14}. Z toho plyne i nutnost kontroly zdravých sourozenců, neboť se jedná o onemocnění autosomálně dominantně dědičné se 70 až 90% penetrací. Pro genetické poradenství platí, že vlastní dítě pacienta s odléčeným oboustranným nádorem bez závislosti na pohlaví má 50% pravděpodobnost vzniku nádoru. Děti pacientů s vyléčeným jednostranným retinoblastomem mají pravděpodobnost vzniku nádoru relativně menší, neboť genetický podklad jednostranného nádoru není pravidlem. Asi 70% onemocnění se projeví v prvních třech letech života, povětšinou do druhého roku. Jen zcela vyjimečně onemocní dítě starší 6 roků.^{1,3}

2.1.1 Histologie

Místem vzniku retinoblastomu jsou jádrové vrstvy sítnice⁴. Histologicky se jedná o nádor neuroepitelového původu, tvořený malými nediferencovanými buňkami s velkými hypochromními jádry a malým množstvím cytoplazmy. V nádoru jsou často přítomny kalcifikace, někdy je možno zastihnout tzv. Flexnerovi-Wintersteinerovy rozety, které jsou známkou vyžívání.

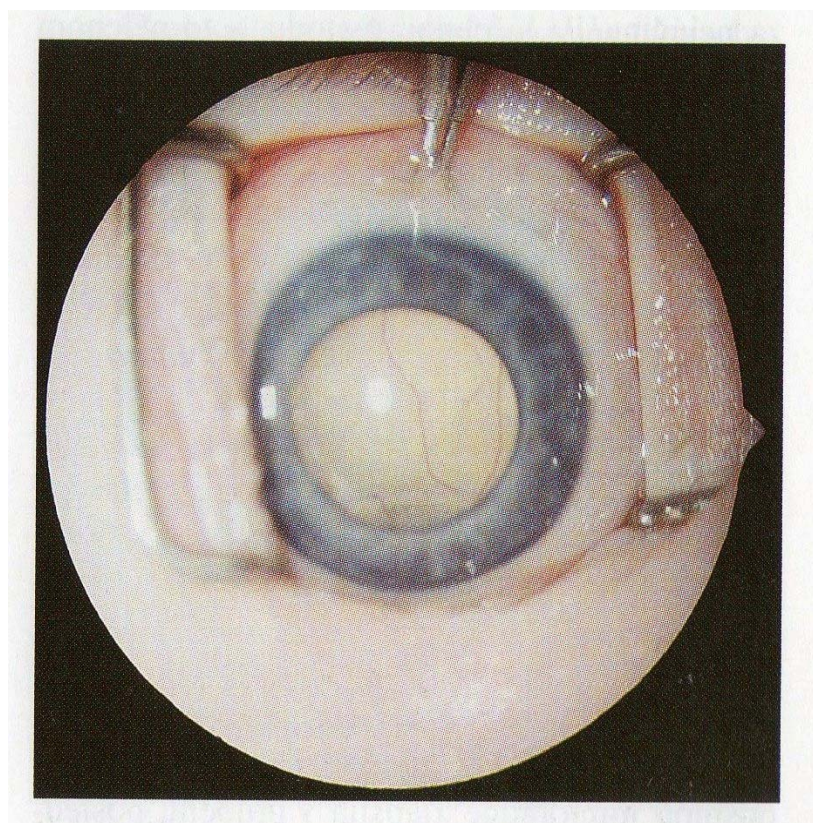
Retinoblastom je charakterizován rychlým růstem, záhy vyplňuje sklivcovou dutinu, po úplném postižení bulbu prorůstá do orbity, optického nervu a do CNS. Metastazuje převážně hematogenně do kostní dřeně, kostí i do jiných orgánů¹⁵.

2.1.2 Klinický obraz

Počínající malý bílý až šedavý retinoblastom je náhodným nálezem při vyšetření dítěte s pozitivní rodinnou anamnézou nebo je odhalen na méně postiženém oku při oboustranném výskytu. Nádorová ložiska mohou být mnohočetná. Ložisko nádoru na zadním pólu oka se

může projevit strabismem¹. Proto každé malé šilhající dítě je nutno vyšetřit v mydriáze. Tyto počínající nálezy jsou označovány jako oftalmoskopické stádium retinoblastomu.

U většiny dětí je retinoblastom diagnostikován až ve pokročilém stadiu amaurotického kočičího oka (Beerův příznak, Leukokorie)^{1,4}. Zornice je světlá, šedobílá či nažloutlá. To je způsobeno tím, že sklivcový prostor je vyplněn tumorózními masami (endofytický růst), nebo za čočkou je sítnice tlačena kupředu tumorem rostoucím za sítnicí (exofytický růst)³. Široká zornice je amauroticky ztuhlá, často jsou nacházeny nádorové uzlíčky na duhovce či nádorové buňky sedimentují na dně přední komory (pseudohypopyon). Leukokorie a strabismus jsou nejčastěji se vyskytujícími znaky retinoblastomu. Pokročilý retinoblastom může vyvolat bolestivý sekundární glaukom – glaukomatózní stádium. Ve stadiu generalizace neléčený retinoblastom prorůstá, metastazuje a způsobuje smrt dítěte⁴. Metastázy se zpravidla objeví během 12 měsíců. Nejběžnější metastázy nastanou přímou invazí - cestou optického nervu do centrálního nervového systému. Nádor se také může šířit přes subarachnoideální prostor do kontralaterálního optického nervu, cerebrospinální tekutinou do CNS nebo hematogenní cestou do plic, kostí a mozku¹.



Obr.1: Prominující bělavé hmoty retinoblastomu viditelné v zornici – charakteristická leukokorie¹⁵

2.1.3 Diagnóza

Diagnózu stanoví pečlivé oční vyšetření, které se většinou u malých dětí provádí v celkové anestezii¹⁶. Oční vyšetření může být ještě doplněno ultrazvukovým a CT vyšetřením bulbu a orbity¹⁷. Nádor je svou lokalizací tak typický, že není vyžadována ani histologická diagnostika. V rámci stanovení rozsahu nádoru je nutné vyšetření obou očí, NMR mozku a míchy, vyšetření mozkomíšního moku¹⁶. Pozdní diagnóza zvyšuje riziko rozvinutí choroby a snižuje šance na vyléčení.

Pokrok v diagnóze retinoblastomu byl učiněn ve Švýcarsku. Cílem studie bylo stanovení co nejkratší doby v diagnóze retinoblastomu během 40 let. Retrospektivní studie byla provedena porovnáním tří období. Znatelně byl snížený diagnostický interval u jednostranného retinoblastomu. Celkově byl diagnostický interval snížený o 6,97 měsíců v prvním období, o 3,58 měsíců ve druhém období a o 2,25 měsíců v období třetím².

2.1.4 Léčba

Léčba retinoblastomu je komplexní a nutně individuální podle rozsahu onemocnění. Odlišný přístup vyžaduje lokalizované intraokulární postižení malého rozsahu, zcela jiný je léčebný postup u pokročilých forem nitroočního postižení, například s extraokulárním šířením či postižením metastatickým.

Chirurgická léčba spočívající v enukleaci bulbu byla dříve základním léčebným přístupem. Počátkem 80.let bylo enukleováno téměř 95% pacientů¹⁵. V současné době je většinou enukleace oka indikována u jednostranných retinoblastomů. Nádor je většinou v pokročilém stadiu, oko je slepé, jde o život zachraňující výkon⁵. Pro oboustranný retinoblastom platí, že bulbus s pokročilejším tumorem se enukleuje a druhé oko se léčí s cílem tumor zničit a zachránit co nejlepší vidění³. Velmi malé nádory zadního pólu lze destruovat laserovou fotokoagulací, malá nádorová ložiska při ora serrata kryokoagulací. Před destrukcí se nejprve nádorové ložisko obkrouží koagulačními body a blokují se odvodné cévy⁴.

Hlavní složkou léčebného protokolu zůstává chemoterapie a aktinoterapie, kterou zajišťují specializovaná onkologická centra³.

Radioterapie je vzhledem k vysoké radiosenzitivitě rovněž účinnou metodou. Používá se jak zevní ozáření (aktinoterapie), tak brachyradioterapie radioaktivní plombou. Rizikem je vznik sekundární malignity v ozařované oblasti i mimo ni (častěji u zevní radiace než při

brachyradioterapii). Aktinoterapie se aplikuje v podobě γ - záření z megavoltážních zdrojů nebo v podobě β - záření z disků obsahujících radioaktivní ruthenium či rubidium. Zářiče se přiřívají na sklěru v místě nádoru⁵.

Chemoterapie se v současné době považuje za neúčinnější léčebnou metodu, a to nejenom u pokročilého onemocnění, ale i u forem lokalizovaných. Redukce nádorových mas zvyšuje šance na zachování zraku postiženého oka při omezení rizik léčebných následků. Neoadjuvantní chemoterapie je tedy zpravidla úvodní léčebnou metodou. Používá nejčastěji kombinace etoposidu a cisplatiny. V poslední době se popisují též příznivé účinky lokální chemoterapie subkonjunktivální aplikací karboplatiny. Tato modalita má význam především u sklivcových metastáz, neboť průnik cytostatik do sklivce je při systémové chemoterapii omezený¹⁵. Adjuvantní chemoterapie se užívá i po enukleaci jednostranných intraokulárních nádorů. Podává se vincristin a cyklofosamid. Při prokázaném extrabulbárním šíření či u neenukleovaného druhého bulbu zasaženého nádorem se léčebné schéma rozšiřuje o adriamycin a methotrexát a oblast nádoru, orbita či bulbus se ozařuje magalovoltážním zdrojem³. K léčbě bilaterálního retinoblastomu se v současné době podává samotná karboplatina, nebo v kombinaci s etoposidem a vincristinem^{6, 18}.

2.1.5 Prognóza

Prognóza pacientů s retinoblastomem se díky časnější detekci a využití moderních terapeutických postupů mimořádně zlepšila v průběhu posledních 40 let. U intraokulárních, lokalizovaných forem jsou léčebné výsledky vynikající. Pět let přežívá 95 – 100% pacientů. Další úsilí bude směřovat k zachování vizu a minimalizaci pozdních léčebných následků. Extrabulbární průnik nádoru, postižení orbity nebo vzdálené metastázy i nadále významně negativně ovlivňují prognózu pacientů, která je u extraokulárně se šířících forem vysoce nepříznivá (vyléčí se jen 10 % dětí) a vyžaduje maximálně intenzivní přístup¹⁵.

2.2 Etoposid

2.2.1 Cytostatika

Cytostatika jsou chemické sloučeniny, jejichž účinku se využívá k léčbě nádorových onemocnění¹⁵. Cytostatika tlumí zejména růst tkání s vysokou proliferační rychlostí. Protože se nádorová tkáň většinou dělí obzvláště rychle, cytostatika ji také nejvíce postihují. Společně s ní však je postižena i zdravá tkáň s vysokou frekvencí buněčného dělení a vznikají nežádoucí účinky, jako útlum kostní dřeně, poškození sliznic trávicího ústrojí, vypadávání vlasů; to limituje dávkování. Během terapie se může vyvinout rezistence nádorů vůči použitému cytostatiku⁹.

Podle mechanismu účinku lze cytostatika rozdělit do několika skupin:

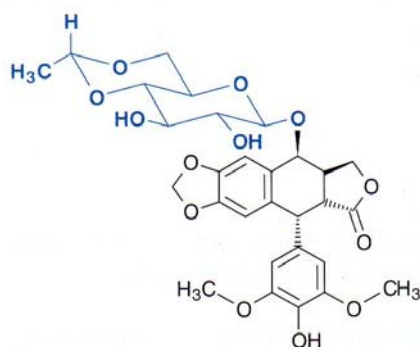
- Léčiva poškozující DNA
 - kovalentní vazbou na DNA
 - uvolněním reaktivní platiny
 - interkalací
 - inhibicí topoizomerázy
- Látky ovlivňující syntézu DNA
- Látky působící interakcí s mikrotubuly (s mitotickým vřetenkem)
- Látky ovlivňující regulační pochody organismu
- Látky působící dalšími mechanismy⁹

2.2.2 Charakteristika

Etoposid je derivát podofylotoxinu s glykosidicky navázanými substituenty^{7, 8}. Podofylotoxin pochází z mandragory (*Podophyllum peltatum*) a je inhibitorem mitotického dělení⁹. Mechanismus účinku je založený na indukci fraktur jednoduchého a dvojitého vlákna DNA, intracelulární tvorbě volných radikálů a interakci s enzymem topoizomerázou II^{18, 19}. Účinnost je specifická pro buněčný cyklus, konkrétně bylo maximum účinku pozorováno v S a G2 fázi¹⁰. Cytotoxický účinek na normální zdravé buňky byl pozorován pouze po velmi vysokých dávkách.

Na buňkách savců byl prokázán mutagenní a genotoxický účinek etoposidu. Etoposid vyvolává aberace počtu a struktury chromozomů v embryonálních buňkách hlodavců a v lidských buňkách hematopoetického systému. Dále byly popsány mutace v ovariálních buňkách čínských křečků a rozrušení vláken spolu s tvorbou vazeb mezi DNA a proteiny

v myších leukemických buňkách, které vedou k destrukci DNA. Látka je u lidí považována za potenciálně karcinogenní²³.



etoposid, epipodofylotoxin
modře: glykosidická část
černě: složka blízka podofylotoxinu

Obr.2: Chemická struktura etoposidu⁹

2.2.3 Farmakokinetika

2.2.3.1 Absorpce a distribuce

Etoposid po i.v. podání vykazuje bifázickou aktivitu s distribučním poločasem kolem 1,5 hodiny a terminálním eliminačním poločasem 4 až 11 hodin. Celková clearance látky se pohybuje mezi 33-48 ml/min nebo 16-36 ml/min a stejně jako terminální eliminační poločas je v dávkovacím rozmezí 100-600 mg/m² na dávce nezávislá²³.

Biologický účinek léku je dán jeho reverzibilní vazbou na tkáňové receptory. Intenzita a trvání biologického účinku jsou závislé na koncentraci léčiva v oblasti receptoru, přičemž přesný popis interakce léku s receptory není znám. K tomu, aby byl vyvolán požadovaný biologický účinek musí léky reagovat s receptory, které řídí procesy požadovaného biologického účinku. Pro většinu léků je intenzita farmakologického účinku úměrná koncentraci léčiva v extracelulární tekutině, která určuje dostupnost léčiva pro interakci se specifickými tkáňovými receptory. In vivo existuje rovnováha mezi koncentrací volného léčiva v plazmě a koncentrací léčiva v extracelulární tekutině. Metoda, která umožňuje měření koncentrací volného léčiva, dává informaci o koncentracích léčiva v oblasti receptorů¹³.

Etoposid se v plazmě až z 95% váže na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin a volná koncentrace léčebné dávky je proto nízká⁸. Existuje rovnováha mezi volnou a vázanou formou léčiva. Volná forma léčiva je schopna přestupu přes lipoproteinové komplexy membrán a tím je schopna dostupit k příslušným specifickým receptorům¹³. Vázaná

koncentrace je důležitější z hlediska toxicity pro organismus, než celková koncentrace etoposidu v plazmě během léčby. V nádorové tkáni je koncentrace etoposidu nižší, než v plazmě^{20,21}. Systémové vystavení volné koncentraci léku může být nejužitečnější farmakokinetický parametr pro farmakodynamické studie a eventuálně pro terapeutické monitorování léku. Robieux et al. potvrzuje klinickou proveditelnost HPLC metody pro sledování volné koncentrace etoposidu u onkologických pacientů²¹. Vazba na plazmatické bílkoviny může být klinicky významná při hypoalbuminémii, kdy se zvyšuje aktivní nevázaná frakce v plazmě, která je dostupná pro distribuci do tkání. Popsána je také jeho schopnost soutěžit o vazbu na plazmatické bílkoviny, např. s bilirubinem¹⁹.

Etoposid se sice široce distribuuje do tkání, jeho penetrace přes hematoencefalickou bariéru je však nízká¹⁹. Minimálně proniká do pleurální dutiny, detekován byl ve slinách, játrech, slezině, ledvinách, myometriu, zdravé mozkové tkáni a v mozkových tumorech¹⁰. Někteří pozorování svědčí pro minimální průnik etoposidu do žluče. Není jasné, zda etoposid proniká do mateřského mléka. Látka u experimentálních zvířat proniká placentou. Etoposid málo proniká do CNS (koncentrace v mozkomíšním moku se pohybují od nedetekovatelných do 5% plasmatických koncentrací během prvních 24 hodin po i.v. podání látky, a to i po podání vysokých dávek)²³.

2.2.3.2. Metabolismus a vylučování

Jaterní enzymy, které se převážně podílejí na metabolismu léků, jsou charakterizovány substrátovou nespecifičností, tudíž jsou schopny metabolizace široké palety chemických struktur. Metabolismus etoposidu nebyl dosud zcela objasněn. Látka je nejspíše metabolizována především na hydroxykyselinu, která je farmakologicky inaktivní. Dalšími metabolity jsou glukuronát a sulfátové konjugáty. Tyto deriváty mají in vitro minimální cytotoxickou aktivitu. Látka je vylučována renálně i extrarenálně, tzn. metabolisací a biliární exkrecí⁸. Vliv snížené funkce ledvin na exkreci etoposidu není znám. Vylučování žlučí je pravděpodobně nevýznamné, po intravenózním podání lze ve žluči detekovat maximálně 6% podané látky ve formě etoposidu a metabolismus je pravděpodobně hlavním mechanismem extrarenální exkrece¹⁰. Hlavním metabolitem přítomným v moči je hydroxykyselina. Glukuronid a sulfátové konjugáty vylučované do moči představují 5-22% podané dávky. U dospělých koreluje celková clearance etoposidu s kreatininovou clearancí, sérovou koncentrací albuminu a nonrenální clearancí.

U dětí se během 24 hodin vylučuje do moči přibližně 55% látky ve formě etoposidu. Průměrná renální clearance je 7-10 ml/min/m² nebo asi 35% celkové clearance při dávce 80-600 mg/m²(23).

2.2.4 Indikace

Etoposid je indikován k monoterapii nebo ke kombinované terapii s dalšími cytostatickými látkami následujících maligních neoplastických onemocnění: testikulární tumory (v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky u pacientů, kteří již absolvovali patřičnou chirurgickou, cytostatickou a radiační terapii), choriokarcinom, karcinom ovárií, malobuněčný a nemalobuněčný bronchogenní karcinom (jako lék první volby v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky), Hodgkinův a NonHodgkinovy lymfomy, akutní myeloblastická leukémie, karcinom žaludku¹¹.

Etoposid byl indikován v režimu mini ICE (ifosfamid, karboplatina, etoposid) pacientům s metastazujícím karcinomem prsu po selhání atracyklinů nebo antracyklinů a taxanů. Výsledky studie prokázali efektivnost a účinnost této léčby. Větší efektivita byla pozorována ve skupině pacientek mladších 50 let²².

2.2.5 Nežádoucí účinky

Většina nežádoucích účinků etoposidu je při včasném záchytu reversibilní. Při těžkých reakcích je nutné upravit dávkování nebo léčbu přerušit a zaměřit se na léčbu komplikací. Útlum kostní dřeně závisí na velikosti podané dávky a je tedy faktorem limitujícím velikost dávky. K největšímu poklesu v počtu granulocytů dochází mezi sedmým a čtrnáctým dnem a v počtu trombocytů mezi devátým a šestnáctým dnem. Úprava se obvykle dostavuje do dvacátého dne po podání. Dosud nebyla popsána kumulativní toxicita. Frekvence toxických projevů postihujících krvetvorbu je 60-91% při leukopenii pod 4x10⁹ /l a 3-17% pod 1x10⁹ /l, 22-41% při trombocytopenii pod 100x10⁹ /l a 1-20% pod 50x10⁹ /l nebo 33% při anemii. U pacientů léčených etoposidem v kombinaci s dalšími protinádorovými léky je vzácně popisován výskyt akutní leukémie.

Gastrointestinálními příznaky jsou zvracení a nauzea. Stupeň závažnosti těchto projevů je obvykle mírný až střední. Dobře reagují na běžná antiemetika, k přerušení léčby vedou u 1% pacientů. Frekvence gastrointestinálních nežádoucích projevů je následující:

nauzea/zvracení (31-43%), anorexie (10-13%), průjem (1-13%), bolesti břicha (< 2%), stomatitis (1-6%), hepatotoxicita (< 3%)²³.

U 1-2% pacientů byla popsána přechodná hypotense po rychlém intravenózním podání. Nebyla prokázána souvislost tohoto symptomu s kardiotoxicitou nebo změnami EKG. Jako prevence této vzácné komplikace je podávání etoposidu v pomalé intravenózní 30-60 minutové infuzi. Při zjištění významnějšího poklesu krevního tlaku obvykle stačí přerušit infuzi a podat náhradní roztoky, eventuelně i další vhodnou terapii.

Anafylaktické reakce spojené se zimnicí, horečkou, tachykardií, bronchospasmem, dyspnoí a hypotensí byly popsány u 0,7-2% pacientů. Tyto komplikace obvykle rychle ustupují po přerušení infuze a po podání presorických látek, kortikosteroidů, antihistaminik nebo volumoexpandérů. Byla popsána jedna fatální anafylaktická reakce s bronchospasmem. Rovněž byla pozorována hypertense a zčervenání kůže. Krevní tlak se obvykle normalizuje během několika hodin po přerušení infuze.

Až u 66% pacientů byla pozorována reversibilní alopecie, která může progredovat až do úplné ztráty vlasů^{10,23}.

Vzácně byly popsány chuťové abnormality, vyrážka, horečka, abnormální pigmentace, pruritus, bolesti břicha, zácpa, dysfagie a přechodná korová slepota. U pacientů léčených vysokými dávkami etoposidu je uváděna hepatotoxicita a metabolická acidosa²³.

2.2.6 Dávkování

Etoposid se podává v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky po dobu pěti dní. Chemoterapeutické kúry se mohou opakovat v 3-4 týdenních intervalech po úpravě toxických projevů.

2.2.6.1 Způsob podávání

Etoposid se podává pouze v pomalé intravenózní infuzi (obvykle během 30-60 minut). Při podávání v kombinaci s dalšími myelotoxickými látkami nebo s radioterapií musí být dávka přizpůsobena.

Etoposid se ředí 0,9% chloridem sodným nebo 5% glukosou na konečnou koncentraci roztoku 0,2 mg/ml nebo 0,4 mg/ml. Infuze etoposidu se nemá míchat s jinými farmaky. Roztok obsahující sraženiny je třeba znehodnotit²³.

2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC

2.3.1 Základní definice a rozdělení chromatografických metod

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fázi zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fázi poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované²⁴.

chromatografie :

a) plynová (GC) - (adsorpční a rozdělovací)

b) superkritická fluidní (SFC)

c) kapalinová (LC) - kolonová (HPLC) - (adsorpční, rozdělovací, gelová a iontově výměnná)

- planární (plošná) - (papírová (PC) a tenkovrstvá (TLC))²⁵

2.3.2 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. O separaci složek rozhodují nejen interakce se stacionární fází, ale rovněž použitá mobilní fáze. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt, nebo specifické interakce v afinitní chromatografii.

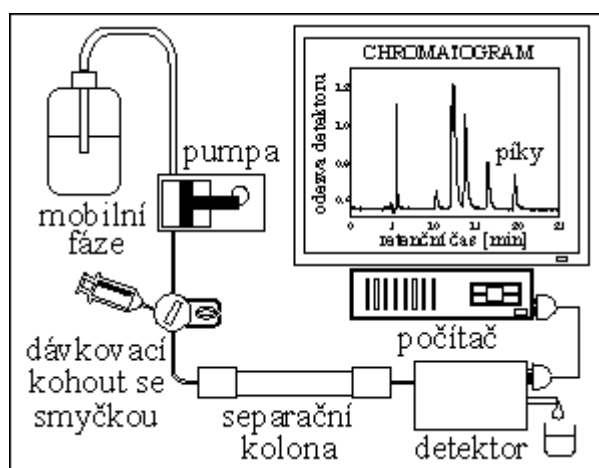
V klasické kapalinové chromatografii plníme skleněnou trubici na konci zakončenou fritou a kohoutem, zrnitým sorbentem s velkým průměrem částic. Na horní vrstvu náplně dávkujeme malé množství vzorku a pak přidáváme mobilní kapalnou fázi (eluent). Působením gravitační síly mobilní fáze postupuje kolonou, složky vzorku se od sebe separují a v různých časech opouštějí spodní část kolony.

Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem vysoce účinné kapalinové chromatografie – HPLC.

2.3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC pracuje na principu klasické kolonové chromatografie. K účinné separaci je nutno použít dostatečně malých zrníček sorbetu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutno pracovat při vysokém tlaku až 35 MPa. Dalšími limitujícími parametry jsou průtok mobilní fáze a citlivé detektory s vnitřním objemem průtokové cely menším než 10 nebo 15 μl ^{24, 26}.

Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf.



Obr.3 Schéma kapalinového chromatografu²⁵

Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač (nástríkový ventil, autosampler), kolona a detektor.

Mobilní fází může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru.

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10 μm), na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (C8 – oktan, C18 – oktadekan), nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. -CN) apod.¹².

Účelem pumpy vysokoučinného kapalinového chromatogramu je dopravovat mobilní fází konstantním průtokem od 0,6 do 2 ml za minutu a s minimem tlakových pulsů, popř. zajistit mísení mobilní fáze pro gradientovou eluci. Čerpadla bývají rozdělena na pulsni a nepulsni. Pulsni čerpadla mají objem pracovní komory poměrně malý a potřebného průtoku se dosahuje mnohokrát opakovaným stlačením a vypuzením mobilní fáze z pracovní komory

čerpadla. Nepulzní čerpadla pracují s objemem daleko větším, 100 až 500 ml, což umožňuje provést bez opětného plnění čerpadla řadu analýz. Bezpulzní čerpadla zpravidla poskytují hladší průtok mobilní fáze a nevyžadují speciální přídavné zařízení pro tlumení tlakových pulsů, ale přesnost tvorby gradientu mobilní fáze je podstatně horší. K formování gradientu nebo k vytvoření izokratického systému se používá buď míšení komponent před čerpadlem, na nízkotlaké straně, nebo za čerpadlem (vysokotlaká strana). Určujícím parametrem je minimální kolísání tlaku, které je možné zajistit pouze v dokonale odplyněném systému mobilní fáze. Rozpuštěný plyn je příčinou kolísání tlaku v chromatografickém systému provázeném snížením elektrické stability a detekční citlivosti detektorů. Odstranění tlakové pulsace pomocí dokonale odplyněných rozpouštědel je základním předpokladem pro reprodukovatelné stanovení koncentrací léčiv v biologických tekutinách^{13, 26}.

Nedokonalý způsob dávkování vzorku může být příčinou snížení účinnosti kolon. Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky, injekční stříkačky, nebo automatického dávkovače^{12, 24, 26}.

U HPLC má výběr kolon a jejich příslušenství rozhodující význam. Účinnost kolony závisí na kvalitě použitého sorbetu, na délce kolony, na jejím tvaru, na materiálu z něhož je zhotovena, na jejím vnitřním povrchu i na různých dalších faktorech. Kolony pro potřeby terapeutického monitorování léků jsou nejčastěji vyrobeny z nerezové oceli o vnitřním průměru 4,6 mm a délky 10 – 50 cm. Náplně kolon je možné rozdělit na sorbety nepolymerizované (SiO_2 ; Al_2O_3) a polymerizované (syntetizovány na principu prostorové sítě složené ze styren-divinyl-benzenu)^{13, 26}.

Detektory v HPLC by měli být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, fluorescenční a elektrochemický. Při terapeutickém monitorování léků je využito té skutečnosti, že řada léčiv obsahuje konjugované dvojně vazby nebo aktivní skupiny v organické struktuře molekuly, které jsou schopny absorpce v ultrafialové (UV) nebo viditelné (VIS) oblasti světelného záření. UV-VIS detektor se stal tedy nejužívanějším detektorem při terapeutickém monitorování léků. UV detektor měří absorbanci fluátu protékajícího mikrokyvetou²⁷. Detektor s kontinuálním zdrojem a malým monochromátorem umožňuje sledovat látky absorbující v rozmezí vlnových délek od 200 do 800 nm. Výhodou detektoru s proměnnou vlnovou délkou je možnost jeho nastavení na

vlnovou délku, při které je maximální absorpce analyzovaných látek. Tím je dosaženo maximální detekční citlivosti i specifity¹³.

Mobilní fáze je (při izokratické eluci) vedena buď z jednoho ze zásobníků do vysokotlakého čerpadla, anebo (při gradientové eluci) se přiváděné proudy z obou zásobníků mísí podle programu ve směšovači zařazeném buď před nebo za vysokotlakým čerpadlem. Podle druhu čerpadla je zařazen do toku mobilní fáze tlumič tlakových rázů, z něhož je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony. Kolona je spojena přímo s detektorem, z něhož může být výstup do sběrače frakcí. Z detektoru jde signál přes zesilovač do zapisovače, event. i do integrátoru. Mobilní fáze je vyhodnocena příslušným počítačovým softwarem. Vliv mrtvých prostorů chromatografu musí být omezen na minimum, protože jinak dochází k rozšiřování elučních křivek nad únosnou míru, čímž zanikají výhody vysokoúčinných kolon²⁶.

2.3.4 Způsoby detekce etoposidu

2.3.4.1 Detekce pomocí HPLC

Rong Zhou et al. detekoval v lidské plazmě celkovou a volnou koncentraci etoposidu a hladinu etoposidu v leukemických buňkách pomocí HPLC s elektrochemickým detektorem. Mobilní fáze obsahovala vodu-methanol-acetonitril-kyselinu octovou (52:43:4:1), stacionární fází byl Nucleosil 7 μm (Phenomenex). Analytická kolona byla vybavena s New Guard Phenyl předkolonou, průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Detekce byla provedena s Coulochem II elektrochemickým detektorem s dvojitou elektrodou Model 5020. Příprava vzorku zahrnuje extrakci s chloroformem a ultrafiltraci²⁸.

Chen Ch.-L. a Uckun F.M. stanovovali hladinu etoposidu v lidském séru a v plazmě pomocí HPLC – hmotnostní detekcí – ionizace elektrosprayem. Etoposid byl separován kolonou Lichospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm), velikost částic 5 μm , s mobilní fází acetonitril-voda (45/55) obsahující 0,1% kyselinu octovou. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, detekce byla provedena při 206 nm²⁹.

I.Robieux et al. popisují HPLC metodu s fluorescenční detekcí pro stanovení volné koncentrace etoposidu v plazmě. Příprava vzorku zahrnuje ultrafiltraci plazmy, centrifugaci 2000 rpm./30 min. a extrakci chloroformem. Isokratická separace byla provedena na

analytické koloně μ Bondapak phenyl (300 mm x 3,9 mm), o velikosti částic 10 μ m. Mobilní fáze byla acetonitril-voda-kyselina octová (35:64:1), průtok mobilní fáze 1,0 ml. Excitační a emisní vlnová délka 288 nm a 328 nm²¹.

2.3.4.2 Detekce pomocí imunochemických metod

ELISA

Metoda je založena na reakci antigen-protilátka. Tato metoda využívá první fáze reakce – tvorbu imunokomplexů – jako východisko k vysoce senzitivním reakcím s použitím značených antigenů nebo protilátek.

EIA (enzymoimunoanalýza) je analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňuje stanovit v neznámém vzorku koncentraci antigenu nebo protilátky, obecně analytu. Indikátorem imunoanalytické metody je enzymový konjugát. Podle povahy substrátu je možno reakce detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky a luminometricky.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je speciálním druhem EIA. ELISA je buď heterogenní (vyžadující separaci volné a vázané frakce analytu) nekompetitivní – se značenou protilátkou (tzv. sandwich) nebo kompetitivní – buď se značenou protilátkou nebo značeným antigenem³⁴.

Pinkerton C. R. et al. stanovovali hladinu etoposidu v plazmě pomocí kompetitivní imunochemické metody enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. Vzorky byly analyzovány ve dvou ředěních (1/250 a 1/1000) v dubletu na mikrotitrační destičce³⁰.

Saita T. et al. použili k detekci etoposidu velmi senzitivní imunochemickou metodu ELISA, která umožňuje měřit i velmi malé koncentrace. Antiséra etoposidu byly získány imunizací králíků s konjugovaným etoposidem s mercaptosuccinyl bovinním sérem albuminu, použitím DPEM jako heterobifunkční vazbu činidla. Enzymové markery byly taktéž připraveny vazbou etoposidu s beta-D-galaktosidasou pomocí DPEM. Hodnoty pro koncentrace etoposidu byly srovnatelné s detekcí HPLC. ELISA byla nicméně citlivější v detekci nižších koncentrací. ELISA by měla prokázat nové cenné prostředky pro užití v klinických farmakologických studiích³¹.

RIA (radioimunoanalýza)

Radioizotopové metody jsou založeny na stejné reakci jako ELISA. Ke stanovení antigenu používají protilátku značenou radioaktivním prvkem. Po vzniku precipitátů se promytím odstraní nadbytečné volné protilátky a v sedimentu zůstanou komplexy antigen-protilátka-izotop, které je možné detekovat měřiči příslušného záření (gama nebo beta)³⁴.

Kouwa Yamashita et al. stanovovali etoposid v lidské plazmě senzitivní RIA metodou³².

Dah Hsi Ho et.al použil ke stanovení etoposidu RIA metodu s použitím tritiem značeného ligandu a antiséra produkovaného z králíků imunizovaných sukcinyl etoposidem boviním sérem albuminu³³.

Enzymoimunoanalytické metody stanovení léčiv umožňují využití jednoduchých spektrofotometrů či fluorimetrů až po úplné automatizované postupy. Tyto imunotechniky však neumožňují stanovit odděleně lék od metabolitů. Tato skutečnost je často příčinou zkreslení vztahu mezi koncentrací léčiva a jeho farmakodynamickým účinkem a v klinicko-farmakologické interpretaci výsledků způsobuje určité obtíže. Ekonomické náklady na jednu analýzu jsou při použití imunometod vyšší než u chromatografických metod.

Kvantitativní stanovení léků pomocí radioimunoanalýzy z mikroobjemů séra umožnilo stanovit koncentrace léčiv u většího počtu lékových skupin a relativní jednoduchost metod dala možnost jejich použití pro rutinní terapeutické monitorování. Předností těchto metod je jejich rychlost a jednoduchost. Nevýhodou je nemožnost separovaného stanovení léku a jeho metabolitů. Pro řadu léčiv, které je třeba terapeuticky monitorovat, není možné vytvořit dostatečně citlivé specifické protilátky, které by umožnily jejich stanovení^{13,33}.

V moderních HPLC metodách je mnohdy dostačující pro stanovení 10 μ l séra či plazmy. Předností HPLC metod je možnost použití identického chromatografického systému ke stanovení dvou až tří léků spolu s jejich metabolity. Tato metoda umožňuje simultánní kvantitativní stanovení široké palety léků a jejich aktivních metabolitů. V současné době HPLC představuje hlavní metodické zjištění kvantitativní analýzy léčiv a jejich metabolitů v biologických tekutinách ve všech předních světových laboratořích¹³.

2.4 Validace metody

Výsledky analytických měření mají mimořádně silný dopad v praxi. V klinické laboratoři mohou rozhodným a někdy i fatálním způsobem ovlivnit zdraví, kvalitu života a někdy i samotný život pacienta. Provádět měření o dostatečné kvalitě je profesionální povinností analytika.

Hlavním cílem validace je hodnocení analytických a výkonnostních znaků metod a průkaz, že bylo dosaženo požadované úrovně těchto znaků. V laboratorní medicíně to znamená, že výsledky měření jsou efektivním nástrojem diagnostiky, terapie a prevence. Validace metod je v klinických laboratořích vyžadována normami řízení kvality (ISO 17025, ISO 15189).

Validace je potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Validace potvrzuje, že měřicí postup/měřicí systém/výrobek IVD MD (In vitro diagnostic – medical device) je schopen plnit požadavky na ně kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací^{35,36}.

Obecný postup validace a verifikace:

- Formulovat požadavky, kterých má být pro daný účel použití dosaženo (U výrobků IVD – MD jsou tyto požadavky součástí pracovní dokumentace dodané výrobcem a laboratoř pouze verifikuje jejich platnost)
- Určit rozsah validace, vypracovat plán
- Provést příslušné experimenty
- Vyhodnotit výsledky
- Pokud je nutné, provést opatření k tomu, aby byly specifikované požadavky splněny
- Vytvořit dokumentaci validace³⁵

2.4.1 Linearita a rozsah

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient. Při lineární závislosti nabývá hodnoty +1 a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. Cílem je ověřit platnost rozsahu linearity/pracovního rozsahu měření v podmínkách

konkrétní laboratoře. Tento rozsah vymezuje interval, v němž lze bezpečně očekávat, že platí výrobcem deklarované a validačními experimenty ověřené hodnoty přesnosti a vychýlení metody^{35,36}.

2.4.2 Mez detekce

Mez detekce je definována jako nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno a odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Podmínkou je, že jsou k dispozici chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky, kde směrnice kalibrační přímky b_1 musí být ze koncentrační závislosti $y = b_1x$, kde y je výška chromatografického píku a ne plocha. Výsledky nad mez detekce je možné vydat jako kvalitativní.^{36,37}

2.4.3 Přesnost

Přesnost metody je definována jako míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek. Počet opakování musí být dostatečně velký, aby umožňoval statistické vyhodnocení. Přesnost je statistickým vyhodnocením náhodných chyb, které není možné zcela eliminovat. Náhodné kolísání činnosti přístrojů, pomůcek, teplot atd. vždy způsobuje, že výsledky opakovaných analýz jsou rovnoměrně rozptýleny kolem průměrné hodnoty, přičemž četnost jednotlivých výsledků vykazuje normální rozložení. Mírou rozptylu výsledků je směrodatná odchylka, která závisí na měřené hodnotě, proto se obvykle počítá tzv. relativní směrodatná odchylka neboli variační koeficient.

Podle podmínek, za kterých stanovení probíhá rozlišujeme:

Opakovatelnost

Tato analytická vlastnost charakterizuje metodu a preciznost jejího provedení v laboratoři. Používá se proto označení přesnost v sérii. Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí³⁶

Reprodukovatelnost

Stanovení se provádí postupně, například jednou denně, na témže zařízení. Tím je charakterizována stabilita metody a jejího provádění během celé doby používání. Podmínkou zkoumání přesnosti v čase, která je pro kvalitu laboratorní metody rozhodující, je zajištění stability analytu v kontrolním vzorku po celou dobu měření.

2.4.4 Robustnost

Robustnost metody je definována jako míra vlivu kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení³⁶.

2.4.5 Správnost (pravdivost)

Pravdivost metody je definována jako těsnost souhlasu mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a dohodnutou referenční hodnotou. Mírou pravdivosti je velikost odchylky – bias. Musí se brát průměr více stanovení, protože jednotlivá hodnota může být zatížena náhodnou chybou. Dohodnutá referenční hodnota zastupuje skutečnou hodnotu, která je ve skutečnosti vždy neznámá. Získává se pomocí referenčních metod nejlépe ve velkém počtu různých laboratoří. Pravdivost metody je dána velikostí systematické chyby, která odchyluje výsledek vždy jedním směrem. Můžeme se setkat s konstantní složkou systematické chyby (výsledek je u různé koncentrace odchýlen vždy o stejnou hodnotu) a proporcionalní složkou (výsledek se od skutečné hodnoty liší vždy o stejný násobek)^{36, 37}.

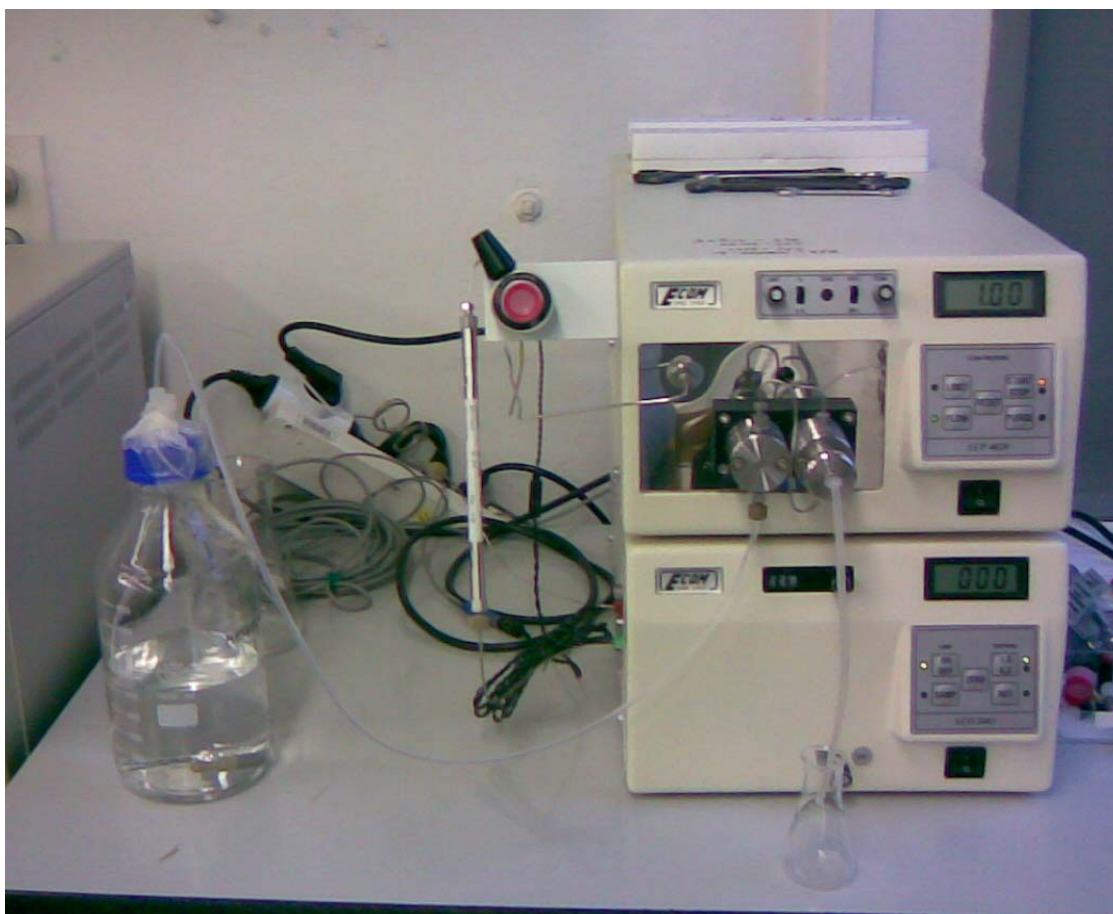
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Přístroje

HPLC sestava :

- čerpadlo LCP 4020 (ECOM)
- UV detektor LCD 2083 (ECOM)
- nástřikový ventil (Rheodyne 7725i)
- nástřiková smyčka 20 μ l
- kolona Supelcosil LC – 18, 15 cm x 4,6 mm x 5 μ m (Sigma – Aldrich)



Obr.4: Sestava HPLC

- analytické váhy AB 135-5 (METTLER – TOLEDO)
- třepačka (KAVALIER)
- centrifuga Megafuge 1.012 (HERAEUS)

- evaporátor vzorků (ECOM)
- ultrazvuk (TESLA)



Obr.5: Evaporátor vzorků

3.1.2 Ostatní materiál

- mikropipety, skleněné pipety, odměrné baňky, odměrné válce, lodička, skleněné lahve (tmavé a světlé), skleněné malé zkumavky se zábrusem, Hamiltonova pipeta, kádinky, eppendorfky

3.1.3 Reagencie

Všechna použitá rozpouštědla byla HPLC kvality.

- 5,5 – Diphenylhydantoin approx. 99% (SIGMA - ALDRICH)
- Etoposide, minimum 98% TLC (SIGMA - ALDRICH)

- Destilovaná voda (MERCK)
- Methanol (MERCK)
- Dichlormethan p.a. (FLUKA)
- Acetonitril (SIGMA – ALDRICH)
- směsná plazma
- směsný sklivec

3.1.4 Příprava reagensů

Příprava roztoku methanol:voda

Roztok je připraven v poměru 1:1. Před každým měřením se musí roztok vložit do ultrazvukové lázně.

3.1.4.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze se skládá z methanolu, destilované vody a acetonitrilu v poměru 55:42:3. Před každým měřením se musí mobilní fáze vložit do ultrazvukové lázně.

3.1.4.2 Příprava zásobního roztoku etoposidu

Na analytických vahách se naváží 0,01177 g etoposidu, kvantitativně převede do 10 ml odměrné baňky a rozpustí v roztoku methanol:voda (1:1). Výsledná koncentrace etoposidu je 1177 µg/ml. Z připraveného zásobního roztoku etoposidu bylo připraveno dle tabulky č.1 10 standardních roztoků v dubletu o následujících koncentracích: 0; 0,5; 1; 5; 10; 20; 40; 80; 100 a 120 µg/ml. Každý standardní roztok byl připraven do celkového objemu 200 µl plazmy nebo sklivce. Použit byl směsný vzorek sklivce od králíků, kteří nebyli testováni na etoposid. Následný postup zpracování kalibračních roztoků pro analýzu je stejný jako postup přípravy jednotlivých vzorků.

výsledná koncentrace (µg/ml)	zásobní roztok etoposidu (µl)	směsná plazma (µl)	10 x naředěný zás.roztok ETO (µl)	vnitřní standard (µl)
0	-	200	-	20
0,5	-	199	1	20
1	-	198	2	20
5	-	190	10	20
10	-	180	20	20
20	-	160	40	20
40	8	192	-	20
80	16	184	-	20
100	20	180	-	20
120	24	176	-	20

Tab.1: Příprava kalibračních roztoků

3.1.4.3 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu

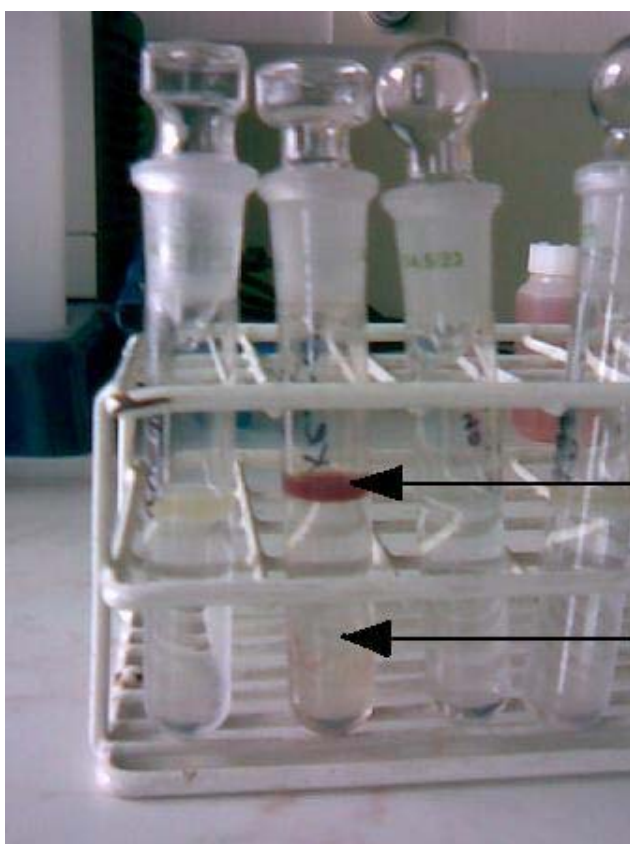
Jako vnitřní standard je použit 5,5 – diphenylhydantoin. Na analytických vahách se naváží 0,01095 g diphenylhydantoinu, kvantitativně převede do 10 ml odměrné baňky a rozpustí v roztoku methanol:voda (1:1). Z připraveného roztoku je odebrán 1 ml do odměrné baňky a doplněn do 10 ml roztokem methanol:voda (1:1).

3.1.5 Vzorky pro HPLC

Jako vzorky jsou použity králičí vzorky sklivce a periferní krve odebrané v časech 0, 1, 2, 6, 24 a 48 hodin a 7 a 14 dní po aplikaci etoposidu. U králíků č.1 – 6 je etoposid dávkován subkonjunktiválně a u králíků č. 7 – 12 intravitálně. Vzorky plazmy byly doručeny do laboratoře ve zkumavkách jako plná krev. Zkumavky byly zcentrifugovány a plazma z nich byla odpipetovaná do eppendorfek. Vzorky sklivce byly doručeny do laboratoře v injekčních stříkačkách. Sklivec byl přepipetován do eppendorfek. Následně byly všechny vzorky zamrazeny na -70°C.

3.1.6 Příprava vzorku pro stanovení HPLC

Do označených zkumavek se zábrusem je napipetováno 200 μ l plazmy či sklivce a 20 μ l vnitřního standardu. Do každé zkumavky se přidá 5 ml dichlormethanu skleněnou pipetou. Zkumavky se dají na 10 minut třepat. Poté se směs centrifuguje 5 min. při 1500 rpm. Ze zkumavek se odpipetují 4 ml čirého roztoku do nových označených skleněných zkumavek. Nakonec se dají zkumavky do evaporátoru vzorků, kde jsou při 37°C sušeny pod proudem vzduchu. Po úplném vysušení je zbytek vzorku rozpuštěn ve 100 μ l mobilní fáze a připraven k analýze.



oddělená organická fáze

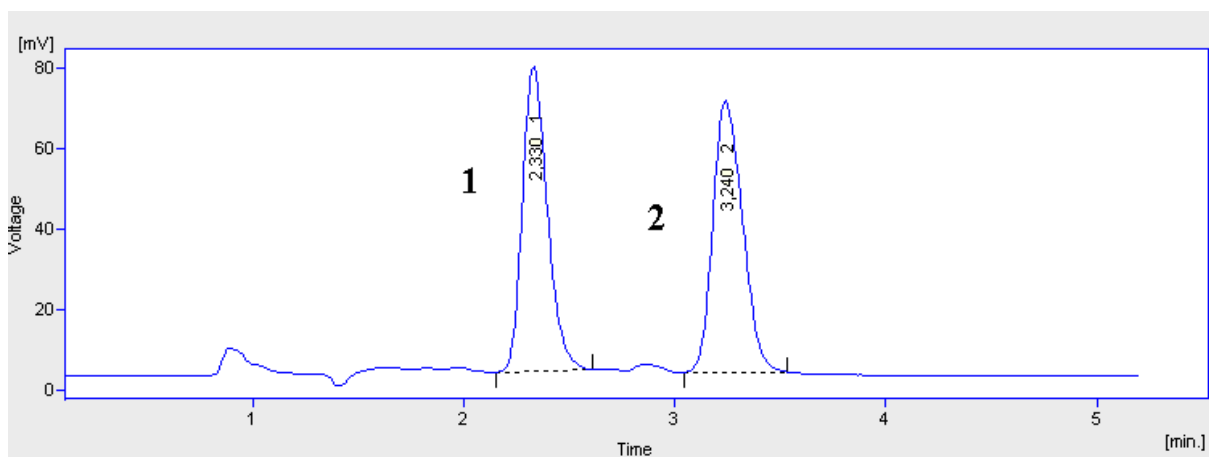
fáze nepochárního rozpouštědla

Obr.6: Oddělení supernatantu po extrakci dichlormethanem

3.1.7 Chromatografická analýza vzorku

Vzorek se nastříkuje Hamiltonovou pipetou do nástřikového ventilu. Nastříkuje se 20 μ l vzorku. Doba analýzy je přibližně 6 min. Analýza je vyhodnocena pomocí počítačového programu CSW (Chromatography Station for Windows), který zaznamenává signály

z detektoru v podobě chromatogramu (viz. obr.7). Průtok mobilní fáze je 1,0 ml/min. Detekce je prováděna při 229 nm. Použitá metoda je modifikací metody dle Yasuhiro Kato et al³⁸.



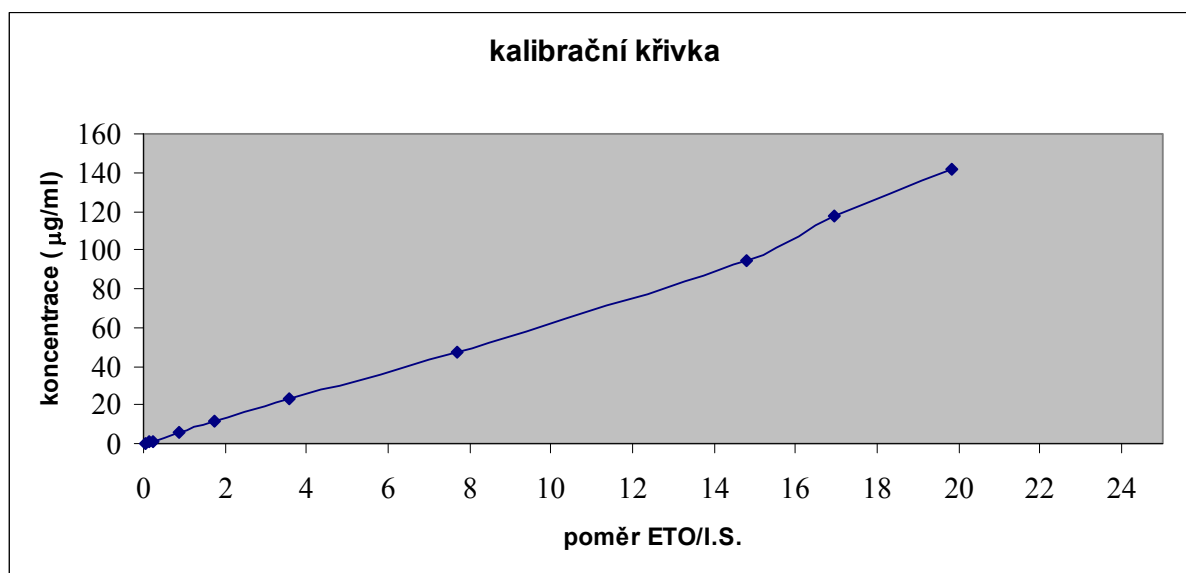
Obr.7: Chromatogram – pík 1 – etoposid, pík 2 – vnitřní standard

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

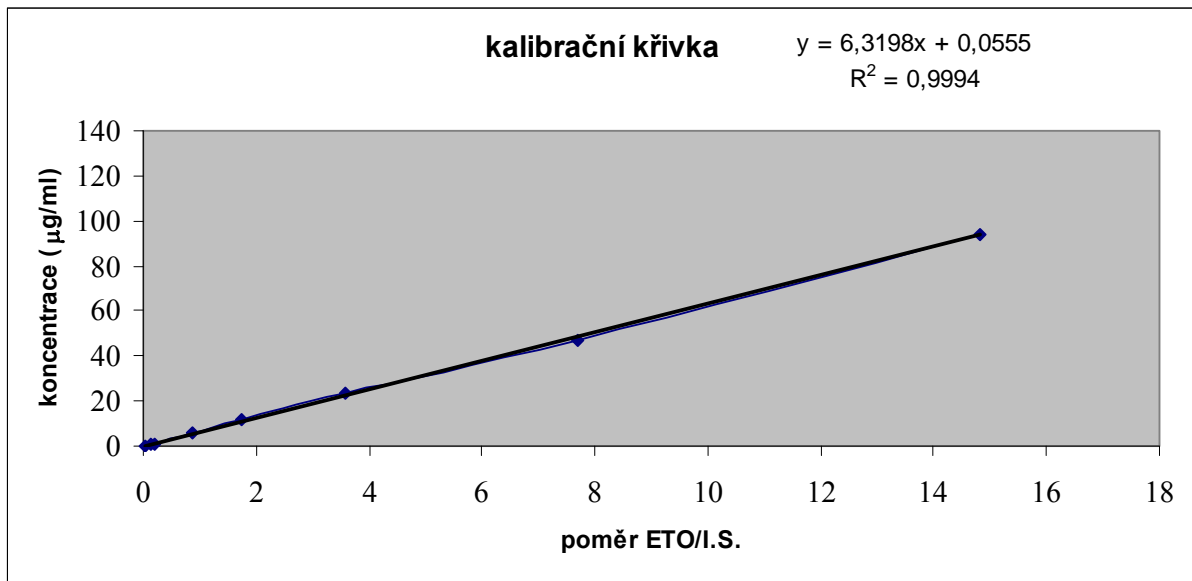
4.1 Výsledky validace metody

4.1.1 Linearita a rozsah

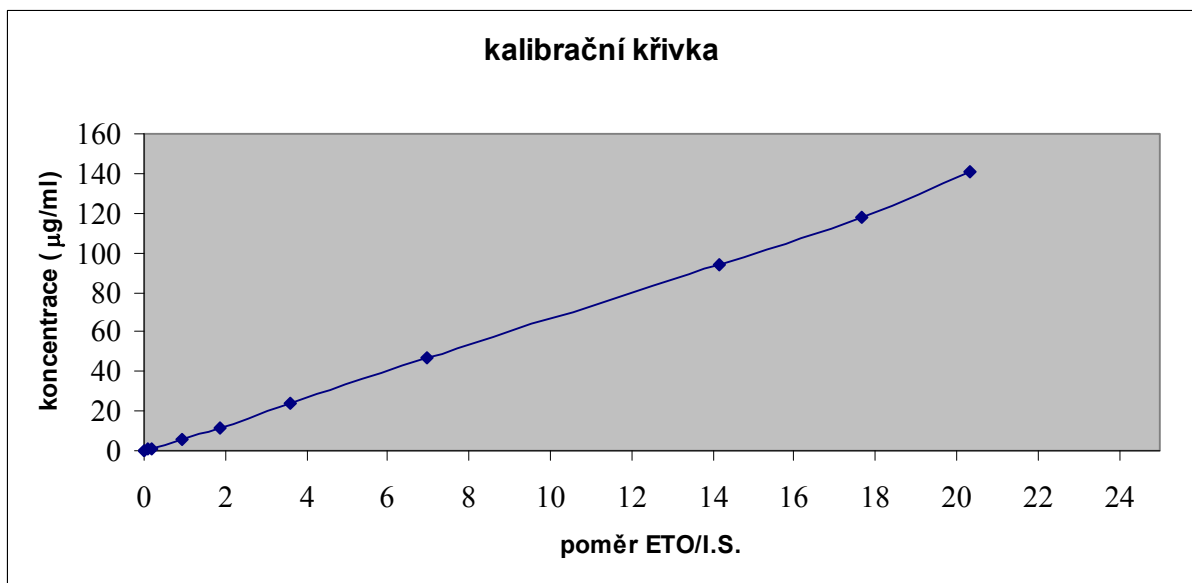
Linearita byla ověřena 10 bodovou kalibrací v dubletu pro plazmu a stejně tak i pro sklivec. Kalibrační křivka udává závislost poměru plochy píku etoposidu k ploše píku vnitřního standardu na koncentraci látky. Byla provedena kalibrace etoposidu v plazmě a ve sklivci. Kalibrační křivka je sestavena z 10 hodnot od nulové koncentrace až do koncentrace 120 µg/ml. Z obrázku 8 a 10 je patrné, že od koncentrace 80 µg/ml dochází k ohybu křivek, podle toho usuzujeme, že kalibrační křivka pro plazmu i pro sklivec je lineární do 80 µg/ml. Na obrázku 9 a 11 je kalibrační křivka sestavena z 8 hodnot od nulové koncentrace do koncentrace 80 µg/ml, můžeme tedy vidět lineární kalibrační křivku pro plazmu a pro sklivec. Odezva standardních roztoků o koncentracích 100 a 120 µg/ml byla tak velká, že již nebyly zobrazeny celé plochy píků, z toho je zřejmé, že všechny vzorky s koncentrací větší než 80 µg/ml se musí ředit. Pro výpočty koncentrací naměřených v plazmě byla tedy použita rovnice regrese $y = 6,3198x + 0,0555$. Hodnota korelačního koeficientu pro plazmu je 0,9994, což vyjadřuje míru rozptylu bodů kolem regresní přímky. K výpočtům koncentrací naměřených ve sklivci byla použita rovnice regrese $y = 6,6888x - 0,2091$. Hodnota korelačního koeficientu je 0,9999.



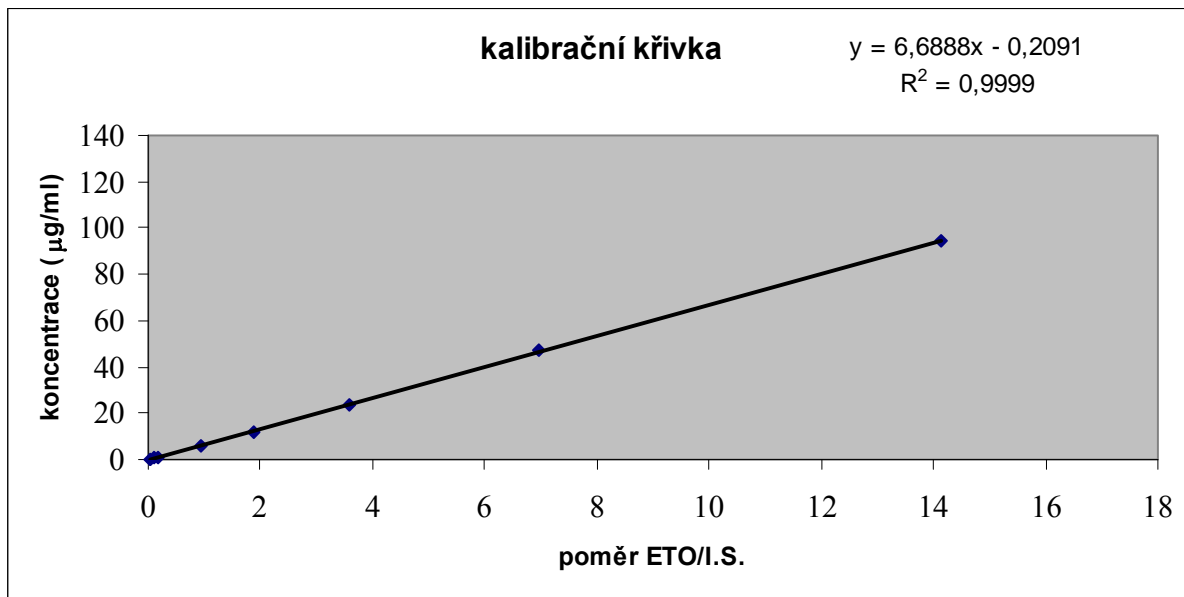
Obr.8: Kalibrace etoposidu v plazmě - celkový rozsah



Obr.9: Kalibrace etoposidu v plazmě - lineární rozsah



Obr.10: Kalibrace etoposidu ve sklivci - celkový rozsah



Obr.11: Kalibrace etoposidu ve sklivci - lineární rozsah

4.1.2 Mez detekce

Mez detekce byla zjištěna analýzou slepého pokusu. Odečetla se třikrát hodnota (výška) šumu, z ní se vypočítala průměrná hodnota šumu. Mez detekce byla vypočítána podle následujícího vzorce z osmi bodové kalibrační křivky, která byla sestavena podle výšek píků.

$$X_d = Y_d / b_1$$

Y_d - $3 \cdot h_{\max}$ – maximální kolísání základní linie

b_1 - směrnice kalibrační přímky, b_1 musí být z koncentrační závislosti $y = b_1x$, kde y je výška chromatografického píku

plazma	
vzorek	výška píku
nulový 1	0,033
nulový 2	0,032
nulový 3	0,021
průměr	0,029

Tab.2: Hodnoty výšek píků u slepých vzorků v plazmě

sklivec	
vzorek	výška píku
nulový 1	0,97
nulový 2	0,83
nulový 3	0,53
průměr	0,777

Tab.3: Hodnoty výšek píků u slepých vzorků ve sklivci

Směrnice kalibrační přímky b_1 v plazmě je 7,9377 a ve sklivci 5,7559.

Mez detekce stanovená v plazmě je 0,011 $\mu\text{g/ml}$.

Mez detekce stanovená ve sklivci je 0,405 $\mu\text{g/ml}$.

Zvýšená hodnota meze detekce stanovená ve sklivci je způsobená vysokým šumem, který se vyskytoval u nulových vzorků.

4.1.3 Přesnost

Přesnost v sérii (opakovatelnost) byla zjištěna analýzou 10 vzorků o koncentraci 6 $\mu\text{g/ml}$ a 24 $\mu\text{g/ml}$. Každý vzorek byl připraven do celkového objemu 200 μl plazmy nebo sklivce. Postup přípravy pro analýzu je stejný jako postup přípravy králíčích vzorků. Vzorky byly změřeny v jeden den, na témže přístroji, s toutéž obsluhou. Z výsledků uvedených v tabulce 4 pro hladinu 6 $\mu\text{g/ml}$ a v tabulce 5 pro hladinu 24 $\mu\text{g/ml}$ byl vypočítán aritmetický průměr (\bar{x}) směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV). Směrodatná odchylka udává míru rozptylu výsledků. Nižší hodnota ukazuje na vyšší přesnost metody a naopak. U všech čtyř měření je hodnota směrodatné odchylky poměrně nízká, což ukazuje na vysokou přesnost metody. Hodnota variačního koeficientu by měla být do 10%. U žádného z těchto čtyř měření hodnota variačního koeficientu nepřekračuje 10%.

vzorek	koncentrace (µg/ml)
1	5,83
2	5,40
3	5,52
4	5,26
5	6,10
6	5,85
7	6,17
8	6,46
9	6,53
10	6,17
průměr	5,93
SD	0,44
CV	7,35%

Tab.4: Opakovatelnost pro hodnotu 6 µg/ml – plazma

vzorek	koncentrace (µg/ml)
1	25,29
2	25,31
3	24,79
4	25,35
5	25,78
6	24,80
7	25,57
8	25,65
9	25,66
10	26,40
průměr	25,46
SD	0,48
CV	1,87%

Tab.5: Opakovatelnost pro hodnotu 24 µg/ml – plazma

Přesnost v sérii pro sklivec byla zjištěna stejným způsobem jako pro plazmu. Výsledky pro hladinu 6 µg/ml jsou uvedeny v tabulce 6 a pro hladinu 24 µg/ml v tabulce 7.

vzorek	koncentrace (µg/ml)
1	6,04
2	6,13
3	7,22
4	6,04
5	6,42
6	6,89
7	6,13
8	6,70
9	6,19
10	6,27
průměr	6,4
SD	0,40
CV	6,29%

Tab.6: Opakovatelnost na hladině 6 µg/ml - sklivec

vzorek	koncentrace (µg/ml)
1	24,41
2	25,19
3	25,94
4	25,51
5	25,36
6	26,44
7	25,13
8	25,31
9	24,87
10	25,57
průměr	25,37
SD	0,56
CV	2,20%

Tab.7: Opakovatelnost na hladině 24 µg/ml - sklivec

Reprodukovatelnost byla zjištěna analýzou 10 vzorků na hladině 6 µg/ml pro plazmu a 10 vzorků na hladině 6 µg/ml pro sklivec. Byl připraven standardní roztok ve větším množství. Standardní roztok byl rozpipetován do 10 eppendorfek a zamražen na -70°C. Každý den byla provedena analýza jednoho rozmraženého vzorku. Postup přípravy byl stejný jako postup přípravy králíčích vzorků. Vzorky byly měřené po dobu 10 dnů na téže přístroji. Z výsledků pro hladinu 6 µg/ml (tabulka 7) pro plazmu a (tabulka 8) pro sklivec byl vypočítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient.

vzorek	koncentrace (µg/ml)
1	6,19
2	5,92
3	5,93
4	5,86
5	5,81
6	5,85
7	5,75
8	5,66
9	5,67
10	5,75
průměr	5,84
SD	0,16
CV	2,66%

Tab.7: *Reprodukovatelnost na hladině 6 µg/ml - plazma*

vzorek	koncentrace (µg/ml)
1	7,73
2	9,51
3	2,37
4	4,19
5	5,87
6	5,45
7	5,38
8	5,16
9	5,55
10	5,65
průměr	5,51
SD	0,24
CV	4,36%

Tab.8: *Reprodukovatelnost na hladině 6 µg/ml - sklivec*

V tabulce 8 je počítáno pouze se 6 hodnotami. První čtyři měření byla naprosto rozdílná. Patrně došlo ke špatnému promíchání zásobního standardu před rozpipetováním do eppendorfek. Z tohoto důvodu byl připraven nový roztok. Měření již byla v pořádku a variační koeficient je 4,36%. Při porovnání měření opakovatelnosti a reprodukovatelnosti v plazmě se výsledné hodnoty téměř nelišily, kdežto výsledné hodnoty ve sklivci byly rozdílné.

4.1.4 Robustnost

Robustnost byla sledována v průběhu vývoje metody. Zkoumal se vliv opakovaného rozmrazování vzorků. Byl připraven standardní roztok plazmy i sklivce o koncentraci 6 µg/ml ve větším množství a každý den z něj bylo odebráno 200 µl vzorku. Roztok byl tedy celkem

rozmražen 10x. V tabulce 9 je počítáno pouze s 8 hodnotami. U prvních dvou měření došlo nejspíše k chybě ve špatném pipetování vzorků. Z tabulek 9 a 10 můžeme vidět, že i po opakovaném rozmrazování zůstávají hodnoty koncentrace podobné. Porovnáním tabulky 7 a 9 (pro plazmu) a 8 a 10 (pro sklivec) můžeme vidět, že hodnoty první skupiny vzorků 1x rozmražených a druhé skupiny vzorků 10x rozmražených, se téměř neliší. U opakovaného rozmrazování je variační koeficient dokonce nižší než u vzorků rozmražených 1x. Z těchto výsledků vyplývá, že opakované rozmrazování nemá na analýzu žádný vliv.

vzorek	koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)
1	7,08
2	7,05
3	5,26
4	5,16
5	5,70
6	5,58
7	5,58
8	5,59
9	5,32
10	5,77
průměr	5,5
SD	0,22
CV	4,04%

Tab.9: Robustnost na hladině 6 $\mu\text{g/ml}$ - plazma

vzorek	koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)
1	5,84
2	5,56
3	5,64
4	5,44
5	5,56
6	5,40
7	5,72
8	5,49
9	5,64
10	5,72
průměr	5,60
SD	0,14
CV	2,46%

Tab.10: Robustnost na hladině 6 $\mu\text{g/ml}$ – sklivec

4.1.5 Správnost (pravdivost)

Z hlediska toho, že správnost (pravdivost) je definována jako těsnost shody mezi naměřenou a referenční hodnotou, nebylo možné provést její stanovení. V době měření nebyl dostupný žádný referenční materiál.

4.2 Výsledky stanovení etoposidu

Stanovení etoposidu v plazmě a ve sklivci u králíků bylo prováděno za účelem zjištění jaká je distribuce léku při subkonjunktivální a intravitreální aplikaci. Stanovení hladiny etoposidu by pak umožňovalo bezpečnější, ale především účinnější léčbu.

Měření bylo prováděno na Ústavu klinické biochemie a patobiochemie na úseku chromatografických metod. Vzorky byly získány z výzkumného projektu řešeného na Oční klinice dětí a dospělých a na Ústavu klinické biochemie a patobiochemie FN Motol.

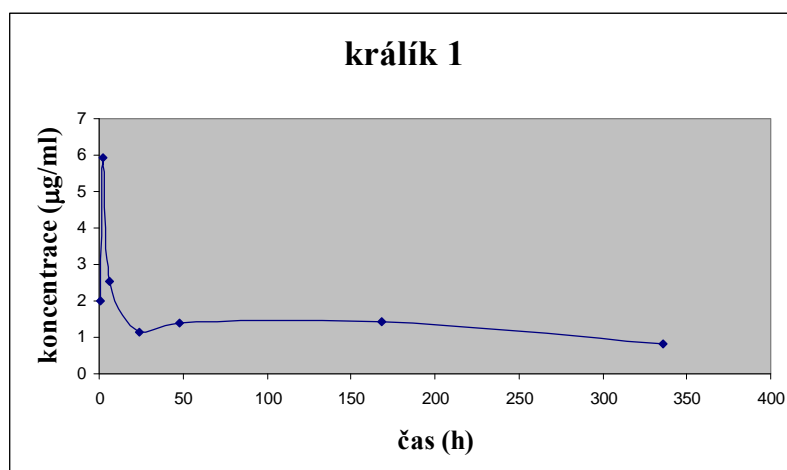
4.2.1 Výsledky stanovení etoposidu v plazmě

Skupina králíků č. 1 – 6

U králíků č. 1 – 6 byl etoposid aplikován subkonjunktiválně. Dávka činila 2,5 mg. U této skupiny nebyly odebrány vzorky v čase 0 h. Každý vzorek byl proměřen, z chromatogramu byla odečtena hodnota plochy píku etoposidu a vnitřního standardu. Z poměru ploch byla podle rovnice regrese $y = 6,3198x + 0,0555$ vypočítána koncentrace etoposidu v plazmě. Výsledky koncentrací jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech. Výsledné koncentrace jsou u všech králíků celkově velmi nízké. Nejvyšší koncentraci můžeme vidět v časech 2 a 6 h po aplikaci etoposidu.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	2
2	5,92
6	2,54
24	1,14
48	1,39
168	1,44
336	0,82

Tab.11: Králík 1

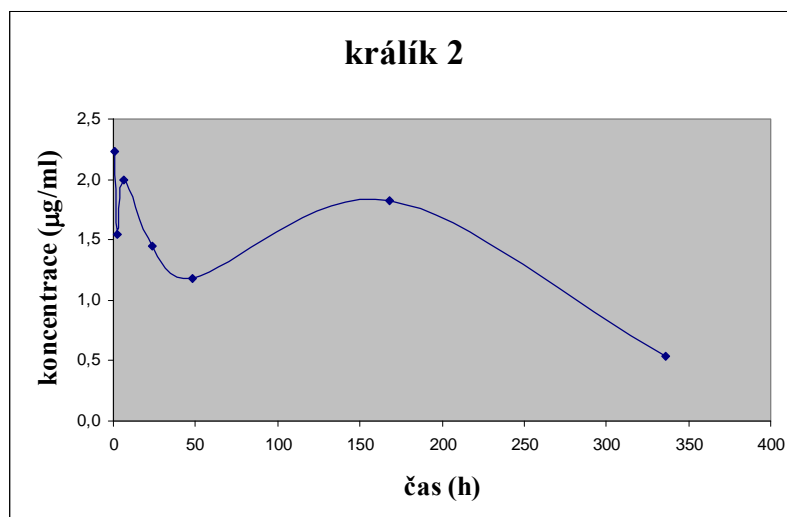


Obr.12: Králík 1

U králíka č. 1 můžeme vidět největší koncentraci etoposidu v plazmě v čase 2 h. Zajímavé je, že koncentrace etoposidu klesá a v čase 168 h (7 dní) se zase mírně zvýší.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	2,23
2	1,55
6	2,00
24	1,45
48	1,18
168	1,82
336	0,54

Tab.12: Králík 2

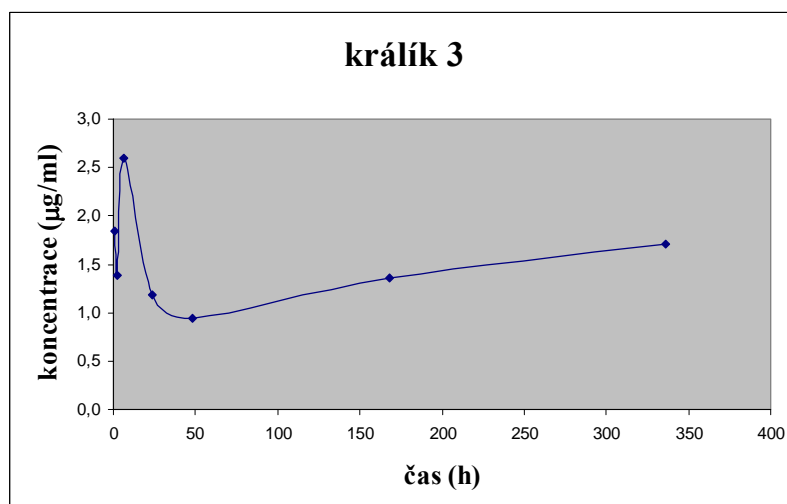


Obr.13: Králík 2

U králíka č. 2 jsou naměřeny velmi zajímavé koncentrace. V čase 1 h je však koncentrace největší. Následně koncentrace klesá a v čase 6 h a 168 h (7 dní) zase mírně stoupá. Tyto změny v koncentracích můžeme pozorovat v grafu na obrázku č. 13.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	1,84
2	1,39
6	2,60
24	1,19
48	0,94
168	1,36
336	1,71

Tab.13: Králík 3

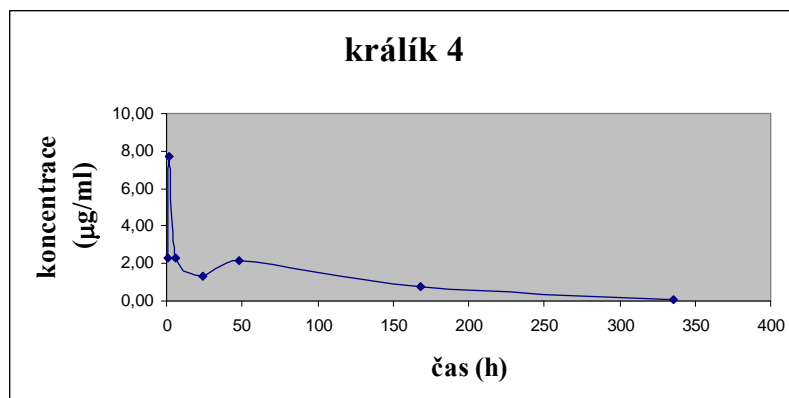


Obr.14: Králík 3

U králíka č.3 je podobná situace jako u králíka č. 2. Největší až dvojnásobná koncentrace je však naměřena v čase 6 h. Od měření v čase 24 h koncentrace mírně klesají a v čase 336 h (14 dní) se opět koncentrace mírně zvýší.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	2,29
2	7,69
6	2,29
24	1,35
48	2,17
168	0,76
336	0,08

Tab.14: Králík 4

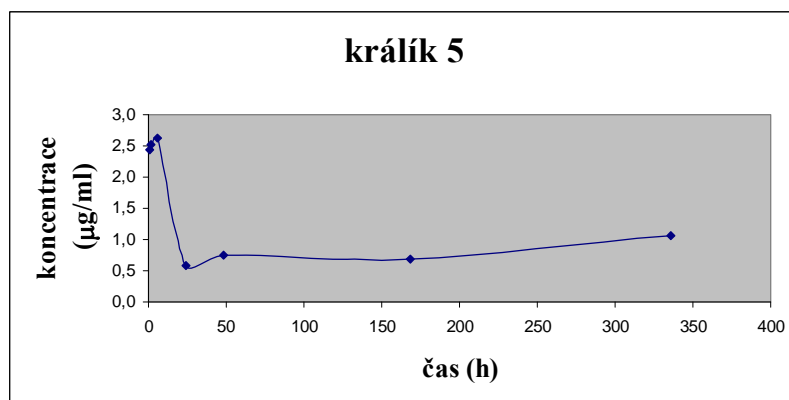


Obr.15: Králík 4

U králíka č. 4 dosahuje koncentrace nejvyšší hodnoty v čase 2 h po aplikaci etoposidu. Je to až 7,69 µg/ml, což je nejvyšší koncentrace naměřená u skupiny králíků č.1 – 6. Naopak v čase 336 h (14 dní) se koncentrace blíží hranici meze detekce.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	2,44
2	2,52
6	2,62
24	0,58
48	0,75
168	0,69
336	1,07

Tab.15: Králík 5

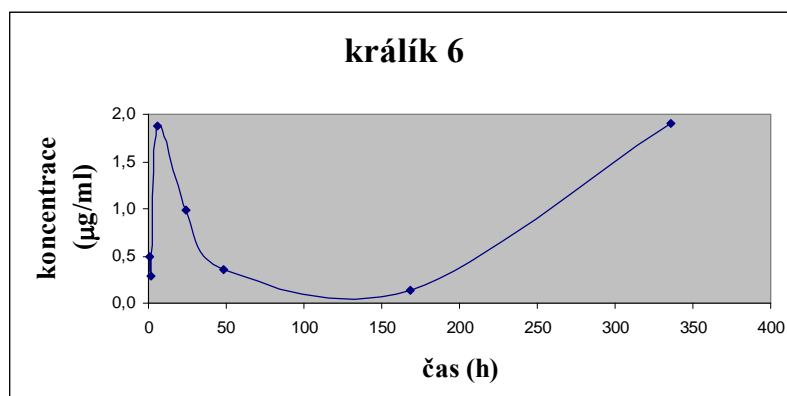


Obr.16: Králík 5

U králíka č.5 se koncentrace etoposidu postupně zvyšují až do 6 h po aplikaci etoposidu, kdy je koncentrace nejvyšší. Následně v časech 24 h, 48 h a 168 h (7 dní) jsou koncentrace velmi nízké. V posledním měření koncentrace zase mírně stoupne.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	0,50
2	0,29
6	1,88
24	0,99
48	0,35
168	0,14
336	1,90

Tab.16: Králík 6



Obr.17: Králík 6

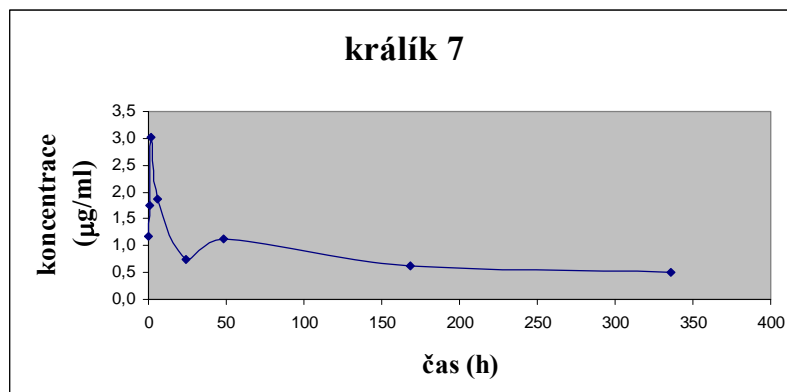
U králíka č.6 je velmi zajímavé, že v čase 6 h a 336 h (14 dní) dosahují koncentrace téměř shodných hodnot. Zatímco v čase 168 h (7 dní) klesne koncentrace skoro až na hladinu meze detekce, což je 0,011 µg/ml. Zvýšení koncentrací etoposidu v časech 168 h (7 dní) a 336 h (14 dní) by mohlo být způsobeno postupným uvolňováním etoposidu z vazby na albumin. Etoposid se v plazmě až z 95% váže na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin a volná koncentrace léčebné dávky je proto nízká. Na opakování měření nebylo dostatek materiálu.

Skupina králíků č. 7 – 12

U této skupiny byl etoposid aplikován intravitreálně. Dávka činila 0,5 mg. Každý vzorek byl proměřen a z chromatogramu byla odečtena hodnota plochy píku etoposidu a vnitřního standardu. Z poměru ploch byla podle rovnice regrese $y = 6,3198x + 0,0555$ vypočítána koncentrace etoposidu v plazmě. Výsledky koncentrací jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech. Výsledné koncentrace jsou celkově ještě nižší než u skupiny králíků č. 1 - 6. Což je způsobeno 5 krát nižší aplikační dávkou a také místem aplikace. Nejvyšší koncentrace se pohybují opět v časech 2 h a 6 h, potom koncentrace klesají až skoro na nulovou hodnotu.

čas (h)	koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)
0	1,18
1	1,76
2	3,03
6	1,87
24	0,74
48	1,12
168	0,63
336	0,49

Tab.17: Králík 7

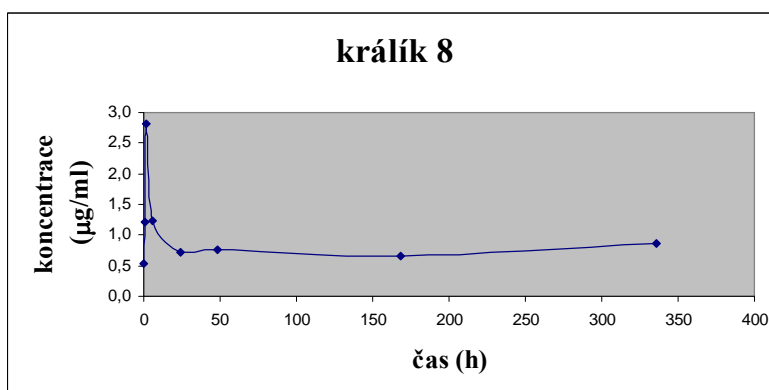


Obr.18: Králík 7

U králíka č.7 se již v čase 0 h vyskytuje poměrně vysoké množství etoposidu. Nejvyšší koncentrace však dosahuje v čase 2 h po aplikaci etoposidu. Poté koncentrace klesá a zvyšuje se už v čase 48 h, oproti měřením u králíků 1 – 6, kde dochází k vzrůstu koncentrací etoposidu přibližně sedmý den po aplikaci.

čas (h)	koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)
0	0,54
1	1,21
2	2,82
6	1,24
24	0,71
48	0,76
168	0,66
336	0,85

Tab.18: Králík 8

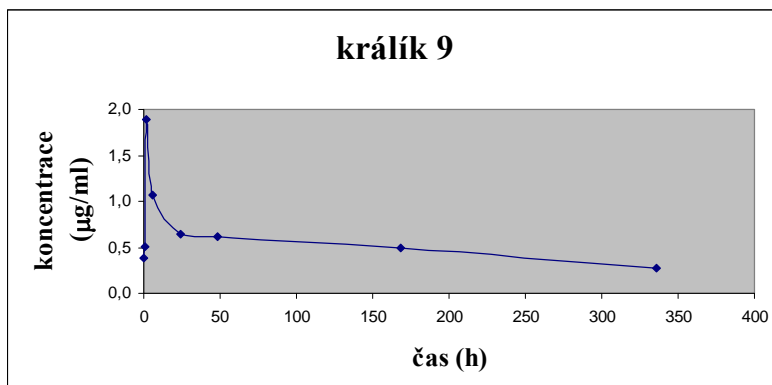


Obr.19: Králík 8

U králíka č. 8 můžeme vidět jak koncentrace etoposidu zprvu stoupá, vrcholu dosahuje v čase 2 h a následně postupně klesá. Takovýto průběh byl očekáván u všech ostatních králíků.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
0	0,38
1	0,50
2	1,89
6	1,07
24	0,65
48	0,61
168	0,50
336	0,27

Tab.19: Králík 9

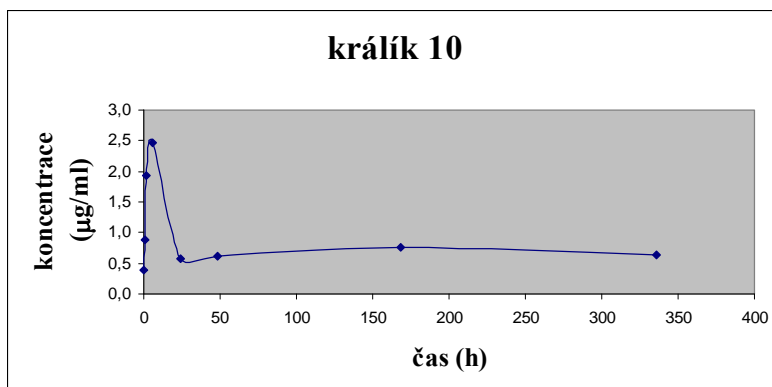


Obr.20: Králík 9

U králíka č.9 můžeme vidět velice pěkný průběh, s vrcholem ve 2 h. Křivka nejdříve rychle vzroste a pak pomalu klesá. V čase 336 h (14 dní) dosahuje nejnižší hodnoty, jako se předpokládá.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
0	0,39
1	0,88
2	1,93
6	2,46
24	0,57
48	0,62
168	0,75
336	0,63

Tab.20: Králík 10

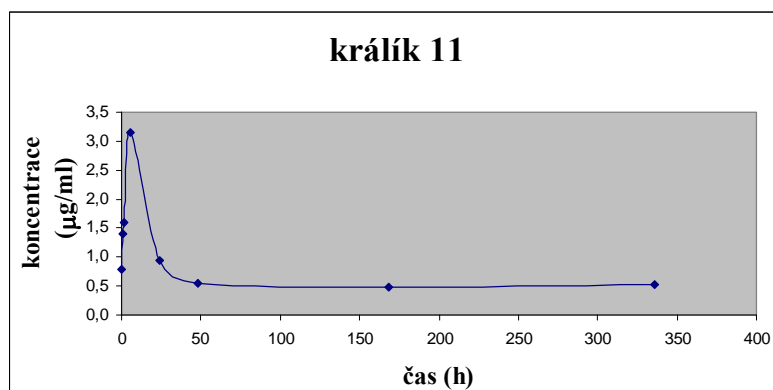


Obr.21: Králík 10

U králíka č. 10 dosahuje koncentrace nejvyšší hodnoty v čase 6 h, na rozdíl od ostatních králíků, kteří mají nejvyšší koncentrace většinou v čase 2 h. Následně v čase 24 h hodnota prudce klesne.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
0	0,79
1	1,39
2	1,59
6	3,16
24	0,93
48	0,54
168	0,49
336	0,52

Tab.21: Králík 11

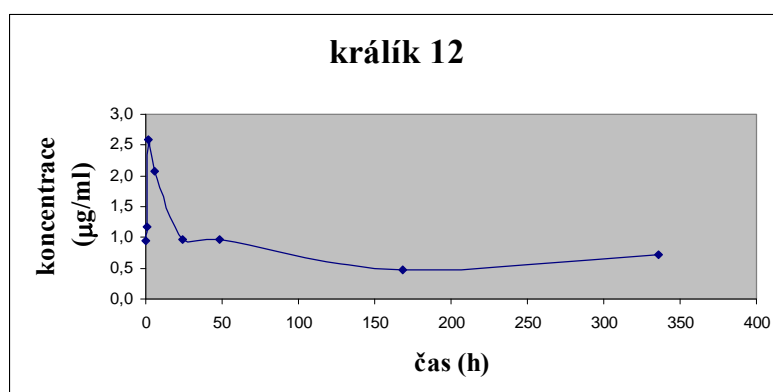


Obr.22: Králík 11

U králíka č.11 je nejvyšší koncentrace opět v čase 6 h a dále koncentrace prudce klesne. Od 24 h klesá koncentrace pomaleji.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
0	0,94
1	1,18
2	2,58
6	2,07
24	0,97
48	0,97
168	0,46
336	0,73

Tab.22: Králík 12



Obr.23: Králík 12

U králíka č.12 dosahuje etoposid nejvyšší koncentrace v čase 2 h, ale je zajímavé, že v čase 6 h, je hladina také stále ještě poměrně vysoká a prudce klesne až v čase 24 h.

Etoposid se v plazmě z 95% váže na albumin, jeho postupné uvolňování z této vazby by mohlo vysvětlovat opětovné zvýšení koncentrací etoposidu nejčastěji v časech 48 h, 168 h (7 dní) a 336 h (14 dní). Distribuční poločas etoposidu je 1,5 hodiny, což by mohlo vysvětlovat, proč je největší koncentrace v 1 h či ve 2 h po aplikaci etoposidu. Na opakování měření již nebylo dostatek materiálu.

4.2.2 Výsledky stanovení etoposidu ve sklivci

Skupina králíků č. 1 – 6

Každý vzorek byl proměřen a z chromatogramu byla odečtena hodnota plochy píku etoposidu a vnitřního standardu. Z poměru ploch byla podle rovnice regrese $y = 6,6888x - 0,2091$ vypočítána koncentrace etoposidu ve sklivci. Výsledky koncentrací jsou uvedeny v tabulce 23 a 24. Pouze u králíků 1 a 2 byly nalezeny stopové koncentrace etoposidu. U králíků 3 – 6 nebyla nalezena žádná koncentrace etoposidu.

	čas, oko	koncentrace (µg/ml)
králík 1	0h, OL	nenalezen
	1h, OP	2,09
	2h, OP	1,16
	6h, OP	1,13
	24h, OP	nenalezen
	24h, OL	nenalezen
	48h, OP	nenalezen
	7d, OP	nenalezen
	14d, OP	nenalezen
	14d, OL	nenalezen
	králík 2	0h, OL
	1h, OP	nenalezen
	2h, OP	0,85
	6h, OP	0,58
	24h, OP	nenalezen
	24h, OL	nenalezen
	48h, OP	nenalezen
	7d, OP	nenalezen
	14d, OL	nenalezen
	14d, OP	nenalezen
	králík 3	0h, OL
	1h, OP	nenalezen
	2h, OP	nenalezen
	6h, OP	nenalezen
	24h, OP	nenalezen
	24h, OL	nenalezen
	48h, OP	nenalezen
	7d, OP	nenalezen
	14d, OL	nenalezen

Tab.23: Výsledné koncentrace u králíků 1 – 3

	čas, oko	koncentrace (µg/ml)	
králík 4	0h, OL	nenalezen	
	1h, OP	nenalezen	
	2h, OP	nenalezen	
	6h, OP	nenalezen	
	24h, OP	nenalezen	
	24h, OL	nenalezen	
	48h, OP	nenalezen	
	7d, OP	nenalezen	
	14d, OL	nenalezen	
	králík 5	0h, OL	nenalezen
		1h, OP	nenalezen
2h, OP		nenalezen	
6h, OP		nenalezen	
24h, OP		nenalezen	
24h, OL		nenalezen	
48h, OP		nenalezen	
7d, OP		nenalezen	
14d, OL		nenalezen	
králík 6	0h, OL	nenalezen	
	1h, OP	nenalezen	
	2h, OP	nenalezen	
	6h, OP	nenalezen	
	24h, OP	nenalezen	
	24h, OL	nenalezen	
	48h, OP	nenalezen	
	7d, OP	nenalezen	
14d, OL	nenalezen		

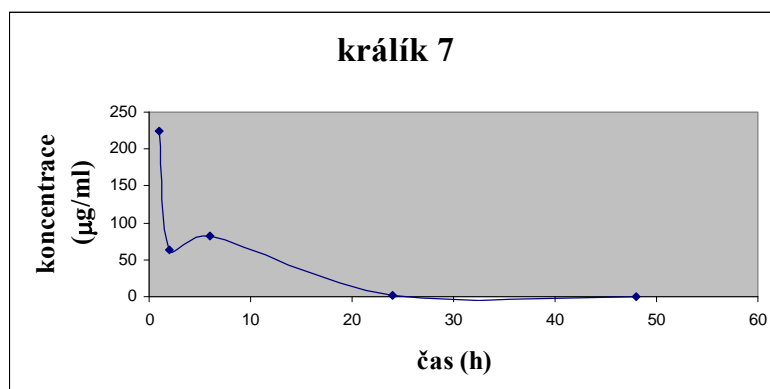
Tab. 24: Výsledné koncentrace u králíků 4 - 6

Skupina králíků č. 7 – 12

Každý vzorek byl proměřen a z chromatogramu byla odečtena hodnota plochy píku etoposidu a vnitřního standardu. Z poměru ploch byla podle rovnice regrese $y = 6,6888x - 0,2091$ vypočítána koncentrace etoposidu ve sklívci. Výsledky koncentrací jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech. Z výsledných koncentrací můžeme vidět že největší koncentrace etoposidu je v čase 1 h a 2 h. Dále pak koncentrace klesá. Vzorky byly odebrány zejména z oka pravého. Z oka levého jen v časech 0 h a 24 h. V levém oku nebylo naměřeno žádné množství etoposidu. V tabulkách jsou uvedeny výsledky pouze pravého oka. Do grafů nejsou zařazeny poslední dvě hodnoty v časech 168 h (7 dní) a 336 h (14 dní), protože byly u všech králíků této skupiny naměřeny nulové koncentrace. Na grafu bude tak lépe zobrazen průběh křivky a změny v koncentracích.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	223,88
2	63,51
6	81,88
24	1,58
48	0,45
168	0
336	0

Tab.25: Králík 7

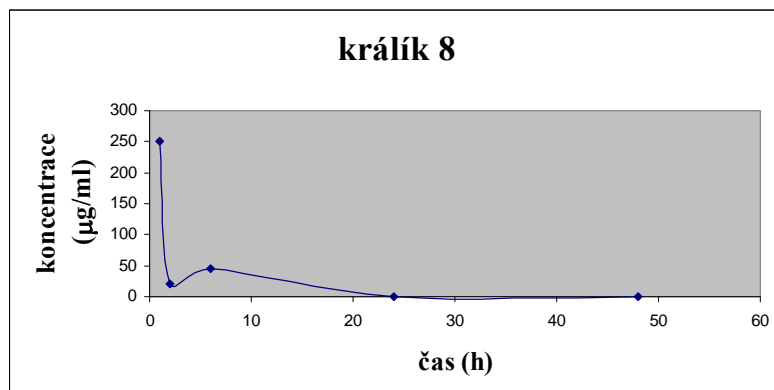


Obr.24: Králík 7

U králíka č. 7 byla naměřena nejvyšší koncentrace v čase 1 h. Následně koncentrace výrazně klesne, víc jak o polovinu. V čase 48 h po aplikaci etoposidu je koncentrace skoro nulová, až na hranici meze detekce.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	251,14
2	19,94
6	44,39
24	0,8
48	0
168	0
336	0

Tab.26: Králík 8

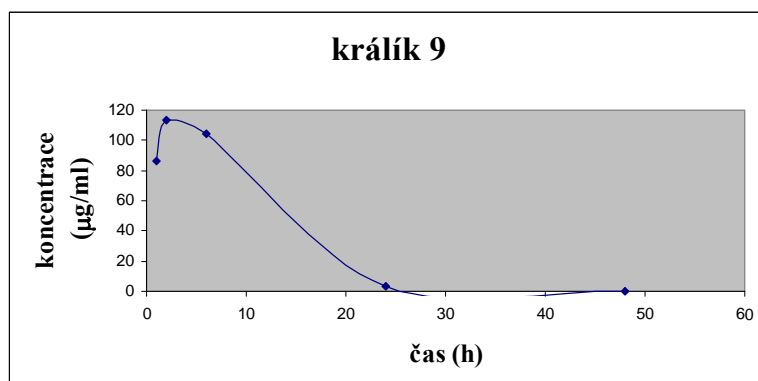


Obr.25: Králík 8

V čase 1 h dosahuje králík č.8 společně s králíkem č.11 nejvyšší koncentrace etoposidu celkově z králíků 7 – 12. V 2 h po aplikaci etoposidu už ale hladina výrazně klesne a v čase 6 h mírně stoupne. Od 24 h je koncentrace skoro nulová.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	86,49
2	113,24
6	104,23
24	3,67
48	0
168	0
336	0

Tab.27: Králík 9

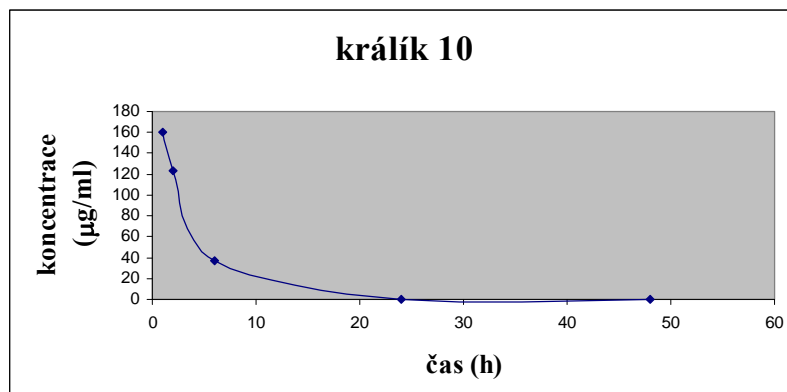


Obr.26: Králík 9

U králíka č.9 dosahuje koncentrace etoposidu nejvyšší hodnoty až ve 2 h. V 6 h je koncentrace stále poměrně vysoká.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	159,85
2	123,82
6	36,53
24	0
48	0
168	0
336	0

Tab.28: Králík 10

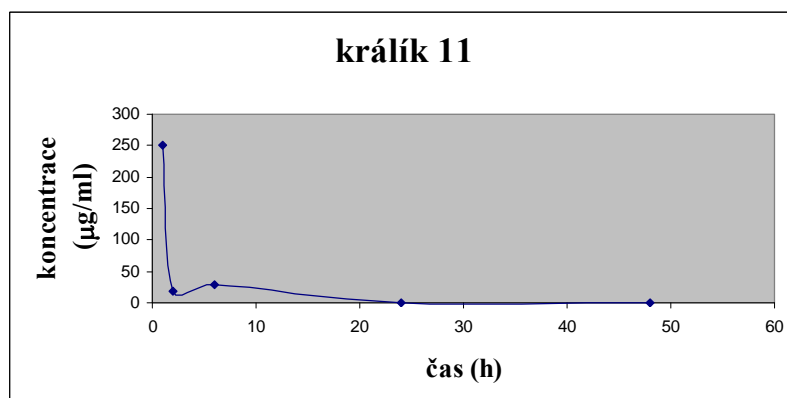


Obr.27: Králík 10

U králíka č.10 je největší koncentrace naměřena v čase 1 h. V čase 2 h a 6 h koncentrace klesá a v čase 24 h dosahuje nulové koncentrace.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	251,03
2	18,76
6	28,45
24	0
48	0
168	0
336	0

Tab.29: Králík 11

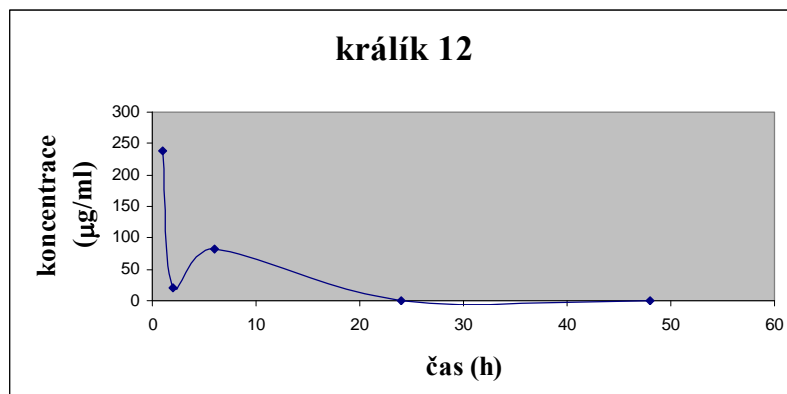


Obr.28: Králík 11

Králík č.11 dosahuje v čase 1 h spolu s králíkem č.8 nejvyšší koncentrace z této skupiny králíků. V čase 2 h koncentrace výrazně klesne a v čase 6 h se opět mírně zvýší podobně jako u králíků č. 7, 8 a 12. Od čtvrtého měření (24 h) je koncentrace nulová.

čas (h)	koncentrace (µg/ml)
1	238,46
2	20,1
6	83,2
24	0
48	0
168	0
336	0

Tab.30: Králík 12



Obr.29: Králík 12

Králík 12 má obdobný průběh změn v koncentracích etoposidu jako králík č.11. Nejvyšší koncentrace je 1 h po aplikaci etoposidu, následně koncentrace velmi poklesne a v čase 6 h opět stoupne. Od 24 h po aplikaci etoposidu je koncentrace etoposidu nulová.

Na opakování měření nebylo dostatek materiálu.

5. ZÁVĚR

Byla vyvinuta metoda umožňující stanovení etoposidu v plazmě a ve sklivci králíků. Metoda byla testována a validována z hlediska přesnosti. Variační koeficient u opakovatelnosti, reprodukovatelnosti i robustnosti byl nižší než 10%. Bylo zjištěno, že opakované rozmrazování vzorku nemá na stanovení etoposidu žádný vliv. Kalibrační křivka byla lineární do 80 µg/ml a to jak v plazmě, tak i ve sklivci. Vypočítané parametry potvrdili přesnost metody. Správnost nebyla testována z důvodu nedostupnosti žádného referenčního materiálu. Také nebyla objevena žádná laboratoř v ČR, která by prováděla stanovení etoposidu v plazmě.

Metoda byla vyzkoušena přibližně na 200 vzorcích plazmy a sklivce králíků. Vzorky byly rozděleny do dvou skupin. V první skupině králíků č. 1 – 6 byl etoposid dávkován subkonjunktivální aplikací. U skupiny králíků č. 7 – 12 byl etoposid dávkován intravitreální aplikací. Bylo sledováno, jaká je distribuce léku.

Bylo zjištěno, že intravitreální aplikací etoposidu se dostane do oka větší množství léčebné dávky. Subkonjunktivální aplikací se léčebná dávka nedostane do oka k retinoblastomu. Může se objevit pouze ojedinele u individuálního jedince ve stopovém množství. V plazmě se vyskytuje koncentrace etoposidu v malém množství u obou skupin králíků.

Tato metoda je vhodná pro stanovení etoposidu v plazmě a ve sklivci.

6. LITERATURA

1. Melamud A., Palekar R., Singh A.: Retinoblastoma, American Family Physician 73, 1040-1044 (2006)
2. Wallach M., Balme A., Junker F., Houghton S., Pampallona S., Nicolas von der Weid, Beck-Popovic M.: Shorter Time to Diagnosis and Improved Stage at Presentation in Weiss Patients With Retinoblastoma Treated From 1963 to 2004, Pediatrics 118, e1493-e1498 (2006)
3. Kolín J. a kolektiv: Oftalmologie praktického lékaře, Karolinum 1994
4. Kraus H. et al.: Kompendium očního lékařství, Grada Publishing 1997
5. Rozsival P. et al.: Oční lékařství, Galén 2006
6. Hayden B., Jockovich M-E., Murray T.G., Kralinger M.T., Voigt M., Hernandez E., Feuer W., Parel J.M.: Iontophoretic Delivery of Carboplatina in a Murine Model Retinoblastoma, Investigative Ophthalmology & Visual Science 47, 2422-2429 (2006)
7. Sood A.K., Lush R., Geisler J.P., Shahin M.S., Sanders L., Sullivan D., Buller R.E., Sorosky J.I.: Sequential Intraperitoneal Topotecan and Oral Etoposide Chemotherapy in Recurrent Platinum-Resistant Ovarian Carcinoma: Results of a Phase II Trial, Clinical Cancer Research 10, 6080-6085 (2004)
8. Manouilov K.K., McGuire T.R., Gordon B.G., Gwilt P.R.: Assay for etoposide in human serum using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, Journal of Chromatography 707, 342-346 (1998)
9. Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: Farmakologie a Toxikologie, Grada Publishing 2004
10. BC Cancer Agency Cancer Drug Manual, 1-11 (2006)
11. www.sukl.cz/_download/spc/SPC8296.doc
12. www.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc
13. Klíma J., Grafnetterová J.: Pokroky ve farmacii 7 – Využití kapalinové chromatografie v klinické farmakologii, Avicentrum 1987
14. Jennifer van Dijk, Imhof S.M., Moll A.C., Ringens P.J., Cohen-Kettenis P.T., Rijmen F., Huisman J.: Quality of life of adult retinoblastoma survivors in the Netherlands, Health and Quality of Life Outcomes (2007)
15. Pavel Klener: Klinická onkologie, Galén, Karolinum 2002
16. <http://www.detskaonkologie.cz/pages/retinoblastom.html>

17. Koutecký J., Kabíčková E., Starý J.: Dětská onkologie pro praxi, Triton 2002
18. Laurie N.A., Gray J.K., Zhang J., Leggas M., Relling M., Egorin M., Stewart C., Dyer M.A.: Topotecan Combination in Two New Rodent Models of Retinoblastoma, Clin Cancer Res 11(20), 7569-7578 (2005)
19. Martínková J. a kolektiv: Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, Grada 2007
20. Liliemark E., Petterson B., Peterson C., Liliemark J.: High-performance liquid chromatography with fluorometric detection for monitoring of etoposide and its cis-isomer in plasma and leukaemic cells, Journal of Chromatography 669, 311-317 (1995)
21. Robieux I., Aita P., Sorio R., Toffoli G., Boiocchi M.: Determination of unbound etoposide concentration in ultrafiltered plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, Journal of Chromatography 686, 35-41 (1996)
22. Janků F., Petruželka L., Novotný J., Saf Anda M., Judas L.: Naše zkušenosti s kombinací mini ICE (isofosfamid, etoposid, karboplatina) po selhání antracyklinu a taxanů u pacientek s metastazujícím karcinomem prsu, Klinická onkologie 14, 202-205 (2001)
23. <http://www.teva.cz/products.aspx?id=106>
24. Pavel Klouda: Moderní analytické metody, Pavel Klouda 2003
25. <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
26. Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL 1984
27. Zýka J. a kolektiv: Analytická příručka 1, SNTL/ALFA 1979
28. Zhou R., Frostvik-Stolt M., Liliemark E.: Determination of etoposide in human plasma and leukemic cells by high-performance liquid chromatography with elektrochemical detection, Journal of Chromatography 757, 135-141 (2001)
29. Chen CH-L., Uckun F.M.: Highly sensitive liquid chromatography-elektrospray mass spectrometry (LC-MS) method for the determination of etoposide levels in human serum and plasma, Journal of Chromatography 744, 91-98 (2000)
30. Pinkerton C.R., Dick G., Aherne G.W.: 24-Hour Plasma Etoposide Profile After Oral and Intravenous Administration in Children, Pergamon Press Lid 29A, 1479-1481 (1993)
31. Saita T., Fujiwara K., Kitagawa T., Mori M., Takata K.: A highly sensitive enzyme – linked immunosorbent assay for etoposide using β – D – galactosidase as a label, Cancer Chemotherapy and Pharmacology 27, 115 – 120 (1990)

32. Yamashita K., Watanabe K., Takayama H., Ishibashi M., Miyazaki H.: Measurement of plasma etoposide by radioimmunoassay, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* 5, 11 – 20 (1987)
33. Hsi Ho D., Kanellopoulos K.S., Brown N.S., Issel B.F., Bodey G.P.: Radioimmunoassay for Etoposide and Teniposide, *Journal of Immunological Methods* 85, 5 – 15 (1985)
34. Bartůňková J., Paulík M. a kolektiv: *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing 2005
35. <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--validace-a-verifikace-metod>
36. <http://www.hplc.cz/>
37. Racek J.: *Klinická biochemie*, Galén 2006
38. Kato Y., Mawatari H., Nishimura S – I., Sakura N., Ueda K.: Determination of Etoposide Serum Concentrations in Small Pediatric Samples by an Improved Method of Reversed – Phase High – Performance Liquid Chromatography 57, 21 – 24 (2003)

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CNS	centrální nervový systém
DNA	deoxyribonukleová kyselina
CT	computer tomograph
NMR	nukleární magnetická rezonance
i.v.	do žíly (intravenosae)
HPLC	high performance liquid chromatography (vysokotlaká kapalinová chromatografie)
ICE	ifosfamid, karboplatina, etoposid
EKG	elektrokardiograf
GC	gas chromatography (plynová chromatografie)
SFC	supercritical fluid chromatography (superkritická fluidní chromatografie)
LC	liquid chromatography (kapalinová chromatografie)
PC	paper chromatography (papírová chromatografie)
TLC	thin liquid chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
UV	ultra violet (ultrafialová oblast)
VIS	viditelná oblast světelného záření
EIA	enzymoimunoanalýza
ELISA	enzyme-liked immunosorbent assay
DPEM	N-[β -(4-diazophenyl)ethyl]maleimide
RIA	radioimunoanalýza
IVD MD	In vitro diagnostic – medical device
ETO	etoposid
I.S.	vnitřní standard
SD	směrodatná odchylka
CV	variační koeficient
\bar{x}	průměr
CSW	chromatography station for windows