

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2008

Ungerová Iveta

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Stanovení methotrexátu a 7-hydroxymethotrexátu metodou HPLC
a korelace s imunochemickým stanovením celkového methotrexátu**

Vypracovala:

Iveta Ungerová

Vedoucí bakalářské práce:

Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, Csc.

Školitel:

Ing. Eva Klapková, Ph.D.

Studijní obor:

Zdravotnická bioanalytika

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, 15.5.2008

.....

podpis

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Prof. MUDr. Jaroslavovi Dršatovi, CSc. a především školitelce Ing. Evě Klapkové, Ph.D., za odborné vedení, všestrannou pomoc, trpělivost a poskytnuté cenné rady, které mi při zpracování této práce poskytli. Dále bych chtěla poděkovat za podporu všem pracovníkům Ústavu klinické biochemie a patobiochemie FN v MOTOLE.

SOUHRN

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit korelaci při stanovení methotrexátu mezi vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a imunochemickým stanovením celkového methotrexátu. Methotrexát patří mezi cytostatika využívající se ve vysokodávkové terapii k léčbě akutní lymfoblastické leukémie. Chromatograficky byl methotrexát stanovován s UV detekcí při 303 nm po deproteinizaci kyselinou trichloroctovou. Fluorescenční polarizační imunoanalýzou byl methotrexát měřen na analyzátoru TDx FLx. Získaná data byla vyhodnocena statistickým programem PrismGraph Pad 5.0. Pomocí statistické analýzy bylo zjištěno, že se jedná o neparametrické rozložení dat na hladině pravděpodobnosti 95%. Data byla vyhodnocena neparametrickým párovým t-testem. V této práci bylo zjištěno, že obě metody spolu velmi dobře korelují u hodnot $> 1 \mu\text{mol/l}$. Zatímco u hodnot nižších než $1 \mu\text{mol/l}$ dochází k nadhodnocování při stanovení pomocí fluorescenční polarizační imunoanalýzy. Toto nadhodnocování je pravděpodobně způsobeno zkříženými reakcemi s metabolity 7-hydroxymethotrexátem a 2,4-diamino- N^{10} -methylpteroovou kyselinou zejména v terminální fázi časového průběhu poklesu methotrexátu. Důvodem může být velice podobná chemická struktura methotrexátu a jeho metabolitů.

Klíčová slova: methotrexát, 7-hydroxymethotrexát, 2,4-diamino- N^{10} -methylpteroová kyselina, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, fluorescenční polarizační imunoanalýza

SUMMARY

The aim of this work was to verify the correlation at determination of methotrexate by high performance liquid chromatography and immunochemically determination of whole methotrexate. Methotrexate belongs to the chemotherapeutic agent commonly used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. Methotrexate was determined chromatographically with UV detection at 303 nm after deproteinization with trichloroacetic acid. Fluorescence polarization immunoassays of methotrexate was measured on TDx FLx analyzer. The data obtained were analyzed utilizing the PrismGraph Pad 5.0 software. The methotrexate measurements were evaluated employing nonparametric paired t-test (p-value <0,05). Our data indicate good correlation between methotrexate levels > 1 $\mu\text{mol/l}$ determined by high performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassays. While the concentration of methotrexate < 1 $\mu\text{mol/l}$ measured by fluorescence polarization immunoassays were overestimated. This could be done because of cross reactivity with metabolites 7-hydroxymethotrexate and 2,4-diamino-N¹⁰-methylptericoic acid. These metabolites could influence the determination of methotrexate, because of the close structural similarities.

OBSAH

	strana
1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1. Akutní lymfoblastická leukémie	2
2.1.1. Diagnostika	3
2.1.2. Klinické projevy	4
2.1.3. Terapie	4
2.2. Methotrexát	6
2.2.1. Mechanismus účinku methotrexátu	6
2.2.2. Leucovorin	8
2.2.3. Dávkování a toxicita	8
2.3. Metody stanovení methotrexátu	10
2.3.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	10
2.3.1.1. Způsoby stanovení methotrexátu kapalinovou chromatografií	13
2.3.2. Imunochemické stanovení	15
2.3.2.1. Způsoby stanovení methotrexátu imunochemicky	15
2.3.2.2. Fluorescenční polarizační imunoanalýza	16
2.3.2.3. Homogenní enzymoimunoanalýza	17
2.4. Cíl práce	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1. Přístroje a pomůcky	20
3.2. Příprava reagensů a vzorků	22
3.2.1. Příprava mobilní fáze	22
3.2.2. Příprava standardního roztoku methotrexátu	22
3.2.3. Příprava vzorku pro HPLC analýzu	22
3.2.4. Příprava vzorků pro stanovení FPIA	23
3.2.5. Chromatografická analýza vzorku	23
3.3. Kalibrace a kontroly	24

4. VÝSLEDKY A DISKUSE	27
4.1. Kalibrace methotrexátu při HPLC analýze	27
4.2. Výsledky naměřených hodnot methotrexátu	28
5. ZÁVĚR	36
6. LITERATURA	37
7. SEZNAM ZKRATEK	39

1. ÚVOD

Akutní lymfoblastická leukémie představuje heterogenní onemocnění, jehož jednotlivé formy se liší klinickými příznaky, laboratorními nálezy, morfologií nádorových buněk, jejich fenotypem a genotypem. Patří mezi maligní onemocnění, které je charakterizováno progresivní infiltrací kostní dřeně a lymfatických orgánů nezralými lymfoblasty. Akutní lymfoblastická leukémie je u dětí mladších deseti let nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním a tvoří 80% všech leukémií dětského věku. Celkově tvoří přibližně 25% zhoubných nádorových onemocnění u dětí. V České republice je ročně diagnostikována u 60-80 dětí. Nejdůležitějším prognostickým faktorem je správně zvolená a provedená léčba. Celková doba léčby většinou trvá dva roky. Klíčovými cytostatiky pro léčbu akutní lymfoblastické leukémie jsou vinkristin, asparagináza, antracykliny, merkaptopurin, cyklofosfamid, cytosin - arabinosid, kortikoidy a methotrexát^{1,2,3,4,5}.

Methotrexát je derivátem kyseliny listové patřící mezi cytostatika ze skupiny antimetabolitů. Jeho výhodou je značný dávkový rozsah, dostupný antagonist a volitelný způsob podání. Až 90% podané dávky methotrexátu se vyloučí během 12 hodin. Při normální hydrataci pacienta a normálních renálních funkcích sérové hladiny methotrexátu úměrné dávce. Leucovorin je antidotum pro methotrexát, které proniká do buněk stejnými transportními mechanismy jako methotrexát. Antagonismus leucovorinu/methotrexátu se v klinice využívá k záchraně zdravých buněk a k léčbě akutních intoxikací methotrexátem. Dávky leucovorinu a časové intervaly mezi dávkami se odhadují podle plazmatických koncentrací methotrexátu detekovaných u jednotlivých nemocných. Methotrexát se kromě leukémií dále využívá k léčbě těžkého astma, solidních tumorů a u autoimunitních onemocnění^{6,7,9,10}. K terapeutickému monitorování methotrexátu se nejčastěji využívají imunochemické a chromatografické stanovení.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Akutní lymfoblastická leukémie

Akutní leukémie představují heterogenní skupinu maligních hematologických onemocnění^{1,2}. Jsou charakterizované anomální proliferací a diferenciací hemopoetické prekursorové buňky, která není schopna vývinu do normální zralé funkční populace. Podstatou patogeneze a nakonec i klinických projevů onemocnění je infiltrace kostní dřeně nádorovou masou - leukemickou blastickou populací, která znemožňuje růst ostatních hemopoetických řad³. Podle toho, zda vznikly maligním zvratem buňky myeloidní nebo lymfoidní řady je dělíme na dvě základní skupiny:

- akutní myeloblastická leukémie (AML)
- akutní lymfoblastická leukémie (ALL)^{3,4}

Akutní lymfoblastická leukémie u dospělých představuje pouze 20% všech akutních leukémií a postihuje převážně děti. U dětí tvoří:

- ALL 80% všech leukémií
- akutní myeloidní leukémie 15%
- myelodysplastického syndromu 5%
- chronické myeloidní leukémie 2%
- chronická lymfatická leukémie se u dětí nevyskytuje^{2,4}

ALL je u dětí mladších deseti let nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním, které vzniká pravděpodobně jako abnormální odpověď organismu na běžné virové infekce u predisponovaných jedinců^{1,5}. Asi 5% leukémií vzniká u predisponovaných jedinců, kterými jsou děti s vrozenými poruchami:

- chromozomální výbavy - nejčastěji se jedná o Downův syndrom (10x vyšší výskyt leukémie v prvních 10 letech života než u zdravých dětí)

- genetická onemocnění spojená s chromozomální nestabilitou - Fanconio anémie, ataxie teleangiectazie
- obranyschopnosti - Wiskottův-Aldrichův syndrom, kombinované imunodeficiencie^{1,2}

2.1.1. Diagnostika

ALL je definována nálezem 25% blastů v aspirátu kostní dřeně. Je-li v kostní dřeni méně než 25% blastů, jde nejčastěji o ne-Hodgkinův lymfom nebo pomalu se rozvíjející leukémii. Dle French-American-British (FAB) jsou akutní leukémie klasifikovány na základě vyšetření nátěrů periferní krve a kostní dřeně, barvených podle Romanovského a paletou cytochemických barvení¹. ALL se dle morfologie dělí na 3 základní typy:

- ALL L1 - tvořena malými lymfoblasty, nejčastější typ u dětí
- ALL L2 - větší lymfoblasty rozdílné velikosti
- ALL L3 - velké lymfoblasty s širokou cytoplazmou, častější vakuolizace³

Nejlepší prognózu má typ L1, naopak typ L3 velmi špatně reaguje na léčbu a většina nemocných umírá do 2 let. V dětském věku je lymfoblastická leukémie, zejména jde-li o typ L1 s příznivými prognostickými znaky, úspěšně léčena, děti dosahují kompletních a dlouhotrvajících remisí téměř v 80%³.

Imunofenotyp je stanoven vyšetřením na průtokovém cytometru panelem monoklonálních protilátek zaměřených proti nejčastějším molekulám na povrchu blastů. Tyto blasty mají typický vzhled se sytě modrou cytoplazmou a četnými vakuolami. Jde o generalizovaný nehodgkinský lymfom Burkittova typu. Správné zařazení nemoci je podmínkou správné léčby. Monoklonální protilátky, určující povrchové buněčné antigeny umožňují někdy nesnadné rozlišení nezralé formy AML od ALL, což má zásadní význam pro rozhodnutí o správné léčbě^{1,2}. Imunofenotyp ALL tvoří:

- nezralé prekurzory B-lymfocytů 80%
- prekurzory a zralé T-lymfocyty 15%

- zralé B lymfocyty 2% ¹

2.1.2. Klinické projevy

Na počátku onemocnění je častým příznakem horečka, která může být indukovaná pyrogenními cytokiny uvolňovanými z leukemických buněk. Onemocnění se klasicky projevuje "leukemickou trias", která je tvořena zvětšením jater a sleziny pod oblouk žeberní, zvětšením mízních uzlin a krvácivými projevy na kůži a sliznicích. Častým projevem je únava, nechutenství, horečka a infekce pomalu reagující na léčbu. Asi jedna třetina dětí si stěžuje na bolesti kostí a kloubů nejčastěji končetin, ale i páteře. Na RTG se často nacházejí typické změny ^{1,2}:

- příčné proužky projasnění v metafýzách dlouhých kostí
- osteolytická ložiska
- generalizovaná osteoporóza
- kompresivní zlomeniny obratlů
- vyjímečně ložiska sklerózy ¹

V krevním obrazu je u většiny dětí anémie, trombocytopenie a leukocytóza s nálezem nezralých blastů v diferenciálu bílých krvinek. U dětí s leukémií doprovázenou bolestmi skeletu se často leukemické buňky do krve nevyplavují, což dále stěžuje stanovení diagnózy. Rozhodujícím diagnostickým vyšetřením je aspirace kostní dřeně, která v případě ALL prokáže při cytologickém vyšetření infiltraci uniformní populací blastů, které tvoří většinou více než 80 % jaderných krvinek ².

2.1.3. Terapie

Pro stanovení vhodného léčebného protokolu je nutné stanovit rizikový faktor, který se určuje podle absolutního počtu blastů, velikosti jater a sleziny. ALL se podle těchto kritérií dělí na tři skupiny s nízkým, středním a vysokým rizikem. Pomocnými faktory pro stanovení

léčebného postupu jsou terapeutická odpověď na kortikoidy a dále jednotlivé klasifikace (morfologická, cytochemická, imunologická a cytogenetická) ². Léčba se řídí dle kombinovaných protokolů obsahujících kortikoidy, cyklofosfamid, cytosin-arabinosid, L-asparaginázu, 6-merkaptopurin, methotrexát, vinkristin, daunorubicin, doxorubicin, prednisolon, dexametason, ozáření lebky v dávce 24 Gy a intratékální aplikace methotrexátu a cytosin-arabinosidu ^{1,2,3}.

Koncept léčby dětské ALL má čtyři základní fáze:

- indukční
- konsolidační
- prevence leukemické infiltrace mozku
- udržovací léčbu ^{1,2}

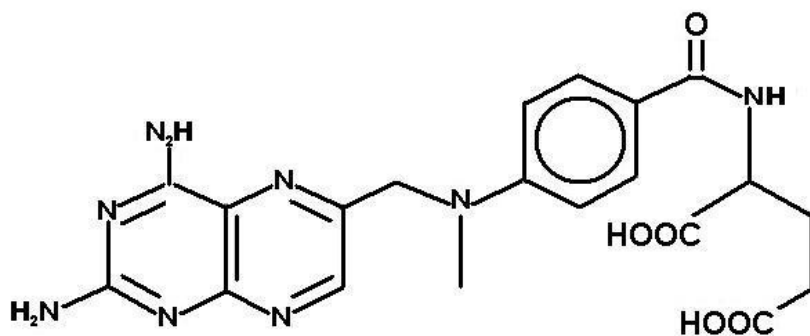
Od počátku léčby je aplikován methotrexát (MTX) do páteřního kanálu v rámci prevence CNS leukémie ². Výhodou využití MTX je široké spektrum účinku, značný dávkový rozsah (0,5 - 33 g/m² pro maligní procesy), dostupný antagonist, volitelný způsob podání, je možná detekce MTX i jeho metabolitu v biologických tekutinách. Ve srovnání s ostatními cytostatiky jsou relativně slabší neurotoxické účinky ⁶.

Po skončení intenzivní léčby, která trvá přibližně 8 měsíců následuje udržovací léčba perorálně podávaným merkaptopurem a methotrexátem ². Pravidelně se provádějí sternální punkce s morfologickým, cytogenetickým, kultivačním a imunofenotypizačním vyšetřením. Délka terapie pro dětskou ALL od začátku onemocnění při kompletní 1. remisi jsou 2 roky ^{2,3}. Jestliže po 2 letech kompletní 1. remise trvá, je možné ukončit veškerou protinádorovou léčbu a pacienta pouze ambulantně sledovat. I po ukončení léčby jsou relapsy možné, nejčastěji v 1. a 2. roce po ukončení léčby ³.

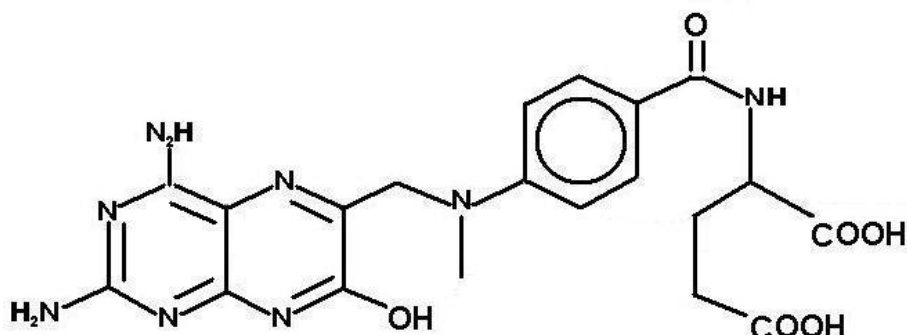
2.2. Methotrexát

2.2.1. Mechanismus účinku methotrexátu

Methotrexát (obr.1) je antagonist kyseliny listové, který se váže na aktivní katalytické místo tetrahydrofolátreduktázy (DHFR). MTX inhibuje tvorbu tetrahydrofolátu, nositele jednonukleotidových zbytků. Tím se zastavuje činnost thymidilát syntetázy, tvorba thymidilátu, purinových nukleotidů i DNA. MTX se na DHFR váže velmi velmi pevně a při pH 6 komplex zřejmě vůbec nedisociuje. Při fyziologickém pH působí methotrexát jako reverzibilní kompetitivní inhibitor enzymu. MTX se metabolizuje na 7-hydroxymethotrexát (obr. 2), který se převádí na polyglutamáty a rovněž se kumuluje v buňce. Polyglutamáty jsou stejně účinnými inhibitory DHFR jako MTX. V buňce však setrvávají déle než MTX, a to může být důležité pro celkovou délku účinku MTX^{7,8}.



Obr. 1: Methotrexát⁹



Obr. 2: 7-hydroxymethotrexát (7-OH MTX)⁹

Cílem cytostatické léčby je zajistit optimální farmakoterapeutický účinek (dlouhodobou kompletní remisi) za přijatelné toxicity vůči zdravé tkáni. Současně je nutno zajistit prevenci sekundární rezistence. K dosažení tohoto cíle vede zvyšování dávek, kombinace cytostatik s jiným druhem terapie (chirurgická terapie, radioterapie), biochemická modulace účinku, optimální cesta podání cytostatik a využití cirkadiálních rytmů pro podporu výhodných vlastností cytostatik. Novou cestou je hledání a využití vztahu (korelace) mezi cytostatickým účinkem a kinetikou cytostatik, které by sloužilo k predikci terapeutického i toxického účinku a také k odhadu individuálního dávkového režimu cytostatik¹⁰. Předpokládá se, že rezistence nádorů na MTX může vzniknout několika mechanismy:

- snížením transportu MTX
- snížením afinity DHFR k MTX
- zvýšením syntézy, a tím zvýšením koncentrace DHFR⁷

Důležité je také poznat, zda je účinek cytostatika z hlediska buněčného vlivu fázově specifický nebo nespecifický. Fázově specifické látky mají nejmohutnější účinek na hematologické malignity a na tumory s vysokým procentem buněk v proliferaci. Fázově nespecifické látky lze použít jak u solidních tumorů s nízkou růstovou frakcí, tak u rychle proliferujících nádorů.

- fázově specifická cytostatika - jsou antimetabolity, bleomycinová antibiotika, alkaloidy barvíčku
- fázově nespecifická jsou - alkylující farmaka, antibiotika⁸

Pravidelným průvodním příznakem léčby cytostatiky je toxicita. U některých cytostatik lze toxicitě částečně čelit současným nebo následným podáním antidota, což umožní i podstatné zvýšení dávky cytostatika⁷. Ve srovnání s ostatními cytostatickými látkami je však MTX méně toxický a jeho toxicita je závislá na plazmatické koncentraci. Je jediným cytostatikem, které má svého antagonistu, leucovorin, proto se pro farmakoterapii nabízí v široké škále dávek¹⁰.

2.2.2. Leucovorin

Leucovorin (kyselina folinová) je antidotum pro MTX. Proniká do buněk stejnými transportními mechanismy jako MTX. Protože u normálních buněk je transportní schopnost zachována, může do těchto buněk leucovorin proniknout i při relativně nízkých plazmatických koncentracích. Do nádorových buněk s porušeným transportním mechanismem se při nízké koncentraci nedostane. Toho se využívá v léčbě vysokými (gramovými) dávkami MTX. Následná aplikace leucovorinu "zachrání" normální buňky před toxickým působením MTX, do nádorových buněk však leucovorin nepronikne a žádaný toxický účinek cytostatika se může uplatnit v plné míře ⁷. Cílem užití leucovorinu je záchrana (rescue) zdravých buněk, která musí respektovat dvě zásady:

- záchrana musí být zahájena dříve, než skončí kritická doba expozice zaručující přechodný toxický účinek methotrexátu vůči zdravým buňkám
- záchrana musí být opakována tak dlouho, dokud není dosažení kritického prahu plazmatických koncentrací methotrexátu (0,05 $\mu\text{mol/l}$), kdy už zdravým buňkám nehrozí nebezpečí toxického poškození ¹⁰

To, že spoléháme na záchranu buněk zdravých, je umožněno určitou selektivitou mechanismu účinku methotrexátu. Selektivita je v ukládání methotrexátu v podobě polyglutamátů zejména v buňkách maligních. Tyto polyglutamáty jsou opatřeny dlouhými řetězci, které brání vstupu leucovorinu do buňky, inhibují polyglutamaci endogenních intracelulárních folátů a úspěšně s nimi kompetují o vazbu na cílové struktury. Tím zároveň omezují možnost účinné záchrany patologické buňky ve srovnání s buňkou zdravou ¹⁰.

2.2.3. Dávkování a toxicita

MTX se podává intravenózně nebo perorálně. Až 90% podané dávky MTX se vyloučí během 12 hodin. V organismu není MTX metabolizován. Proto jsou při normální hydrataci pacienta a normálních renálních funkcích sérové hladiny MTX úměrné dávce. Toxické účinky

MTX se projevují především v kostní dřeni, méně časté jsou toxické účinky na gastrointestinální sliznice a kožní projevy toxicity⁷.

Podání nízkých dávek (low-dose MTX < 30 mg) přichází v úvahu ve farmakoterapii nezhoubných onemocnění. Indikací je např. těžká forma psoriázy rezistentní na léčbu antipsoriatiky první volby, revmatoidní polyartritida nebo Crohnova choroba. Léčba nízkými dávkami MTX má své místo také v léčbě malignit, např. dlouhodobé perorální podávání v udržovací fázi léčby ALL dětského věku po předchozí indukční farmakoterapii. Plazmatické koncentrace MTX jsou nízké, proto leucovorin jako antagonist přichází v úvahu při mimořádné intoxikaci¹⁰.

Podstatně vyšší rizika toxicity přinášejí střední (0,5-1 g/m²) a zejména vysoké intravenózní dávky methotrexátu podávaného v infúzi (high-dose MTX > 1-33 g/m²) při invazivní fázi léčby ALL dětského věku, nehodgkinského lymfomu a osteosarkomu. Smyslem zvyšování dávek MTX a prodlužování doby expozice je opět dosažení kompletní remise nemoci. Předpokládá se, že vzestup extracelulární koncentrace MTX vlivem vysoké dávky navodí podmínky pro distribuci MTX do buňky cestou pasivní difúze, která je řízena koncentračním spádem. Tím nahradí aktivní saturabilní transport původně určený pro kyselinu tetrahydrolistovou, kterým je MTX transportován intracelulárně při nízkých extracelulárních koncentracích¹⁰. Při terapii vysokými dávkami se jako "ochranná léčba" po infúzi MTX za 2-4 hod podává 5-40 mg/m² leucovorinu v 3-6 hodinových intervalech pod dobu 48-72 hodin. Dávky leucovorinu je třeba přizpůsobit průběžně monitorované koncentraci MTX v séru⁷.

2.3. Metody stanovení methotrexátu

2.3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografie patří mezi separační metody, při které se separují složky obsažené ve vzorku. Společným znakem chromatografických metod je nepřetržitá - kontinuální separace složek mezi dvě fáze; pohyblivou - mobilní často označovanou jako eluent a nepohyblivou tzv. stacionární fází ^{11,12,13}.

Pohyblivou fází představuje kapalina, tj. eluční činidlo, kterými jsou jednotlivé složky z kolony vymývány ¹³. Složení mobilní fáze může zůstat stálé tzv. isokratická eluce nebo se během separace mění tzv. gradientová eluce ¹¹. Často se užívá směs rozpouštědel (methanol, acetonitril) s vodou nebo vodným roztokem pufru ¹⁴.

Nepohyblivou, tj. stacionární fází tvoří materiál, kterým je plněná chromatografická kolona nebo ze kterého je zhotovena tenká vrstva, na které dělení probíhá. Stacionárními fázemi ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) jsou nejčastěji modifikované silikagely nebo různé kopolymery. Povrch silikagelu je díky silanovým skupinám Si-OH polární a slabě kyselý a může být modifikován různými alkylchlorsilany s délkou alifatického uhlíkového řetězce 1 až 18, které tyto skupiny mohou nahradit a vytvořit vázané fáze. Jsou to hydrolytický stálé siloxany, které dávají stacionární fází specifické charakteristiky odlišné od nemodifikovaného silikagelu. Mezi nejpoužívanější vázané fáze patří oktadecylsiloxany (C18 čili ODS), které jsou užívány v režimu reverzních fází. Silikagel napojený nepolárními řetězci C8 nebo C18 představuje nepolární pohyblivou fází a kapalina protékající kolonou představuje pohyblivou polární fází. Sorpce je proces, kdy se dělená látka z mobilní fáze zachytí na fází stacionární, desorpce je proces obrácený. V chromatografii se oba principy neustále střídají a celý systém je v dynamické rovnováze ^{13,14}.

Mezi hlavní sorpční mechanismy patří principy :

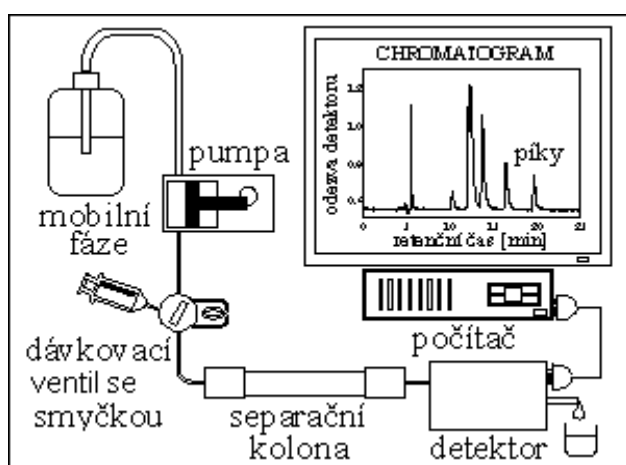
- rozdělovací
- adsorpční
- iontově výměnný

- gelový
- afinitní^{14,15}

Při adsorpci můžou působit

- hydrofóbní interakce (van der Waalsovy síly)
- interakce dipól-dipól
- vodíková vazba
- elektrostatická interakce^{14,15}

Zařízení pro kapalinovou chromatografii se nazývá kapalinový chromatograf (obr.3). Skládá se ze zásobníku kapaliny s odplyňovačem, z vysokotlakého čerpadla, z chromatografické kolony, z dávkovače vzorku (manuální ventil, autosampler), detektoru a příslušného počítačového softwaru¹³.



Obr. 3: Kapalinový chromatograf¹⁵

Pracuje se s úzkými kolonami (průměr 2-8 mm), k jejich plnění se používá tříděný materiál s malými částicemi. Pro separaci vzorků extrahovaných do organických rozpouštědel se obvykle používá tzv. reverzních fází. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a nakonec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované. K ochraně kolony se používají předkolony

umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení. Chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály. Kvalita chromatografického dělení je charakterizovaná účinností kolony a rozlišením. Účinnost chromatografické kolony je definovaná počtem teoretických pater. Materiál čerpadla nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky ^{8,11,13}.

U HPLC prochází eluát vytékající z kolony průběžně detektorem umístěného na výstupu z kolony. Detektory pak automaticky a kontinuálně měří některou z fyzikálních vlastností eluátu ¹³.

Používané detektory:

- absorpční fotometrický
- fluorescenční
- refraktometrický
- amperometrický
- vodivostní
- detektor s diodovým polem (DAD)
- hmotnostní spektrometr ¹⁵

Detektory v HPLC by měli být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fází. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost ¹¹.

Signál z detektoru je automaticky kvalitativně i kvantitativně vyhodnocen pomocí počítačového programu. Počítačový program měří průběžně retenční čas, provádí integraci píků a slouží též k programování chromatografických podmínek a k jejich kontrole v průběhu analýzy. Poloha píku na ose X (retenční čas) charakterizuje kvalitu (srovnává se se záznamem současně děleného standardu) a výška píku (příp. jeho plocha) udává kvantitu chromatografované látky ^{8,13}.

Předností HPLC je rychlost analýzy, vysoká dělicí schopnost, možnost automatické detekce, identifikace a kvantitativní vyhodnocení chromatogramu. Touto technikou je možné dělit i termolabilní a polární látky. HPLC se v klinické biochemii využívá při terapeutickém

monitorování léků, identifikaci a stanovení léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu, steroidních hormonů, aminokyselin a jejich derivátů, katecholaminů, ke kontrole čistoty léků atd. ¹³.

2.3.1.1. Způsoby stanovení methotrexátu kapalinovou chromatografií

Cosolo et al. stanovovali MTX a jeho metabolit 7-OH MTX. K 1,92 ml plazmy přidali 80 μ l vnitřního standardu 8-chlortheofylinu a 200 μ l kyseliny chloristé. Třepali na vortexu a točili 20 min při 2000 rpm, supernatant nanášeli na aktivované předkolonky. Předkolonky aktivovali promytím 10 ml methanolu, 10 ml vody a 10 ml 0,02 M acetátového pufru pH 5. Supernatant naředili 10 ml 0,02 M acetátového pufru a nanесли na aktivovanou předkolonku. Předkolonku opět promyli 10 ml H₂O a 2 ml 10% methanolu. MTX byl z kolony vymyt methanolem a sušen dusíkem při 60 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 100 μ l 5 mM kyseliny chlorovodíkové a a poté nastříknut na kolonu Rapidal Pack C18 (reverzní fáze). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a dihydrogenfosforečnanu draselného pH 3,9. Průtok mobilní fáze byl 2,5 ml/min a detekce probíhala při 313 nm. Extrakční procedura 20 x zvyšuje koncentraci MTX v eluátu ¹⁶.

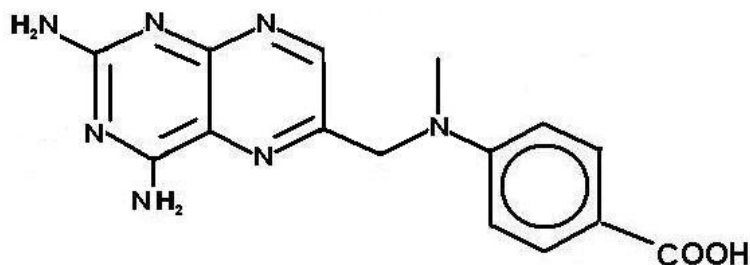
Fotoohi et al. stanovovali MTX pomocí předklonek C8, kdy nejprve aktivovali předkolonky 3 ml methanolu a 3 ml 0,1 M kyseliny fosforečné. Dále nanесли plazmu ředěnou kyselinou fosforečnou. Kolonky promývali 5% methanolem a elovali 2% kyselinou trifluorooctovou. Následovalo sušení dusíkem při 40 °C. Odparek rozpustili v 0,1 M kyselině fosforečné, třepali 5 min, centrifugovali a supernatant nastříkli na kolonu Chromtech RP-C18. Jako mobilní fáze byla použita směs 100 mM fosfátového pufru pH 6,5, acetonitrilu a 30% peroxidu (92:6:2). Průtok mobilní fáze byl 1ml/min. Použili fluorescenčního detektor s excitační a emisní vlnovou délkou (350 a 435 nm) ^{19,17}. Albertioni et al. stanovovali MTX stejnou metodou jen dělení probíhalo na jiné koloně. Použili kolonu C18 Perkin-Elmer (80 x 4,6 mm, 3 μ m) ¹⁷.

Aboleneen et al. použili ke stanovení MTX extrakční kolonky C18 Sep-Pak, kolonu Ultrasphere ODS Beckman (150 x 4,6 mm) o velikosti částic 5 μ m. Extrakční kolonky byly

aktivovány 0,2 M fosfátovým pufrem pH 6. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a pufru (0,01 M dihydrogenfosforečnanu draselného a 0,02 M methylamonium chloridu) pH 2,5 (1:9). Průtok mobilní fáze 1 ml/min. K detekci byl použit DAD detektor s vlnovou délkou 313 nm¹⁸.

Slørdal et al. stanovovali MTX s UV detekcí při 370 nm na koloně Supelcosil LC 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). K 500 µl vzorku přidali 200 µl 2M kys. chloristé, protřepali 30 s a točili 15 min. Stáhli supernatant a nastříkali 100 µl supernatantu. Jako mobilní fázi použili methanol s dihydrogenfosforečnanovým pufrem (0,1 M, pH 6,7). Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min²⁸.

Rubino et al. popisují různé způsoby stanovení MTX a jeho metabolitů 7 OH MTX, 2,4-diamino-N¹⁰-methylpteroové kyseliny (obr. 4) atd. Nejčastěji popisují stanovení MTX samotného nebo se 7-OH MTX. MTX a jeho metabolity mohou být separovány různými způsoby např. na reverzních fázích, iontově-výměnnou chromatografií. Vzorek lze připravit extrakcí kapalina-kapalina, precipitací proteinů, extrakcí na pevných fázích nebo přímým nástřikem vzorku. K precipitaci se využívá kyselina trichloroctová (TCA), kyselina chloristá. Popisují různé způsoby detekce. K detekci mohou být využity např. fluorimetry, UV spektrofotometry, hmotnostní spektrometrie. Absorbční maximum v UV-VIS je závislé na pH použité mobilní fáze. Nejčastěji využívaná vlnová délka je 303-313 nm Délka analýz se pohybuje mezi 8-40 min⁹.



Obr. 4: 2,4-diamino-N¹⁰-methylpteroová kyselina (DAMPA)⁹

2.3.2. Imunochemické stanovení

Imunochemické metody jsou založeny na reakci antigenu (Ag) se specifickou protilátkou (Ab) za vzniku imunokomplexu (AgAb). Imunitní odpověď může vyvolat pouze kompletní antigen. Nekompletní antigen, tzv. haptén vyvolává tvorbu protilátek pouze v případě, že je navázán na bílkovinný nosič^{21,22}. Přehled základních imunoanalytických metod:

- kvalitativní metody-imunoelektroforéza, imunofixace
- kvantitativní metody pro koncentrace bílkovin 10 mg/l a vyšší jsou radiální imunodifúze dle Manciniové, elektroimunostanovení dle Laurella, imunonefelo-metrie a imunoturbidimetrie
- kvantitativní metody pro koncentrace bílkovin nižší než 10 mg/l jsou izotopové a neizotopové²²

Ke stanovení imunokomplexu se využívají techniky založené na značení antigenu nebo protilátky. Pomocí značení pak sledujeme např. poměr mezi komplexem AgAb značeným a neznačeným a tím stanovíme koncentraci Ag²¹.

Podle způsobu značení a měřicí techniky lze imunoanalýzy se značenými reaktanty rozdělit na:

- radiometrické
- enzymové
- fluorescenční
- luminiscenční popř. elektrochemiluminiscenční¹⁴

2.3.2.1. Způsoby stanovení methotrexátu imunochemicky

Automatické analyzátory využívají nejčastěji k monitorování MTX během vysokodávkové terapie techniky:

- fluorescenční polarizační imunoanalýzu FPIA
- homogenní enzymoimunoanalýzu EMIT^{17,19,20}

Tyto techniky vyžadují poměrně nenáročnou přípravu vzorku a poskytují rychle výsledky. Často rychlý odhad koncentrací MTX v plazmě kvůli zkřížené reakci s metabolity, poskytne nespolehlivý základ pro účinnou terapii stejně jako možná zvýšená rizika recidivy způsobené podáním nadměrné dávky leukovorinu. Každá z těchto technik má své výhody a limity¹⁹. MTX stanovovali technikami FPIA 2 (využívající monoklonální protilátky) na analyzátoru FLx TDx Abbott a EMIT na lékovém analyzátoru firmy Behring Diagnostic např. Albertioni et al. (zkoušeli i metodu FPIA 1 s polyklonálními protilátkami), Fotoohi et al.^{17,19,28}.

2.3.2.2. Fluorescenční polarizační imunoanalýza

Fluorescenční polarizační imunoanalýza je typ homogenní imunoanalýzy, která se uplatňuje zejména při stanovení malých antigenů např. léků, kdy se využívá rozdílné rychlosti rotace malé molekuly Ag a velké molekuly imunokomplexu^{23,24,25}.

Principem FPIA je homogenní kompetitivní imunoanalýza, kdy Ag značený fluoroforem soutěží s Ag ve vzorku o vazbu na limitované množství specifické protilátky. Je-li stanovovaný Ag ve vzorku v nízké koncentraci, naváže se většina značeného Ag na specifickou protilátku a vytvoří tak velké molekuly značených imunokomplexů. Tyto velké imunokomplexy rotují pomalu, neruší tak fluorescenční polarizaci a výsledný měřený signál je vysoký. Při vysoké koncentraci stanovovaného Ag ve vzorku zůstává mnoho molekul značeného antigenu volných. Tyto malé molekuly rotují rychle, proto působí oslabení fluorescenční polarizace. Měřený signál je nepřímo úměrný koncentraci měřeného analytu²⁶.

Optické uspořádání je kombinací fluorimetrie a polarimetrie. Halogenová lampa vysílá světlo různých vlnových délek. Před zdroj světla se vkládá interferenční filtr, který propuští jen modré světlo (481-489 nm). Toto světlo prochází tekutým polarizačním krystalem, ze kterého vychází polarizované modré světlo, kmitající v jedné rovině. Vložíme-li

do polarizovaného světla fluoreskující látku fluorofor, uvede se do excitovaného stavu. Po excitaci se fluorofor vrací do ustáleného stavu a vyzařuje zelené světlo (525-550 nm), které prochází filtrem a dopadá na fotonásobič. Excitační polarizátor musí být schopen velmi rychle měnit polarizaci světla ve dvou na sebe kolmých osách. Nejčastěji používané fluorofory ve fluorescenčních imunoreakcích jsou fluorescein a methylumbelliferylfosfát^{13,24,25,26}.

Imunochemické metody s fluorescenční detekcí jsou citlivější a specifitější než absorbní nebo turbidimetrické metody zvláště v případě nízkých koncentrací. Při nízké koncentraci je zaznamenána nízká absorbance, tj. velmi malý rozdíl mezi dopadajícím a vycházejícím zářením. Při fluorimetrickém měření se zaznamenává pouze emitované záření proti velmi slabému pozadí, proto je měření mnohem přesnější. Fluorescence je také specifitější, protože existuje jen málo přirozených fluoroforů, které by mohly působit interferenci²⁶. Tento princip využívají např. analyzátory firmy Abbott a Dade-Behring²⁴.

2.3.2.3. Homogenní enzymoimunoanalýza

Enzymoimunoanalýza (EIA) patří mezi neizotopové imunochemické metody. Dle uspořádání dělíme EIA do dvou skupin:

- metody homogenní - EMIT
- metody heterogenní - ELISA^{14,21,22}

U homogenních metod je postup analýzy přizpůsoben tak, že celá reakce probíhá v jedné zkumavce. Odpadá nutnost separace komplexu AgAb od ostatních složek systému. Měříme volný značený antigen. Naměřená veličina je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. U heterogenních metod je nutno oddělit komplex AgAb od zbytku reaktantu^{21,22}.

EMIT je založena na kompetitivním principu, kdy stanovovaný Ag a Ag značený enzymem (Ag*) soutěží o vazbu na limitované množství specifické protilátky Ab (obr. 5).

Po ukončení reakce se přidá substrát a po inkubaci se měří absorbance volného Ag*, která je přímo úměrná koncentraci stanovovaného Ag ve vzorku. Značný imunokomplex Ag*Ab je při reakci inhibován a reakce se substrátem se nezúčastní. Proto není nutné u této techniky oddělovat volný Ag* od značeného Ag*Ab¹³.



Obr. 5: Kompetitivní reakce

EMIT je komerční název pro homogenní kompetitivní enzymoimunoanalýzu, která se využívá pro stanovení nízkomolekulárních látek (léků, hormonů). ELISA se využívá pro stanovení Ag s vyšší relativní molekulovou hmotností nebo pro detekci protilátek. ELISA našla uplatnění při diagnostice infekčních onemocnění a stanovení imunoglobulinů. EMIT je v porovnání s technikou ELISA rychlejší, ale ELISA je citlivější^{13,14,27}.

2.4. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo porovnat chromatografické a imunochemické stanovení methotrexátu a zjistit případný vlivu metabolitu 7-OH MTX na imunochemické stanovení celkového methotrexátu při vysokých i nízkých koncentracích.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a pomůcky

Sestava HPLC:

- UV detektor LCD 2083 (ECOM)
- čerpadlo LCD 4020 (ECOM)
- chromatografická kolona - LiChroCART 125-4 LiChrospher 100, RP-18 (5 μm), (Merck)
- předkolonka - LiChroCART 4-4 LiChrospher 100, RP-18 (5 μm), (Merck)
- nástřikový ventil 7725i (Rheodyne) se smyčkou 50 μl
- počítač s vyhodnovacím programem CSW

Reagencie a pomocné roztoky

- standard (+) Amethopterin > 99% (Sigma-Aldrich)
- 7-hydroxymethotrexát (Ústav organické syntézy, VŠCHT, Praha)
- kyselina trichloroctová (Penta)
- antibiotic Drugs 1 Serum Control (Chromsystems)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Penta)
- mobilní fáze-fosforečnanový pufr + methanol (3:1)
- H_2O
- všechna použitá rozpouštědla byla HPLC čistoty

Ostatní materiál

- eppendorfky
- špičky
- vortex (Velp Scientifica)
- centrifuga (Abbott)
- ultrazvuk (Tesla)
- analytické váhy (Mettler-Toledo)

Analyzátor TDx/FLx (Abbott): tvoří samostatnou jednotkou, která zahrnuje:

- dávkování vzorků i reagensů
- inkubaci
- detekci
- a automatické vyhodnocení výsledků

Reagencie a pomocné roztoky

Reagenční set TDx/TDxFLx Methotrexate II Assay system (Abbott) obsahuje :

- reagencie W: Wash solution (4 ml)
 - rozpouštědlo, azid sodný
- reagencie S : Methotrexate II antibody (4,0 ml)
 - myší monoklonální protilátka proti methotrexátu < 0,01% v pufru s proteinovým stabilizátorem
 - azid sodný
- reagencie T: Methotrexate II Fluorescein Tracer (3,5 ml)
 - methotrexátový fluoresceinový tracer < 0,01% v pufru s proteinovým stabilizátorem a surfaktantem
 - azid sodný
- reagencie P: Pretreatment solution (3,5 ml)
 - surfaktant v pufru s proteinovým stabilizátorem
 - azid sodný
- deionizovaná voda - připravovaná reverzní osmózou, přístroj (GORO)
- 9519 - X system dilution buffer (4 x 1 l)

Ostatní materiál

- špičky
- X system sample cartridges (umělohmotné nádoby určené pro vzorek v měřicím karuselu, jsou součástí setu Methotrexate II assay)
- X system cuvettes (skleněné kyvety pro vlastní měření vzorku, jsou součástí setu Methotrexate II assay)

3.2. Příprava reagensů a vzorků

3.2.1. Příprava mobilní fáze

K přípravě mobilní fáze byl použit fosforečnanový pufr a methanol v poměru 3:1. Přesně namíchaná mobilní fáze zajistí přibližně stejné retenční časy, v kterých se bude MTX a 7-OH MTX vylučovat z kolony. Hydrogenfosforečnanový pufr se připravil navážením 10,74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, rozpuštěním v 1 l H_2O a upravením pH (5,6) kyselinou fosforečnou. Před vlastní analýzou bylo nutné mobilní fázi odplynit v ultrazvuku.

3.2.2. Příprava standardního roztoku methotrexátu

K přípravě standardního roztoku MTX byl použit ((+) Amethopterin > 99%) Sigma-Aldrich, který byl ve formě žlutého prášku uchovávan v mrazícím boxu při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Na analytických vahách jsme navážili 12,65 mg standardu MTX a rozpustili ve 100 ml H_2O . K standardu MTX se přidalo několik kapek hydroxidu sodného, aby se lépe rozpustil. Stabilita zásobního roztoku standardu byla půl roku.

3.2.3. Příprava vzorku pro HPLC analýzu

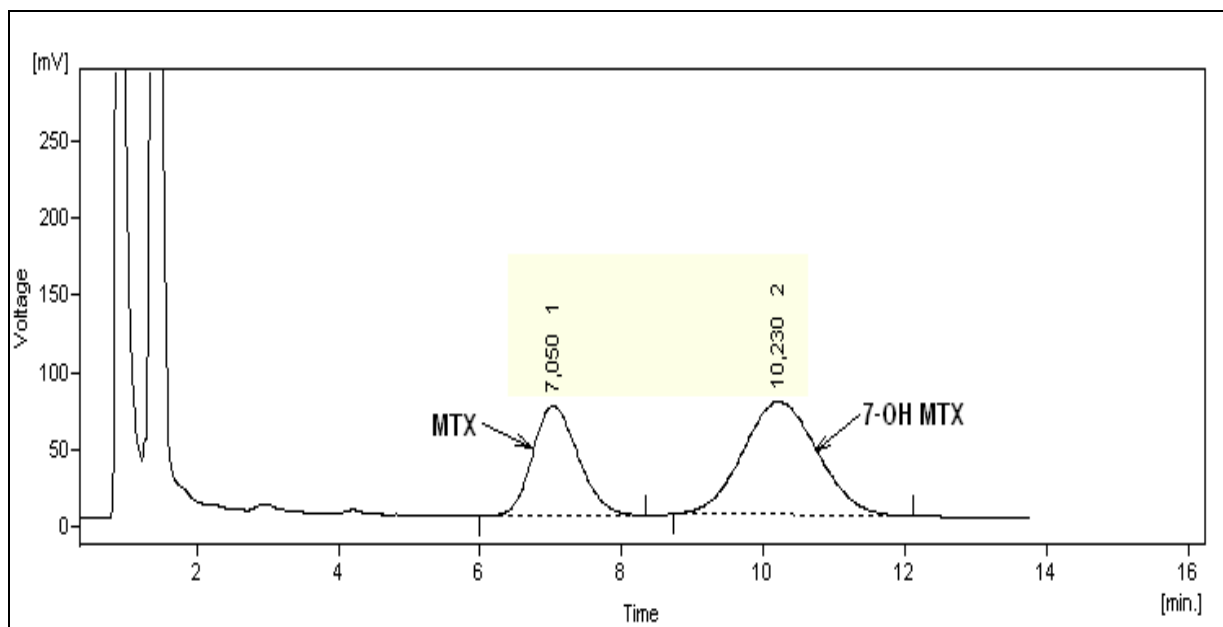
Vzorek séra bylo třeba před vlastní analýzou upravit deproteinizací TCA. Do eppendorfky jsme napipetovali 100 μl séra, 5 μl TCA a 10 μl H_2O . Obsah eppendorfky jsme krátce promíchali na vortexu a točili 5 min při 10 900 rpm. Stočený vzorek byl připraven k analýze. Pomocí Hamiltonovy mikropipety jsme nastříkli 50 μl vzorku do nástřikového ventilu a spustili analýzu. Signál z detektoru byl automaticky kvalitativně i kvantitativně vyhodnocen pomocí programu Chromatography Station for Windows (CSW). Odezva detektoru byla přímo úměrná koncentraci látky, kterou jsme určili z plochy píku. Po skončení analýzy se kolona, Hamiltonova mikropipeta i nástřikový ventil propláchly roztokem metanol: H_2O (1:1).

3.2.4. Příprava vzorků pro stanovení FPIA

Zkumavka se vzorkem byla stočena v centrifuze 10 min při 4000 rpm. Stočený vzorek byl napipetován do cartridge a spolu s kyvetou vložen do karuselu. K analýze bylo zapotřebí 80 μ l séra. Karusel jsme vložili spolu s reagensii do přístroje. Před spuštěním analýzy byl nastaven příslušný mod měření. Pracovalo se v modu 42 s automatickým ředěním (10x, 100x, 1000x) nebo se volil mod 43 bez ředění (pro hodnoty MTX pod 1 μ mol/l). Po skončení analýzy jsme odečetli výsledné koncentrace a karusel vyjmuli z analyzátoru.

3.2.5. Chromatografická analýza vzorku

Chromatografická analýza vzorku probíhala při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. Měření bylo prováděno při 303 nm, kde by mělo být absorpční maximum pro MTX a jeho metabolit 7-OH MTX. Rubino popisoval nejčastěji používanou vlnovou délku při měření MTX v rozmezí 303-313 nm ⁹. Záznam analýzy MTX a 7-OH MTX je zobrazen na obrázku č.6.



Obr. 6: Záznam analýzy MTX a 7-OH MTX

3.3. Kalibrace a kontroly

FPIA:

Methotrexát byl nakalibrován na kalibrátory Methotrexate II calibrators (Abbott). V balení bylo 6 x 2,5 ml kalibrátorů A až F. Koncentrace kalibrátorů byly zaznamenány v příbalovém letáku a jsou zaznamenány v tabulce. Rozsah kalibrační křivky byl nastaven pro vzorky nad 1 $\mu\text{mol/l}$ v rozmezí 0-1000 $\mu\text{mol/l}$ (ředící mod 42). Pro vzorky neředěné o koncentraci MTX pod 1 $\mu\text{mol/l}$ byl nastaven rozsah kalibrační křivky v rozmezí 0-1 $\mu\text{mol/l}$. Mez detekce byla stanovena 0,02 $\mu\text{mol/l}$. S kalibrací a během analýzy vzorků byly proměřovány kontroly. Variační koeficient pro hladinu 1 byl 11,8% a pro hladinu 2 byl 4,5%.

kalibrátor	koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
A	0,00
B	0,05
C	0,15
D	0,30
E	0,60
F	1,00

Tabulka č.1: Kalibrátory

kontrola	průměrná hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	CV %
hladina 1	0,08	11,8
hladina 2	0,81	4,5

Tabulka č. 2: Kontroly

HPLC:

Kalibrace MTX se prováděla v dubletu na směsné sérum získané od zdravých jedinců. K směsnému séru se přidal zásobní standard MTX a TCA dle tabulek č. 3,4. Bylo připraveno 5 různých koncentrací pro hodnoty MTX $\leq 1 \mu\text{mol/l}$ a 4 různé koncentrace pro hodnoty

MTX > 1 $\mu\text{mol/l}$. Z připraveného zásobního standardu MTX o $c = 278,3 \mu\text{mol/l}$ se z důvodu zvýšení analytické přesnosti proměřily dvě kalibrační křivky. Jedna kalibrační křivka pro koncentrace MTX > 1 $\mu\text{mol/l}$ a druhá pro velmi nízké koncentrace. Terapeutické monitorování MTX je důležité u pacientů léčených vysokodávkovou terapií MTX. Hladiny MTX je nutné sledovat dokud koncentrace neklesne pod 0,05 $\mu\text{mol/l}$, proto je důležitá zvýšená citlivost měření i pro velmi nízké koncentrace. Mez detekce byla stanovena 0,015 $\mu\text{mol/l}$. Správnost a přesnost koncentrací odečtených z kalibračních křivek byly ověřeny pomocí kontrolních vzorků. Naměřené hodnoty ležely v rozmezích deklarovaných výrobcem. V tabulce č.5 jsou uvedeny průměrné hodnoty kontrol a variační koeficient. Variační koeficient pro hladinu 1 byl 8,9% a pro hladinu 2 byl 6,4%.

směsné sérum (μl)	zásobní std. MTX 100x ředěný (μl)	TCA (μl)	koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
100	60	5	1,012
100	30	5	0,618
100	10	5	0,242
100	5	5	0,127
200	5	5	0,066

Tabulka č. 3: Příprava kalibračních roztoků pro koncentrace MTX $\leq 1 \mu\text{mol/l}$

směsné sérum (μl)	zásobní std. MTX (μl)	TCA (μl)	koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
100	60	5	101,200
100	30	5	61,844
100	10	5	24,200
100	5	5	12,650

Tabulka č. 4: Příprava kalibračních roztoků pro koncentrace > 1 $\mu\text{mol/l}$

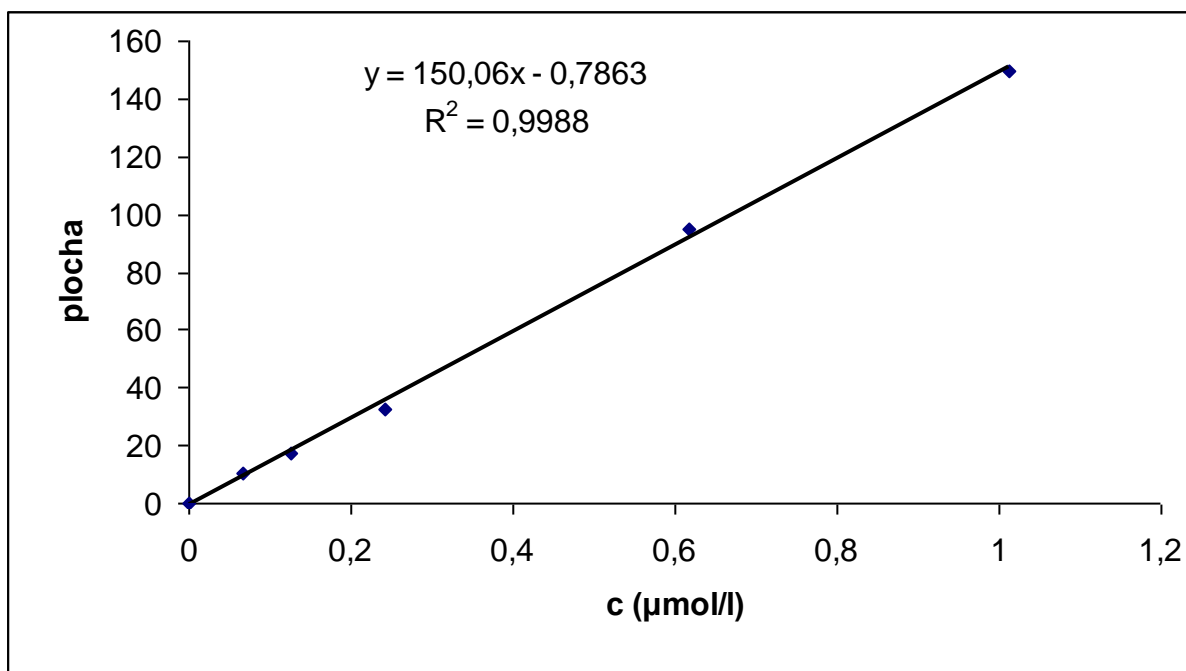
kontrola	průměrná hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	CV %
hladina 1	0,24	8,9
hladina 2	4,36	6,4

Tabulka č. 5: Kontroly (HPLC)

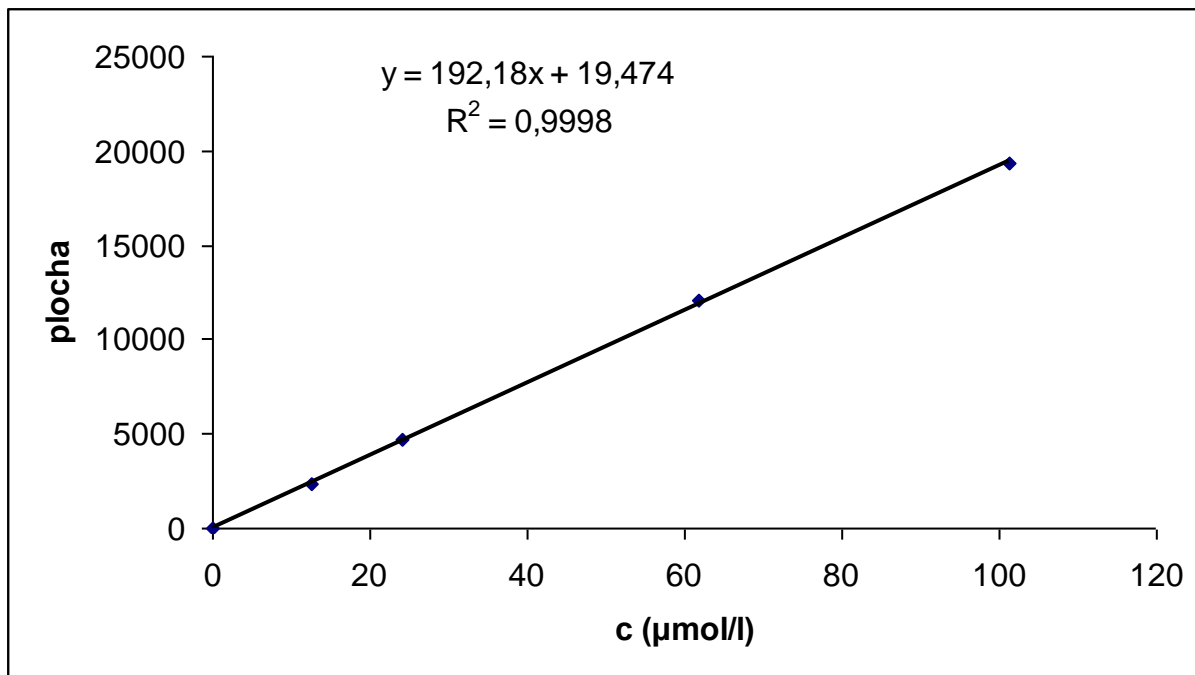
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Kalibrace methotrexátu při HPLC analýze

Kalibrační křivka udává závislost koncentrace MTX ku ploše píku MTX. Na obr. 7 je znázorněna kalibrační křivka pro koncentrace $\leq 1 \mu\text{mol/l}$ sestavené z 6 hodnot od nulové koncentrace do koncentrace $1,012 \mu\text{mol/l}$. Kalibrační křivka byla proměřena v dubletu a byly vyneseny průměrné hodnoty. Kalibrační křivka byla v celém rozsahu lineární. Pro výpočty koncentrací byla použita rovnice regrese $y = 150,06x - 0,7863$. Korelační koeficient pro nízké hodnoty MTX byl $0,9988$. Pro koncentrace MTX $> 1 \mu\text{mol/l}$ jsme sestavili kalibrační křivku z 5 hodnot od nulové koncentrace do koncentrace $101,2 \mu\text{mol/l}$. Všechny měřené výsledky se nacházely pod touto hodnotou. Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu. Hodnota korelačního koeficientu pro koncentrace MTX $> 1 \mu\text{mol/l}$ byla $0,9998$ a rovnicí regrese $y = 192,18x + 19,474$ (obr. 8). Kalibrace 7-OH MTX byla provedena stejným způsobem a byly získány podobné hodnoty korelačních koeficientů.



Obr. 7: Kalibrace MTX pro koncentrace $\leq 1 \mu\text{mol/l}$



Obr. 8: Kalibrace MTX pro koncentrace $> 1 \mu\text{mol/l}$

4.2. Výsledky naměřených hodnot methotrexátu

Stanovení MTX bylo provedeno u 60 vzorků sér pacientů léčených methotrexátem. Jednalo se o pacienty s diagnózou ALL, zhoubný novotvar dlouhých kostí dolních končetin, zhoubný novotvar kostí a kloubních chrupavek. Věkový průměr pacientů byl 13 ± 7 let. Přehled všech naměřených hodnot koncentrací MTX a jeho metabolitu 7-OH MTX je uveden v tabulkách 6, 7. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí statistického programu PrismGraph Pad 5.0. Vzorky byly dle HPLC měření rozděleny na hodnoty s koncentracemi $\text{MTX} \leq 1 \mu\text{mol/l}$ a $> 1 \mu\text{mol/l}$. Pro obě skupiny vzorků bylo vyneseno porovnání naměřených hodnot MTX pomocí HPLC proti hodnotám MTX naměřených FPIA metodou. Pomocí statistické analýzy bylo zjištěno, že se jedná o neparametrické rozložení dat na hladině pravděpodobnosti 95%. K vyhodnocení dat byl použit neparametrický párový t-test. Spearmanův koeficient pro hodnoty $\text{MTX} > 1 \mu\text{mol/l}$ byl 0,9190. Z obr. 9 je patrné, že obě metody spolu velice dobře korelují. Spearmanův koeficient pro hodnoty $\text{MTX} \leq 1 \mu\text{mol/l}$ byl 0,8557. Z tabulek 6 a 7 jsou zřejmé rozdílné koncentrace naměřené chromatograficky a FPIA metodou. Hodnoty uvedené v tabulce 7 se liší mezi jednotlivými metodami průměrně do 8%.

Pouze v některých případech jsou odchylky větší. Zatímco odchylky mezi HPLC a FPIA u hodnot $< 1 \mu\text{mol/l}$ jsou mnohem markantnější. Jak je uváděno v literatuře obě nejčastěji používané imunochemické metody FPIA a EMIT nadhodnocují koncentrace MTX v terminální fázi časového průběhu poklesu hladiny MTX u jednotlivých pacientů. U nízkých hodnot MTX dosahovala odchylka mezi měřeními někdy až 100% zejména u velice nízkých koncentrací. Autoři Fotoohi et al. popisují nadhodnocování MTX metodou FPIA o 2% po 42 h, 3% po 66 h po dokapání infuze ¹⁹. Fotoohi et al. popisuje i další imunochemickou metodu EMIT, která oproti FPIA metodě nadhodnocuje o 5% (42 h) a o 31% (66 h) po dokapání infuze. Avšak měření byla prováděna většinou pro hodnoty nad $1 \mu\text{mol/l}$ ¹⁹. Cosolo et al. uvádí, že hodnoty stanovení MTX pomocí Abbott fluorescenční polarizační imunoanalýzy nejsou ovlivňovány přítomností 7-OH MTX. Korelační koeficient byl 0,9833 ¹⁶. Zajímavé ale je, že diskrepance mezi těmito metodami vznikaly až u koncentrací $> 1 \mu\text{mol/l}$, což je v úplném rozporu s našimi výsledky. Stejně tak autoři Buice et al. zjistili interference 7-OH MTX menší než 4% u imunochemických metod EMIT, RIA ²⁹. Přesto se tito autoři domnívají, že uvedené metody jsou spolehlivé zejména během 24 h po infuzích, kdy koncentrace metabolitů jsou ještě nízké.

vzorek	FPIA	HPLC	HPLC
	MTX ($\mu\text{mol/l}$)	MTX ($\mu\text{mol/l}$)	7-OH MTX ($\mu\text{mol/l}$)
1	0,46	0,19	3,58
2	0,21	0,15	2,28
3	0,27	0,13	2,80
4	0,14	0,09	2,22
5	0,63	0,51	15,95
6	0,64	0,31	0,67
7	0,23	0,13	0,60
8	0,12	0,07	0,40
9	0,09	0,05	0,13
10	0,07	0,06	0,13
11	0,09	0,09	4,07
12	1,17	0,87	16,47
13	0,32	0,19	5,92
14	0,14	0,07	4,04
15	0,08	0,06	2,01
16	0,28	0,09	1,00

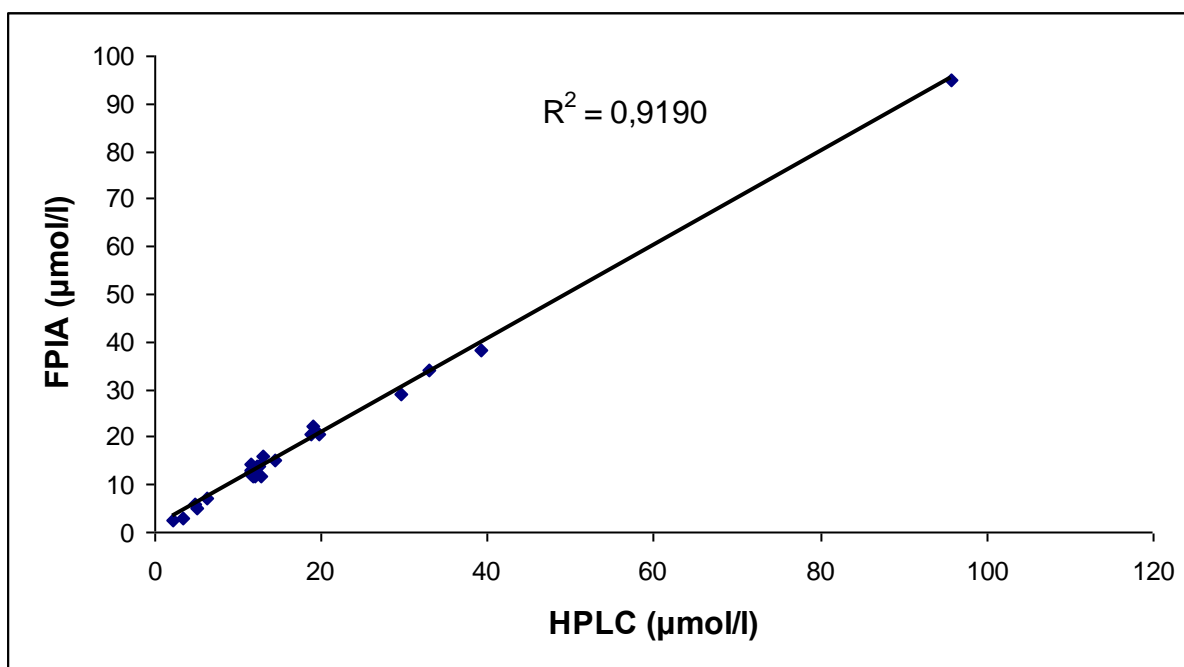
17	1,48	0,82	7,76
18	0,18	0,05	0,76
19	0,15	0,03	0,49
20	0,11	0,03	1,04
21	0,37	0,17	2,57
22	0,15	0,06	0,98
23	0,74	0,34	3,11
24	0,30	0,08	1,65
25	1,14	0,82	1,63
26	0,68	0,59	1,11
27	0,22	0,18	0,20
28	0,25	0,16	0,30
29	1,29	0,56	4,27
30	1,44	0,75	5,75
31	0,11	0,11	0,33
32	0,15	0,07	0,93
33	0,12	0,08	1,39
34	0,15	0,07	0,81
35	1,46	0,22	4,80
36	0,16	0,15	2,47
37	0,17	0,08	2,18

Tabulka č. 6: Soubor pacientů s nízkými koncentracemi MTX $\leq 1 \mu\text{mol/l}$

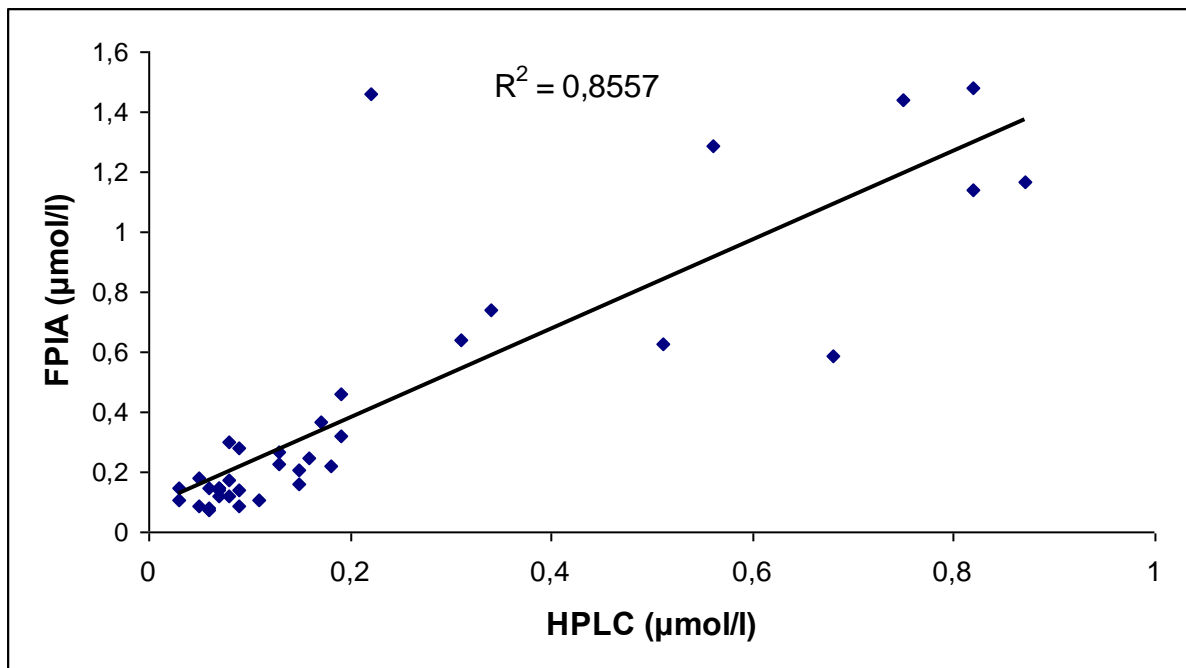
vzorek	FPIA	HPLC	HPLC
	MTX ($\mu\text{mol/l}$)	MTX ($\mu\text{mol/l}$)	7-OH MTX ($\mu\text{mol/l}$)
38	7,21	6,37	45,22
39	33,96	32,83	96,51
40	12,98	11,48	1,95
41	3,04	3,36	36,88
42	29,54	29,05	84,56
43	5,16	4,96	33,51
44	12,83	11,84	25,81
45	12,05	11,97	2,15
46	20,68	19,78	13,46
47	15,28	14,52	23,73
48	95,71	95,1	7,86
49	13,77	12,6	8,56

50	2,33	2,18	3,11
51	22,26	18,92	20,51
52	14,45	11,5	5,91
53	11,85	11,77	13,96
54	12,34	11,58	18,95
55	39,28	38,1	41,27
56	5,73	4,87	5,51
57	13,85	12,23	16,41
58	12,46	11,51	10,4
59	15,94	13,09	31,17
60	20,73	18,67	12,84

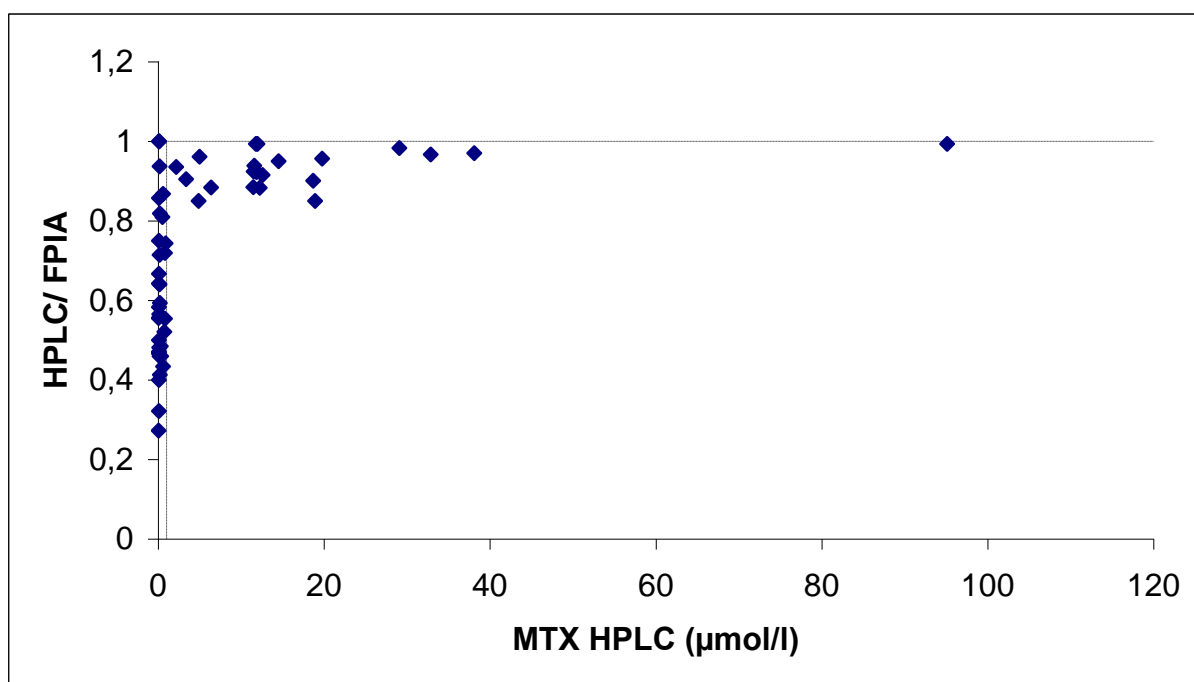
Tabulka č. 7: Soubor pacientů s koncentracemi MTX > 1 μmol/l



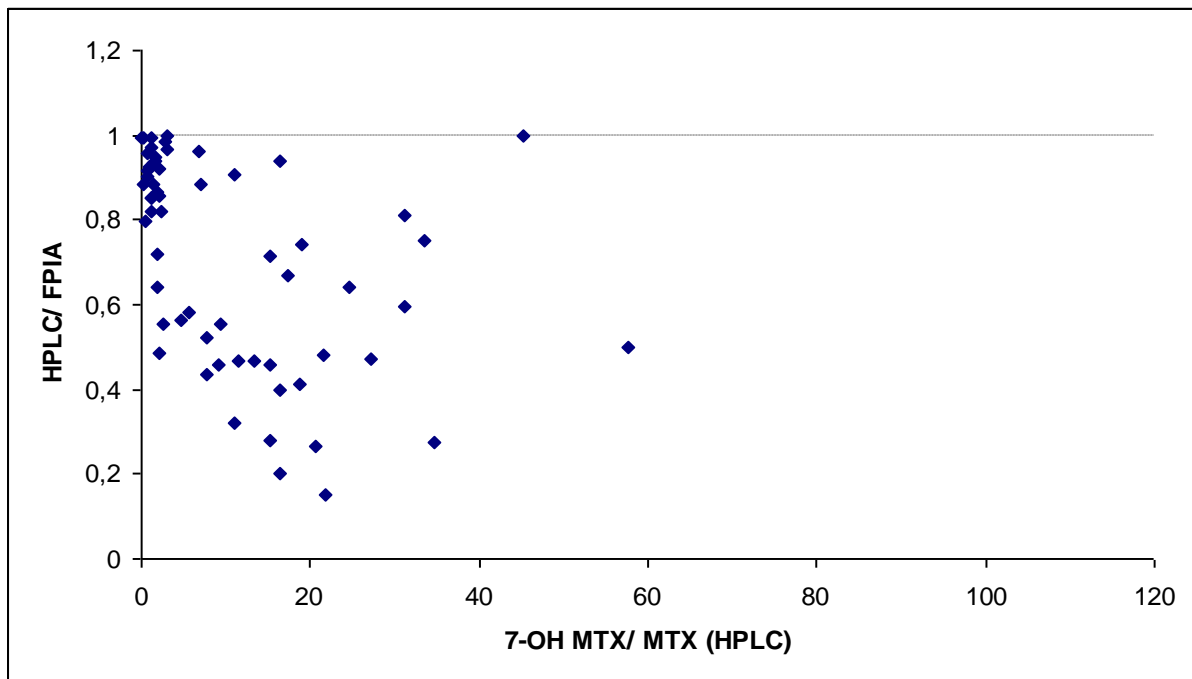
Obr. 9: Porovnání stanovení MTX metodou HPLC a FPIA s koncentracemi MTX > 1 μmol/l



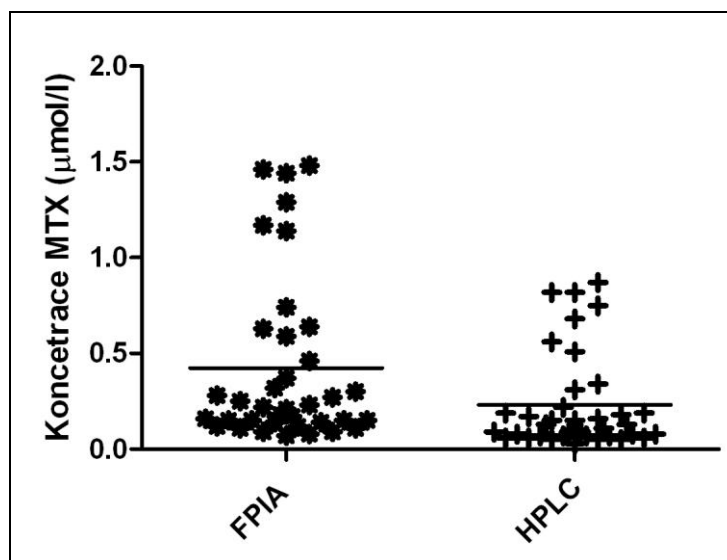
zajímavé, že v našich výsledcích jsou největší rozdíly naměřené v čase 48 h po zavedení infuze, zatímco Fotoohi et al. uvádí největší diskrepanci u hodnot po 66 h ¹⁹. Z obr. 12 je patrné, že nelze jednoznačně říci zda je hodnota MTX ovlivněna vysokou hodnotou 7-OH MTX. Protože např. i měření, kdy 7-OH MTX dosahuje přibližně 45 krát vyšší koncentrace než MTX se obě metody shodují v naměřených hodnotách. Zatímco u jiných měření, kdy hladina 7-OH MTX nepřesahuje tolikrát hladinu MTX se tyto dvě metody rozcházejí a rozdíl dosahuje i 100%. V těchto případech je velice obtížné vysvětlení těchto rozdílů, zda jsou způsobené přítomností metabolitu DAMPA či jinými interferencemi. Albertioni et al. uvádí mnohem významnější zkřížené reakce s 7-OH MTX u vzorků, kde byl poměr 7-OH MTX/MTX nižší (0,2; 10) než u vzorků s vyšším poměrem 7-OH MTX (30; 60). Vysvětlení však v publikaci není poskytnuto ¹⁷.



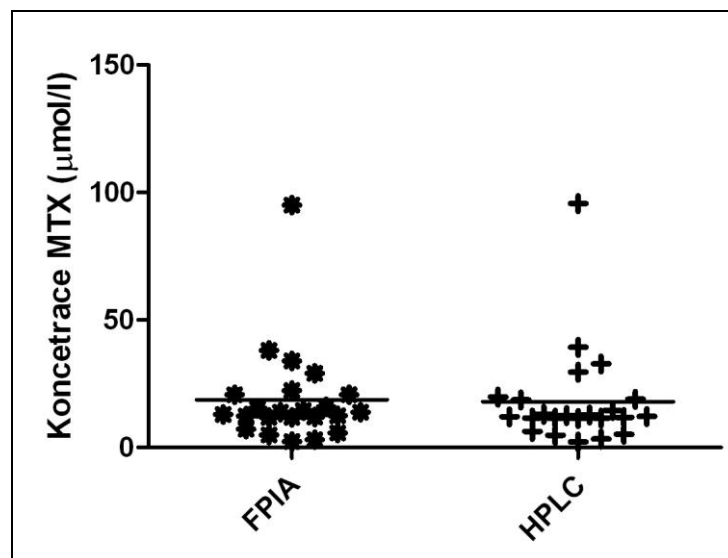
Obr. 11: Rozdílový graf-poměr koncentrace MTX (HPLC) ku poměru koncentrací HPLC/FPIA



Obr. 12: Vztah mezi poměrem koncentrací MTX měřených pomocí HPLC a FPIA a vlivem 7-OH MTX na analýzu MTX



Obr. 13: Bodový graf-porovnání koncentrace MTX při stanovení HPLC a FPIA pro koncentraci $MTX \leq 1 \mu\text{mol/l}$



Obr. 14: Bodový graf-porovnání koncentrace MTX při stanovení HPLC a FPIA pro koncentraci MTX > 1 µmol/l

Pomocí statistického programu PrismGraph Pad 5.0 jsme porovnáním metod FPIA a EMIT získali bodový graf pro koncentraci MTX $\leq 1 \mu\text{mol/l}$ a $> 1 \mu\text{mol/l}$ (obr. 13, 14). Rozdíl mezi FPIA a HPLC metodami byl významný na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ pro oba koncentrační intervaly. Hladina pravděpodobnosti pro MTX $\leq 1 \mu\text{mol/l}$ byla $p < 0,0001$ (Wilcoxonův neparametrický párový t-test). Pro koncentrace $> 1 \mu\text{mol/l}$ byla $p < 0,0132$. Z výsledku porovnání je patrné, že rozdíl mezi těmito metodami byl významný především pro koncentrace MTX $\leq 1 \mu\text{mol/l}$.

5. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsme porovnávali dvě nejrozšířenější metody stanovení MTX, automatizovanou imunochemickou metodu FPIA a HPLC. Nevýhodou imunochemických stanovení je zkřížená reakce s metabolity. Zkřížená reakce může ovlivňovat účinnou terapii a může vést k relapsu, který je zapříčiněn podáním vysoké dávky leucovorinu. Vyšší dávky leucovorinu během vysokodávkové terapie MTX zvyšují riziko relapsu u dětí léčených s ALL. HPLC je brána jako referenční metoda pro stanovení MTX, neboť dokáže snadno rozlišit MTX a jeho metabolity s vysokou přesností. Ve srovnání s imunochemickými metodami patří mezi velice levné stanovení. Z naměřených hodnot vyplývá, že pro koncentrace MTX $> 1 \mu\text{mol/l}$ spolu obě metody dobře korelují, Spearmanův korelační koeficient byl 0,9190. Zatímco pro hodnoty $\leq 1 \mu\text{mol/l}$ byl Spearmanův koeficient pouze 0,8557. Mezi oběma metodami existují však významné rozdíly. Z těchto výsledků je zřejmé, že na imunochemické stanovení mají vliv jak 7-OH MTX, tak i pravděpodobně metabolit DAMPA a to zejména v terminální fázi časového průběhu poklesu MTX. Zkřížené reakce u imunochemických metod jsou způsobeny pravděpodobně velice podobnou chemickou strukturou těchto metabolitů a MTX. Ačkoliv jsou automatizované imunochemické metody rychlé a jednoduché, pro terapeutické monitorování MTX by bylo správnější využívat metodu HPLC.

6. LITERATURA

1. Mayer J., Starý J.: Leukémie, Grada, 2002
2. Koutecký J., Kabíčková E., Starý J.: Dětská onkologie pro praxi, Triton, 2002
3. Vorlíček J., a kol.: Klinická onkologie II.díl - Speciální část, Masarykova univerzita Brno, 1995
4. Eckschlagler T., Průša R.: Laboratorní vyšetření v onkologii, Triton, 2002
5. Starý J.: Padesát let úspěšné léčby dětské akutní lymfoblastické leukémie, Čs.-slov. Pediat., 62 (9), 540 - 545, 2007
6. Martínková J., Šišpera L., Čelakovská J., Hak J., Slavík Z., Chládek J., Chládková J., Pařízková E.: Recentní pohled na využití methotrexátu (MTX) v léčbě akutní lymfoblastické leukémie dětského věku, Čs.-slov. Pediat., 48 (12), 721 - 728, 1993
7. Katzung B.G.: Základní a klinická farmakologie, H & H Jinočany, 1994
8. Martínková J.: Cytostatika, LF UK v Hradci Králové, 2000
9. Rubino F. M.: Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites, Journal of Chromatography B, 764, 217 - 254, 2001
10. Lincová L., Farghali H, et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galen, 2007
11. Klouda P.: Moderní analytické metody, Ostrava, 2003
12. Bilyk I., Nemeč R.: Vybrané laboratorní metody, Avicenum, 1988
13. Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1995
14. Chromný V., Fischer J., Havel J., Votava M.: Bioanalytika, Masarykova univerzita Brno, 2002
15. <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
16. Cosolo W., Drummer O. H., Christophidis N.: Comparison of high-performance liquid chromatography and the abbot fluorescent polarization radioimmunoassay in the measurement of methotrexate, Journal of Chromatography B, 494, 201-208, 1989
17. Albertioni F., Rask Ch., Eksborg S., Poulsen J. H., Pettersson B., Beck O., Schroeder H., Peterson C.: Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma, Clinical Chemistry, 42 (1), 39-44, 1996

18. Aboleneen H., Simpson J., Backes D.: Determination of methotrexate in serum by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 681, 317-322, 1996
19. Fotoohi K., Skärby T., Söderhäll S., Peterson C., Albertioni F.: Interference of 7-hydroxymethotrexate with the determination of methotrexate in plasma samples from children with acute lymphoblastic leukemia employing routine clinical assays, *Journal of Chromatography*, 817, 139-144, 2005
20. Eksborg S., Albertioni F., Rask C., O.Beck, Palm C., Schroeder H., Peterson C.: Methotrexate plasma pharmacokinetics importance of assay method, *Cancer Letters*, 108, 163-169, 1996
21. Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.: *Bioanalytika léků*, Avicenum, 1990
22. Čermáková M., a kol.: *Klinická biochemie 2.díl*, NCO NZO Brno, 2005
23. Burtis A. C, Ashwood E. R.: *Tietz textbook of clinical chemistry*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, Third Edition, 1999
24. Zima T.: *Laboratorní diagnostika*, Galen, 2007
25. <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>
26. Dastych M.: *Instrumentální technika obor zdravotní laborant*, Masarykova univerzita, 2007
27. <http://www.pharm.uky.edu/HomeTest/Elisa/elisa.html>
28. Slørdal L., Prytz P. S., Pettersen I., Aarbakke J.: Methotrexate measurements in plasma: Comparison of enzyme multiplied immunoassay technique, TDx fluorescence polarization immunoassay, and high pressure liquid chromatography, *Therapeutic Drug Monitoring*, 8 (3), 365-372, 1986
29. Buice R. G., Evans W.E., Karas J., Nicholas C. A., Sidhu P., Straughn A. B., Meyer M. C., Crom W.R.: Evaluation of enzyme immunoassay, radioassay, and radioimmunoassay of methotrexate, as compared with liquid chromatography, *Clinical Chemistry*, 26, 1902-1904, 1980
30. Donehower R.C.: Metabolit conversion of methotrexate in man, *Recent Results Cancer Res.*, 74, 37-41, 1980

7. SEZNAM ZKRATEK

Ab	protilátka
Ag	antigen
AgAb	komplex antigen-protilátka
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloblastická leukémie
CSW	Chromatography Station for Windows
DAD	detektor s diodovým polem
DAMPA	2,4-diamino-N ¹⁰ -methylpteroová kyselina
DHFR	tetrahydrofolátreduktáza
Gy	gray
7-OH MTX	7-hydroxymethotrexát
EIA	enzymoimunoanalýza
ELISA	heterogenní enzymoimunoanalýza
EMIT	homogenní enzymoimunoanalýza
FAB	French-American-British klasifikace
FPIA	fluorescenční polarizační imunoanalýza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MTX	methotrexát
RIA	radioimunoanalýza
RP	reverzní fáze
rpm	otáčky/min
STD	standard
TCA	kyselina trichloroctová