

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra analytické chemie



**VÝVOJ A VALIDACE NOVÝCH HPLC METOD
PRO STANOVENÍ SPECIFICKÝCH ANALYTŮ
V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU**

Disertační práce

Hradec Králové 2009

Mgr. Lubor Urbánek

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. a RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D., školiteli specialistovi, za jejich odborné vedení a péči po celou dobu mého postgraduálního studia. Děkuji za všechny cenné rady, připomínky a zkušenosti, které mi pomáhaly při vypracovávání mé doktorské práce, ale také za veškerou možnou podporu, kterou jsem měl při prezentaci výsledků na domácích i zahraničních konferencích a při absolvování zahraniční stáže. Všechny nabyté zkušenosti velmi přispěly nejen k rozšíření mých odborných znalostí, ale také obohatily můj osobní život.

Dále bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi, Ph.D. za to, že mi umožnil podílet se na jeho klinickém výzkumu v oboru onkologie a za pomoc při psaní odborných publikací. Děkuji za jeho laskavý přístup, ochotu a za veškerou podporu, kterou mi poskytl pro mou práci.

Velké poděkování patří rovněž prof. MUDr. Luboši Sobotkovi, CSc., prof. MUDr. Zdeňku Zadákovi, CSc., RNDr. Petru Žďánskému, CSc. a celému kolektivu Výzkumné laboratoře gerontologické a metabolické kliniky za to, že mi umožnili pracovat v jejich laboratoři a za jejich milý přístup a pomoc při řešení nejen vědeckých problémů.

Stejně tak děkuji všem z Katedry analytické chemie, za jejich přátelský přístup a vytvoření skvělého kolektivu, který měl sportovního ducha a vždy našel pochopení pro školní i mimoškolní aktivity.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své přítelkyni Mgr. Ivance Citové, Ph.D. za to, že jsem mohl celé své doktorské studium sdílet společně s ní, a za to, že byla mou „pupeční šňůrou“, která mě spojovala s děním na katedře i celé farmaceutické fakultě.

OBSAH

OBSAH	3
SEZNAM ZKRATEK	5
1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	11
3.2. Instrumentace v HPLC	13
3.3. Typy stacionárních fází	15
3.3.1. Částicové stacionární fáze	15
3.3.2. Monolitické stacionární fáze	18
3.4. Nové trendy v HPLC	24
3.5. Sběr a úprava biologického materiálu před analýzou	27
3.5.1. Vliv preanalytické fáze na laboratorní vyšetření	27
3.5.2. Extrakční metody LLE a SPE.....	31
3.6. Sledované látky	38
3.6.1. Vitamin A.....	38
3.6.2. Vitamin E.....	41
3.6.3. Význam stanovení vitaminů A a E v biologickém materiálu.....	44
3.6.4. Neopterin.....	47
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	51
4.1. Přehled prací s analytickou tematikou	51
4.2. Aplikace vyvinutých analytických metod v klinické praxi.....	62
5. Přehled všech publikovaných prací	66
6. Přehled vybraných plakátových sdělení a přednášek	69
7. PŘÍLOHY	71
7.1. Příloha 1	71
7.2. Příloha 2	78
7.3. Příloha 3	88
7.4. Příloha 4	94
7.5. Příloha 5	104
7.6. Příloha 6	110

7.7. Příloha 7	118
7.8. Příloha 8	125
7.9. Příloha 9	131
7.10. Příloha 10	139
7.11. Příloha 11	148
7.12. Příloha 12	153
7.13. Příloha 13	155
7.14. Příloha 14	157
7.15. Příloha 15	159
7.16. Příloha 16	161
8. Seznam vědecké aktivity autora (2004 - 2008)	163
9. SHRnutí	172
10. SUMMARY	174
11. ZÁVĚR.....	176
12. LITERATURA	177

SEZNAM ZKRATEK

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization/ chemická ionizace za atmosferického tlaku
APL	Akutní promyelocytární leukémie
ATRA	All-Trans Retinoic Acid
BEH	Bridged Ethylsiloxane/silica Hybrid
DAD	Diode-Array Detector/ detektor diodového pole
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EOC	Epithelial Ovarian Carcinoma
ESI	Electrospray Ionization
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GC	Gas Chromatography/ plynová chromatografie
GMK	Gerontologická a metabolická klinika
GPC	Gel Permeation Chromatography/ gelová permeační chromatografie
GTP	Guanosine Triphosphate
HDL	High-Density Lipoprotein
HETP	Height Equivalent to a Theoretical Plate/ výškový ekvivalent teoretického patra
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/ vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IEC	Ion Exchange Chromatography/ iontovýměnná chromatografie
IgG	Imunoglobulin G
ISO	International Organization for Standardization
IU	International Unit/ mezinárodní jednotka
LOD	Limit of Detection/ limit detekce

LOQ	Limit of Quantitation/ limit kvantifikace
LC	Liquid Chromatography/ kapalinová chromatografie
LDL	Low-Density Lipoprotein
LLC	Liquid Liquid Chromatography
LLE	Liquid Liquid Extraction
LSC	Liquid Solid Chromatography
MMLLE	Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction
MS	Mass Spectrometry/ hmotnostní spektrometrie
PDA	PhotoDiode Array/ detektor diodového pole
PEEK	Poly-Ether-Ether-Keton
PTFE	Polytetrafluorethylene
PVC	Polyvinylchlorid
RBP	Retinol Binding Protein
RIA	Radioimmunoassay/ radioimunoanalýza
ROMP	Ring-Opening Metathesis Polymerization
ROS	Reactive Oxygen Species/ reaktivní kyslíková částice
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
RRLC	Rapid Resolution Liquid Chromatography
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SDE	Single Drop Extraction
SDME	Single Drop MicroExtraction
SLE	Supported Liquid Extraction
SLP	Správná laboratorní praxe
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
SVP	Správná výrobní praxe
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
UFLC	Ultra Fast Liquid Chromatography
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography/ ultraúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultra violet/ ultrafialové záření
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein

1. ÚVOD

V současnosti je nedílnou součástí již téměř každé návštěvy lékaře laboratorní vyšetření, které slouží k bližšímu a přesnějšímu poznání zdravotního stavu pacienta a k určení správné diagnózy. Vzhledem ke stále větší vytíženosti biochemických laboratoří a vysokým nákladům na jejich provoz je důležitá nejen časová, ale i finanční nenáročnost nových analytických metod používaných v klinickém výzkumu i praxi.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z dominantních separačních technik rutinně využívaných ve všech typech analytických laboratoří. Hlavními výhodami HPLC je její schopnost separace, identifikace a kvantifikace látek různé struktury v širokém koncentračním rozmezí během jedné analýzy s vysokou citlivostí a možností automatizace.

V posledním desetiletí došlo v oblasti kapalinové chromatografie k velkému rozvoji. Např. firmy Waters, Agilent Technologies a Shimadzu uvedly na trh nové „ultra účinné“ chromatografy (UPLC, RRLC, UFLC), které zlepšují separační účinnost a zkracují celkovou dobu analýzy. Tyto přístroje jsou však dražší než běžné kapalinové chromatografy. Alternativním řešením by mohlo být použití nových typů stacionárních fází - např. monolitní stacionární fáze, polymerní či hybridní sorbenty a kolony obsahující zirkoniové částice vhodné zejména pro analýzy při extrémních hodnotách pH a vysoké teploty. Mezi další novinky v HPLC separaci patří stacionární fáze s nejdelšími chemicky vázanými alkyly C30, které jsou vysoce selektivní pro cis- a trans-isomery karotenoidů a tokoferolů. Čím dál častější je rovněž použití HILIC chromatografie, která je jakousi alternativou k RP-HPLC a je vhodná především pro stanovení malých polárních molekul. Použití analytických kolon s těmito sorbenty je ve srovnání s výše uvedenými přístroji mnohonásobně levnější, neboť nevyžaduje žádnou speciální instrumentaci.

Další vývoj proběhl také v oblasti preanalytické fáze, která je z hlediska možného ovlivnění celkového výsledku analýzy nejdůležitější částí celého procesu. Běžně používaná extrakce do kapaliny (LLE) je nahrazována např. extrakcí na pevnou fázi (SPE), extrakcí na kapku (SDE), mikroextrakcí na pevnou fázi (SPME) a také tyto metody využívají nové typy sorbentů.

Díky těmto moderním technologiím a možnosti automatizace pak různým spojením výše zmíněných metod vznikají tzv. on-line analýzy, které umožňují přímý

nástřik biologické matrice a nejvíce tak přispívají k celkové časové a finanční úspoře, ale i k ochraně životního prostředí.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla inovace současných bioanalytických metod používaných ve Výzkumné laboratoři Gerontologické a metabolické kliniky ve Fakultní nemocnici Hradec Králové a dále vývoj a validace nových metod pro potřeby klinického výzkumu s využitím nových typů analytických kolon a moderní instrumentace. Toto pracoviště spolupracuje s lékaři v různých oborech jako je onkologie, gerontologie a nefrologie. Předmětem společného zájmu jsou biologicky aktivní látky, jejichž stanovení přispívá nejen k novým vědeckým poznatkům, ale i k diagnostice a monitorování řady onemocnění a také ke zlepšení péče o pacienty.

Konkrétně byla tato práce zaměřena na vývoj nové metodiky zejména pro stanovení liposolubilních vitaminů (retinol, alfa-tokoferol) a jejich některých metabolitů (estery retinolu) v lidském séru s využitím monolitní kolony. Monitorování koncentračních hladin těchto látek je důležité zejména pro sledování nutričního stavu organismu a rovněž zjištění oxidačního stresu, který je zvláště nebezpečný pro skupinu lidí s oslabeným imunitním systémem jako jsou např. staří lidé a pacienti s rakovinou léčení radio- či chemoterapií.

S obranyschopností lidského organismu je úzce spjata též další chemická látka – neopterin. Jedná se o nekonjugovaný derivát pteridinu, který je produkován v signifikantním množství lidskými monocyty-makrofágy po stimulaci interferonem gama. Představuje tak užitečný a důležitý parametr monitorování aktivace imunitního systému, která doprovází řadu onemocnění.

Stanovení neopterinu v moči nepatří mezi běžné biochemické vyšetření, a proto bylo nutné zavést novou metodu opět využívající moderní technologie (speciální autosampler na mikrotitrační destičky – rack changer, polymerní či hybridní analytické kolony a přepínací ventil pro on-line chromatografii).

Posledním a neméně důležitým úkolem bylo vyvinutí metodiky pro extrakci vitaminů A a E s využitím solid phase extrakce (SPE), která měla nahradit doposud užívanou extrakci do kapaliny (LLE).

Vzhledem k významu monitorování všech těchto látek je vývoj a validace rychlých a účinných analytických metod potřebných k jejich stanovení velmi důležitá nejen pro klinický výzkum, ale i pro klinickou praxi. Obzvláště zde je potom časová i finanční nenáročnost analýz jedním z nejdůležitějších faktorů, které rozhodují o

využitelnosti nových metod pro rutinní stanovení v nemocničních biochemických laboratořích.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie ¹

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) patří mezi vysoce všestranné a nejvíce rozšířené chromatografické metody. Tato separační technika je používána ke stanovování různých organických, anorganických a biologických materiálů, a proto se s ní můžeme setkat téměř v různých typech laboratoří. Podstatou chromatografického procesu je rozdělování složek směsi látek mezi dvě fáze (pevná látka-kapalina, kapalina-kapalina). Vysoké účinnosti je dosaženo použitím stacionárních fází, které homogenně vyplňují kolonu a obsahují buď malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti nebo jednoduté, kompaktní útvary (monolitní disky, tyčinky) s přesně definovanými rozměry makropórů a mesopórů. Pohyblivou mobilní fází je kapalina tvořená jedním nebo více druhy rozpouštědel s odpovídající polaritou.

K vlastnímu rozdělení stanovovaných látek (analytů) pak dochází na základě různých principů, které se vzájemně prolínají. Podle převažujícího mechanismu dělení látek pak můžeme hovořit o různých typech chromatografie:

- **Adsorpční chromatografie** – je založena na různé schopnosti látek v roztoku adsorbovat se na povrch pevné fáze – adsorbentu. Ten je obsazen monovrstvou molekul mobilní fáze a molekuly analytu s nimi soutěží o aktivní místa na jeho povrchu. Je-li stacionární fází polární adsorbent, pak jsou na něm silněji zadržovány látky polární a potom hovoříme o *chromatografii na normálních fázích*. Jako mobilní fáze se v tomto případě používají nepolární rozpouštědla (hexan, heptan), která ještě více podporují adsorpci polárních analytů. V případě *chromatografie na reverzních fázích* je tomu obráceně. Jedná se tedy o chromatografický systém pevná látka-kapalina (LSC), který je vhodný pro analýzu relativně nepolárních organických sloučenin, zejména pak pro separaci látek lišících se funkčními skupinami nebo izomerních látek.
- **Rozdělovací chromatografie** – probíhá v systému dvou nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalných fází (LLC), přičemž k vlastnímu dělení látek

¹ Kapitola 3.1 byla vypracována z odkazů [1-4]

dochází na základě jejich různých rozdělovacích koeficientů. Kapalina, která tvoří stacionární fázi, je pevně ukotvena na inertním nosiči, který nesmí ovlivňovat rozdělovací rovnováhu, tzn., že nesmí mít adsorpční vlastnosti. Takový nosič však není ve skutečnosti znám, a proto se musí počítat s konkurenčním vlivem adsorpce. Příkladem využití může být papírová chromatografie.

- **Iontově výměnná chromatografie** – je chromatografie v systému pevná látka-kapalina, jejíž pevnou fází je iontoměnič. Podstatou iontové výměny jsou elektrostatické interakce. Sorbent zachycuje určitý typ iontů a místo něho uvolňuje do roztoku jiný ion. Důležitou úlohu má velikost a náboj iontu, jeho koncentrace a disociační konstanta ionogenních skupin měniče i analytu. Stacionární fází je iontovýměnný povrch sorbentu, který má opačný náboj než ionty analytu. Jako mobilní fáze se používají vodné tlumivé roztoky (pufrů), jejichž ionty jsou v dynamické rovnováze s ionty měniče. Čím vyšší je koncentrace iontů pufru, tím více jsou tyto ionty zadržovány stacionární fází a tím je rychlejší eluce analytů z kolony.

Iontově výměnná chromatografie (IEC) se používá pro stanovení látek iontové povahy např. aminokyselin.

- **Vylučovací chromatografie** – je vlastně typem rozdělovací chromatografie, kde stacionární fází je kapalina zakotvená v gelu (inertní polymerní nosič). K dělení molekul dochází podle jejich velikosti. Větší molekuly, které nemohou procházet pórovitou strukturou stacionární fáze se eluují jako první, zatímco malé molekuly procházejí přes póry a vymývají se tedy s delším elučním časem.

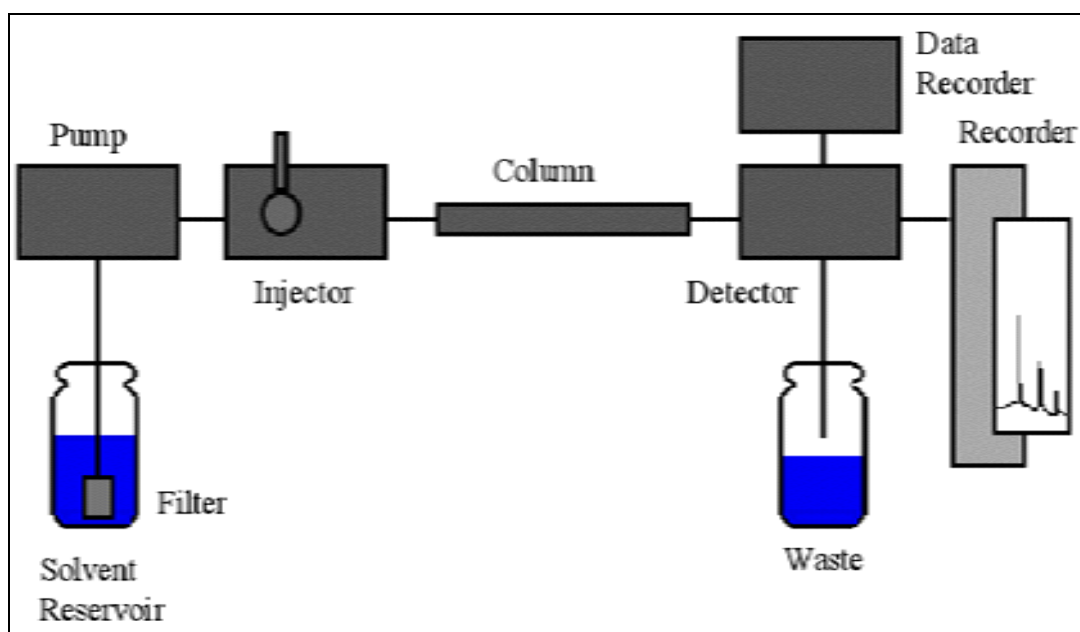
Tato metoda se také často označuje jako gelová permeační chromatografie (GPC) a našla uplatnění zejména v polymerní chemii a biochemii pro separaci látek s vyšší molekulovou hmotností.

- **Afinitní chromatografie** - je založena na silných biospecifických interakcích analytů s komplementárními látkami (ligandy). Na stacionární fází s daným ligandem se zachytávají pouze ty látky, které s ním dokáží vytvořit komplementární vazbu. Navázané analyty se potom uvolní změnou chromatografických podmínek (např. změna pH, koncentrace solí, teploty, atd.). Afinitní chromatografie našla uplatnění zejména v biomedicině a v biotechnologii.

3.2. Instrumentace v HPLC ²

Vznik vysokoúčinné kapalinové chromatografie je úzce spjatý s rozvojem instrumentální a výpočetní techniky v 60. a 70. letech 20. století. Na rozdíl od klasické kapalinové chromatografie, kde mobilní fáze protéká stacionární fází samospádem, u HPLC je potřeba vyvinout vysoký tlak pro překonání zpětného odporu, který je dán malým průměrem kapilár a ještě menší velikostí částic stacionární fáze. Z toho tedy vyplývá, že technické požadavky na HPLC jsou poněkud náročnější a dražší. Základní části kapalinového chromatografu jsou uvedeny na schematickém obrázku (obr. 1).

Obr. 1 Blokové schéma kapalinového chromatografu



Zdroj: Exner M.: Moderní trend kapalinové chromatografie UPLC (přednáška firmy Waters)

- **Zásobník mobilní fáze** – jedná se většinou o uzavřenou nádobu, ze které je mobilní fáze čerpána do systému přes speciální filtr. Mobilní fáze by měla být odplyněná a zbavena mechanických nečistot (používají se speciální rozpouštědla pro HPLC). K odplynění mobilní fáze se nejčastěji používá podtlak (degasser) či probublávání heliem.
- **Vysokotlaké čerpadlo (pumpa)** – musí zajišťovat bezpulsní, konstantní a reprodukovatelný průtok mobilní fáze, který se pohybuje nejčastěji v rozmezí od 0,1 do 10 ml/min. Dnešní požadavky jsou velmi náročné, a proto dokonale řízené

² Kapitola 3.2 byla vypracována z odkazů [1,3,5]

vysokotlaké čerpadlo patří k nejcennějším a výrobně nejnáročnějším součástem chromatografu.

- **Dávkovací zařízení** – dávkování vzorku lze provést buď speciální injekční mikrostříkačkou, nebo se k němu většinou využívá dávkovací ventil se smyčkou. Dávkování musí být opakovatelné a jeho výhodou je poměrně snadná automatizace. Pak hovoříme o automatickém dávkovači – autosampleru.
- **Chromatografická kolona** – jedna z nejdůležitějších částí chromatografického systému, kde dochází k vlastnímu rozdělení směsi látek. Kolony se vyrábějí z různých materiálů (nerezová ocel, plast, sklo), jsou různě dlouhé (1-30 cm), s různými vnitřními průměry (2-8 mm) a jsou plněny různými typy sorbentů. U moderních kapalinových chromatografů je kolona umístěna v kolonovém termostatu, který zajišťuje stálé prostředí pro analýzu, a zlepšuje tak opakovatelnost stanovení.
- **Detektor** – měl by mít malý objem detekční cely (kvůli rozmývání elučních křivek). Signál detektoru by měl být stabilní, reprodukovatelný, s širokým lineárním dynamickým rozsahem a s vysokou citlivostí. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich obecných nebo specifických vlastností, které jsou v určitém vztahu k jejich koncentraci. Podle toho pak rozlišujeme detektory *univerzální* (např. refraktometrický nebo konduktometrický detektor) a *selektivní* (např. fluorimetrický, ampérometrický či fotometrický detektor).
Výsledná data z detektoru jsou poté sbírána a vyhodnocována počítačem nebo jiným vyhodnocovacím zařízením (zapisovač, integrátor).

3.3. Typy stacionárních fází

Srdcem chromatografického systému je analytická kolona. Právě zde dochází k vlastnímu rozdělení směsi látek na základě různých separačních principů a mechanismů, které jsou však závislé na vlastnostech analytu a sorbentu. Výběr vhodné stacionární fáze je základním předpokladem pro úspěšnou HPLC analýzu. Ideální kolona by měla mít vysokou separační účinnost, měla by umožňovat práci v širokém rozmezí pH a zároveň by měla odolat vysokým teplotám i působení organických rozpouštědel. V současné době existuje široká nabídka komerčně dostupných chromatografických kolon, které využívají různých materiálů či jejich kombinaci, pro získání takovéto univerzální analytické kolony. Tato práce přináší krátký a stručný přehled některých z těchto nových typů stacionárních fází.

Z hlediska typu náplně bychom analytické kolony mohli rozdělit na kolony částicové a monolitní. Přičemž v obou případech se pro jejich výrobu používají jednak anorganické materiály (zejména oxid křemičitý), ale i materiály organické.

3.3.1. Částicové stacionární fáze³

Největší vliv na separační účinnost náplňových kolon má velikost a uspořádání částic. Běžně se používají částice velikosti 3-10 μm , ale dostupné jsou již kolony s velikostí částic 2 μm i menší. Se zmenšováním velikosti částic a vnitřních průměrů kolon však roste i vnitřní odpor kolony, který pak vyžaduje speciální úpravu chromatografického systému (viz. Kapitola 3.4 Nové trendy v HPLC). Dále o účinnosti kolony rozhoduje také porozita částic, pravidelný tvar (kulový) a jejich jednotná velikost.

Z hlediska materiálů používaných pro přípravu jakéhokoliv sorbentu je určitě nejpoužívanější oxid křemičitý (silikagel, silika). Jeho použití přináší mnoho výhod (vysoká účinnost dělení, mechanická odolnost, reprodukovatelnost výsledků), ale i mnoho nevýhod (omezený rozsah pH, chemická aktivita, teplotní nestabilita). Cílem výrobců analytických kolon je odstranění těchto negativních vlastností silikagelu při zachování vlastností pozitivních.

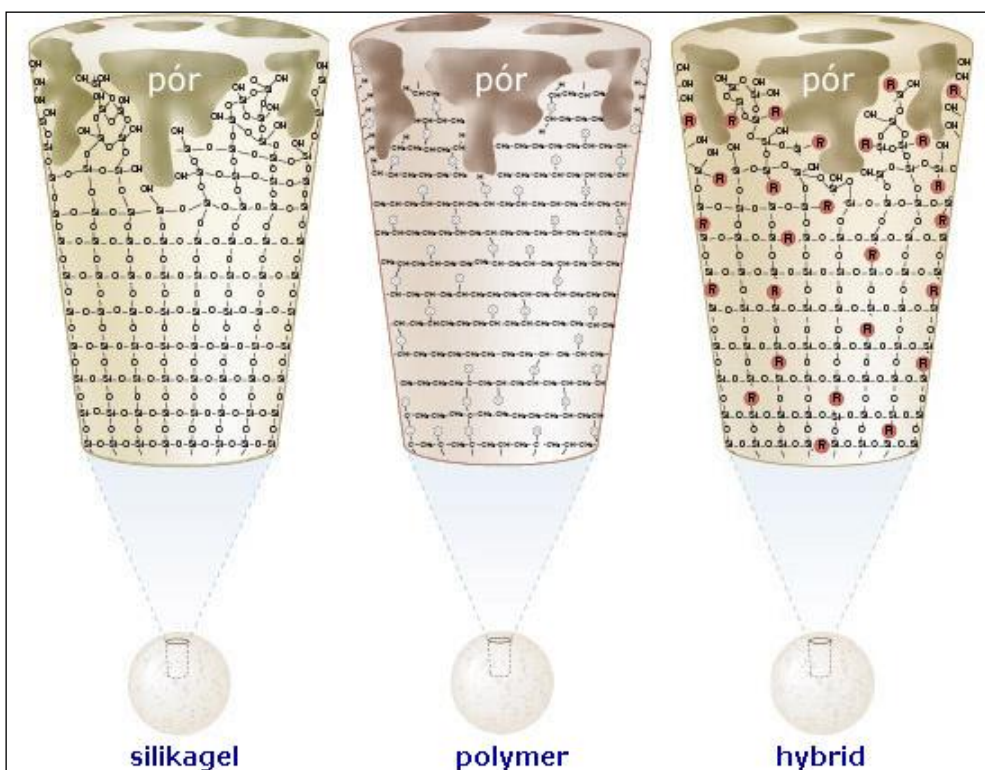
Jednou z možností, jak toho dosáhnout, je použití jiných anorganických oxidů (např. oxid hlinitý, oxid titaničitý a oxid zirkoničitý). Ty vykazují dobrou separační

³ Kapitola 3.3.1 byla kromě uvedených odkazů vypracována ze zdrojů [2,3,5,6]

účinnost jako silikagel, ale jsou stabilnější v širším rozmezí teplot a pH. Největší uplatnění v HPLC našly především zirkoniové sorbenty, které jsou též vysoce chemicky odolné. Extrémní stabilita oxidu zirkoničitého má za následek to, že HPLC kolony mohou být použity za extrémních podmínek, čímž se prodlužuje životnost kolony. Tím se také snižuje cena analýzy a rozšiřují se možnosti při optimalizaci chromatografických podmínek. Nevýhodou zirkoniových sorbentů je přítomnost adsorpčních center s charakterem Lewisových kyselin. Tento fakt vede k tomu, že se do mobilních fází musí přidávat pufr, které kompenzují silné interakce těchto center s hydroxylovými, fosfátovými či karboxylovými skupinami v molekulách látek. Výrobci těchto kolon jsou např. firma ZirChrom a Sigma Aldrich (kolona Discovery Zr).[7-9]

Dalším materiálem, který měl původně silikagel nahradit, jsou různé organické polymery (methakrylát, akrylamid, styrendivinylbenzen, atd.). Ty jsou většinou chemicky odolné a stabilní v celém rozsahu pH. Nevýhodou polymerních fází je však jejich menší mechanická odolnost, nízká separační účinnost a horší reprodukovatelnost výsledků.

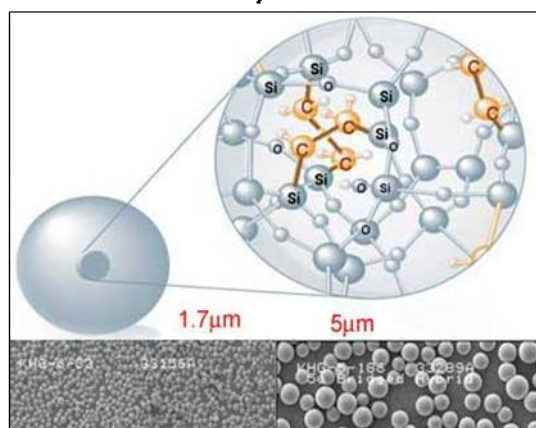
Obr. 2 Struktura silikagelové, polymerní a hybridní částice



Zdroj: www.chromservis.eu, červen 2008

Kompromisním řešením je vytvoření hybridní částice obsahující v celém svém objemu rovnoměrně rozložené, částečně alkylované křemíkové atomy. Tím dochází ke zlepšení stability částic při zachování dobré účinnosti dělení. Toho využívá např. firma Waters u svých kolon XTerra a XBridge, kde vysoká odolnost hybridního materiálu umožňuje rovněž použití těchto kolon při vysokých tlacích v UPLC.

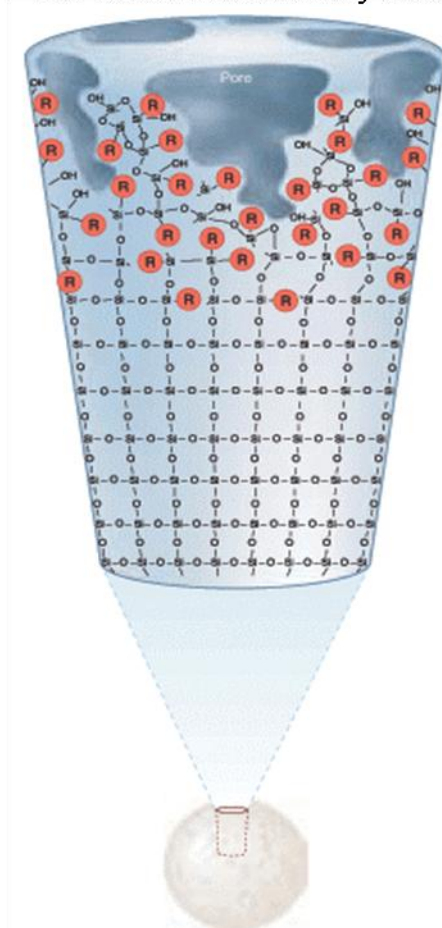
Obr. 3 Struktura 1.7 μm BEH částice



Zdroj: [10]

Dalším příkladem využití hybridní technologie jsou kolony Gemini od firmy Phenomenex, které používají v posledním stadiu výroby částice silikagelu speciální

Obr. 4 Struktura částice kolony Gemini



Zdroj: www.phenomenex.com, červen 2008

technologii Gemini Twin, jejímž výsledkem je unikátní povrchová organokřemičitá vrstva vytvářející novou kompozitní částici. Tato nová částice si však zachovává svoji vnitřní, celým procesem nedotčenou strukturu čistého silikagelu, a tím i mechanickou pevnost, rigiditu a především i vynikající dělicí účinnost. Přitom organokřemičitanový krunyř v povrchových vrstvách chrání částici před chemickým napadením.[11]

Používání analytických kolon s hybridní stacionární fází je v současné době stále častější. Vysoká účinnost a chemická i mechanická stabilita umožňují jejich použití v ultra účinné kapalinové chromatografii, která se stává novým trendem v HPLC. Navíc zrychlení jednotlivých analýz a možnost použití sto procentní vodné mobilní fáze přispívá k ochraně životního prostředí snížením spotřeby organických rozpouštědel.

3.3.2. Monolitické stacionární fáze⁴

Analytické kolony s monolitní stacionární fází se od běžných částicových kolon liší tím, že jsou tvořeny jedním kusem vysoce porézního materiálu, který umožňuje kompaktnější zaplnění prostoru uvnitř kolony. Největší výhodou těchto kolon jsou jejich hydrodynamické vlastnosti vyplývající ze struktury tohoto materiálu. Monolitické kolony mají dva typy pórů:

- Makropóry (průtočné póry) - jejichž struktura snižuje zpětný vnitřní odpor kolony a výrazně zrychluje přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, což umožňuje používání vysokých průtokových rychlostí.
- Mesopóry (difúzní póry) - zvětšují aktivní povrch sorbentu, čímž zvyšují separační účinnost kolon.

Díky těmto vlastnostem dochází ke zkracování časů jednotlivých analýz a při zpracování většího množství vzorků se rovněž rapidně snižuje spotřeba mobilní fáze.

Vzhledem k tomu, že výzkum v oblasti monolitů se neustále rozvíjí a informací o jejich přípravě i použití neustále přibývá, je těžké jednoduchým způsobem systematicky rozdělit a popsat doposud připravené stacionární fáze. Asi nejjednodušší způsob dělení je podle použitého materiálu na anorganické a organické monolity. Další možností, která je u částicových kolon nezvyklá, je rozdělení podle tvaru analytických kolon na disky, trubky a tyčinky.

Obr.5 Porovnání tvarů a velikostí monolitů od firmy BIA Separations s běžnou částicovou kolonou (150 x 4.6 mm ID)



Zdroj: www.biaseparations.com, červenec 2008

⁴ Kapitola 3.3.2 byla kromě uvedených odkazů vypracována ze zdrojů [6,12-14]

▪ Anorganické monolity

U anorganických materiálů podobně jako u částicových stacionárních fází našel největší využití silikagel. Jako první popsali přípravu a použití silikových monolitů japoňští vědci Tanaka, Nakanishi a Soga.[14,15] Tato technologie výroby umožňuje přípravu monolitů s přesně definovanou strukturou. Například komerčně dostupné silikové monolitní kolony od firem Merck (Chromolith[®]) a Phenomenex (Onyx[®]) obsahují makropóry o velikosti 2 μm a mesopóry o velikosti 12 nm. Tyto kolony jsou stabilní v rozsahu pH 2.0-7.5 a jejich maximální pracovní teplota je 45°C. Kromě normálních fází se také vyrábějí modifikované fáze pro reverzní chromatografii C8 a C18 s vnitřním průměrem 3 a 4.6 mm a v rozmezí délek od 25 do 100 mm. Nevýhodou těchto kolon je objemová kontrakce, ke které dochází při zrání monolitu. Proto se tyto tyčinky vyrábějí odděleně a poté se uzavřou do smršťivé trubice z materiálu PEEK (poly-ether-ether-keton), která tvoří tělo kolony.

Kvůli těmto objemovým změnám lze připravit přímé tyčinky pouze do velikosti 150 mm. Ovšem díky možnosti snadného spojení kolon pomocí jednoduché spojky, je možné získat libovolně dlouhou kolonu kombinací výše zmíněných délek kolon.

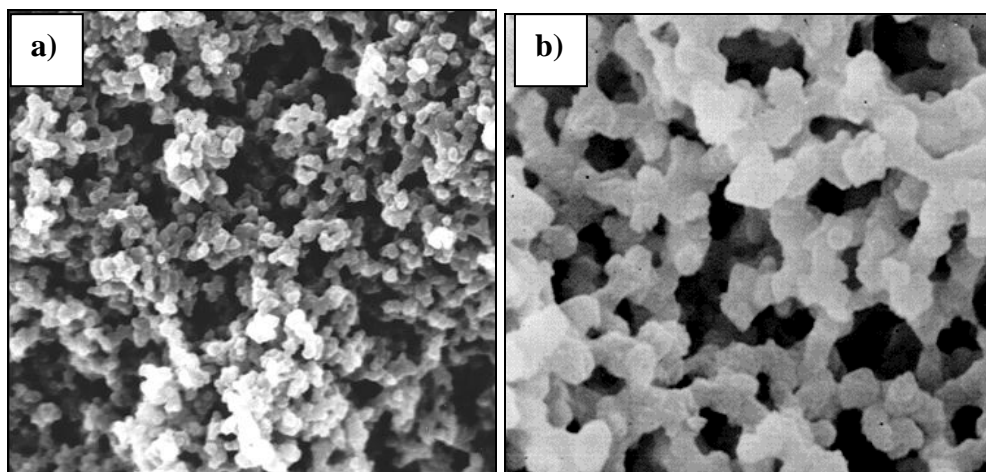
Obr. 6 Spojení dvou monolitických kolon Chromolith



Zdroj: [12]

Struktura silikových pórů, které se skládají z dobře uspořádaných a přibližně stejně velikých skeletů se zcela liší od pórů organických monolitů. Ty tvoří neuspořádané mikroglobule s makropóry mezi nimi, a proto jsou vhodnější spíše pro separaci velkých molekul. Monolity silikagelové se naopak osvědčily při separaci molekul malých.

Obr. 7 Srovnání morfologie a) polymerního a b) silikového monolitu



Zdroj: [13]

▪ Organické monolity

Historie organických monolitů je ve srovnání s monolity na bázi siliky mnohem starší a jejich vznik je též úzce spjat s úspěchy československých vědců. Jedny z prvních experimentů byly prováděny v laboratoři Miroslava Kubína v šedesátých letech minulého století, kdy se pracovníci této laboratoře snažili najít materiál, který by nahradil v té době velice populární Sephadex používaný v gelové chromatografii.[16] K tomu využili 2-hydroxyethyl-methakrylát, který nedávno předtím vyvinul profesor Wichterle. Jímí vytvořená kolona však měla nedostatečnou separační účinnost a také nízkou průchodnost (4 ml/h^{-1}).

O něco úspěšnější už byly dvě nezávislé skupiny v Německu a USA, které připravily polymerací *in situ* kolony z polyurethanové pěny, které umožňovaly dosáhnout účinnějších separací. Ovšem i tyto kolony stále nedosahovaly kvalit tehdy používaných chromatografických médií, a tak se na čas od dalšího výzkumu monolitů ustoupilo. K jejich znovuzrození došlo až ke konci osmdesátých let a opět ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie ČSAV v Praze, kde byly s přispěním F. Švece vyvinuty první monolitické disky.

Makroporézní polymerní disky:

Nejčastěji se připravují radikálovou polymerací z glycidyl-methakrylátu nebo ethylen-dimethakrylátu ve speciálních formách deskového nebo válcovitého tvaru, kdy se mechanickým obráběním těchto desek či roubíků vyrábějí vlastní disky umožňující rychlé a účinné separace. Tyto disky se dále vkládají do pouzdra-prstence vyvinutého

pro tento účel, aby nedocházelo k jejich mechanickému poškození. Dokonale si tuto technologii osvojila slovinská firma BIA Separations, která monolitní disky vyrábí pod názvem CIM[®]Disk. Rozsah použití těchto disků zahrnuje celé spektrum separačních mechanismů od reverzní chromatografie přes iontovou výměnu až po bioafinitní chromatografii. Další výhodou je možnost vložení i několika disků lišících se funkčními skupinami za sebou do jednoho pouzdra a tím docílení vícerozměrné separace.

Netradiční tvar, který je pro chromatografii s částicovými kolonami naprosto nezvyklý, přináší i nové poznatky o separačním mechanismu v tenkých monolitických vrstvách. Podrobně se jejich studiem zabýval Belenkii, Tennikova a Švec, kteří zjistili, že proces separace v tomto médiu je zcela odlišný od separací v podlouhlých kolonách včetně monolitických.[17]

Makroporézní polymerní kolony:

Na rozdíl od disků jsou tyto monolity připravovány přímo v trubce kolony či v kapiláře, které se naplní polymerační směsí, uzavrou a za tepla zpolymerují. Takto připravené monolity pak již natrvalo zůstávají v těchto formách. Přímou výrobou se tedy eliminuje mechanické obrábění monolitu, avšak výměna monolitu za jiný v téže trubici je prakticky nemožná.

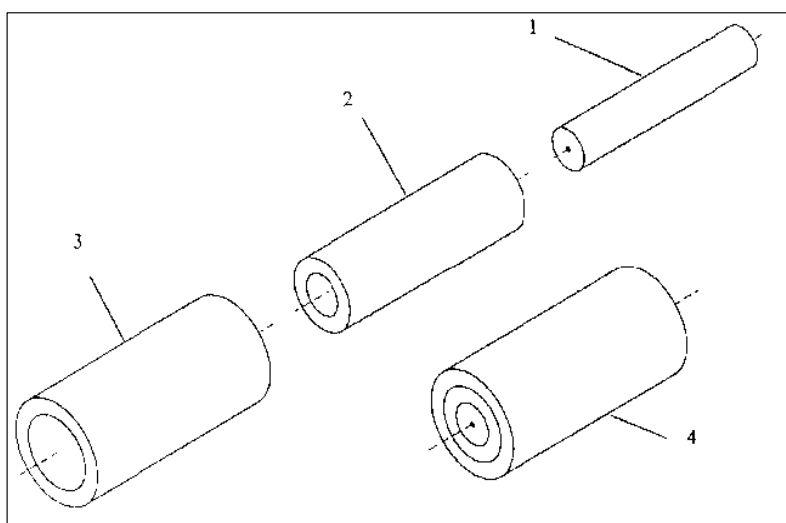
Další možností výroby těchto kolon je tzv. polymerace methatesí za otevření kruhu (ROMP) nedávno popsána Buchmeiserem[18] nebo polymerace iniciovaná UV zářením, která ovšem vyžaduje použití materiálů transparentních pro UV světlo.

Funkční skupiny monolitických kolon připravených přímou polymerací jsou dány použitými monomery. Pokud jsou však tyto funkční skupiny nevhodné pro příslušnou separaci je možné je dále modifikovat. Pro zvýšení počtu různých funkčních skupin se používá roubování. Při něm z každé povrchové skupiny roste řetězec obsahující četné nové funkční skupiny, které mohou významně zvýšit vazebnou kapacitu. Takovéto modifikace pak mohou vést až ke vzniku speciálních monolitů s neobvyklými vlastnostmi. Peters *et. al.*[19] připravil monolit pro separaci bílkovin, který mění polaritu v závislosti na teplotě. Postupné eluce tak bylo dosaženo pouhou změnou teploty kolony.

Rychlost separace, které je možno dosáhnout v monolitických kolonách, je přitažlivá pro jejich použití v biotechnologických výrobcích. K tomu je však potřeba připravit objemné monolity. Použití výše zmíněných výrobních postupů pro získání materiálů s požadovanými porézními vlastnostmi je nevhodné. Polymerace jsou vesměs

exotermní reakce a udržení přesné teploty u takto velkých monolitů je velice obtížné. Elegantní řešení tohoto problému navrhl Podgornik[20], který připravil monolit ve tvaru trubice, jejíž stěny jsou tenčí a teplota při polymeraci je snáze udržovatelná. Dále zjistil, že zvětšení průměru při zachování stejné tloušťky stěny vede ke kvadratickému nárůstu celkového objemu separačního média a tedy i ke zvýšení separační kapacity. Při použití několika tubulárních monolitů zasunutých do sebe teleskopickým způsobem ukázaným na obr. 8 umožňuje dosáhnout obrovských objemů stacionární fáze. Tok těmito kolonami je radiální, většinou z vnějšku do středu, a proto jsou označovány jako tubulární kolony s radiálním tokem. Vynikající permeabilita těchto monolitů umožňuje použití velmi vysokých průtokových rychlostí (až 2 l/min) a pod označením CIM[®] Tube je vyrábí firma BIA Separations.

Obr.8 Konstrukce monolitické jednotky o velkém objemu s radiálním průtokem pro preparativní separace



Zdroj: [13]

Stlačitelné monolitní kolony:

K jejich objevu významně přispěl švédský profesor Hjertén z Uppsaly, který experimentoval se silně zesíťnými polyakrylamidovými gely. Ten zjistil, že po stlačení sloupce gelu s použitím hydrostatického tlaku proudící kapaliny lze významně zvýšit jeho permeabilitu. Tato technologie byla posléze převzata a vylepšena americkou firmou BioRad k přípravě ionto-výměnných kolon UNO.

Monolitické kolony UNO



Zdroj: www.bio-rad.com,
srpen 2008

Aplikační využití monolitů je zatím stále malé, ale vzhledem k rostoucímu počtu publikovaných prací, které se zabývají využitím monolitních kolon v laboratorní i výrobní praxi, je pravděpodobné, že monolitní stacionární fáze v budoucnosti mohou postupně nahradit kolony částicové. Jak již bylo popsáno, příprava monolitů je relativně jednoduchá, čehož se využívá zejména ve výzkumných laboratořích, kde si vědci připravují kolony dle jejich konkrétních požadavků. Ovšem pro potřeby pracovišť fungujících v režimu správné výrobní a laboratorní praxe je nezbytné použití komerčně dostupných kolon (viz. obr. 9), které zaručují opakovatelnost výsledků.

Obr. 9 Přehled současně vyráběných monolitických kolon pro HPLC

Produkt	Tvar	Výrobce	Web	Materiál	Separční módy
CIM Disk	disk	BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko	biaseparations.com	modifikované polymethakralátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, hydrofobní interakce, obrácená fáze, bioafinitní
CB Silica plate	disk	Conchrom, Bremen, Německo	conchrom.de	modifikovaná silika	obrácená a normální fáze
SepraSorb	disk	Sepragen, San Leandro, Kalifornie, USA	sepragen.com	modifikovaná celulóza	iontová výměna
CIM Tube	trubka	BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko	biaseparations.com	modifikované polymethakrylátové kopolymery	iontová výměna
UNO	kolona	BioRad, Richmond, Kalifornie, USA	dio-rad.com	kopolymery methakrylamidových monomerů	iontová výměna
Swift	kolona	ISCO, Lincoln, Nebraska, USA	isco.com	modifikované polymethakralátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, obrácené fáze
Chromolith	kolona	Merck, Darmstadt, Německo	chromolith.com	modifikovaná silika	obrácené fáze
Monoliths	kolona	LC Packings, Amsterdam, Holandsko	lcpackings.nl	polystyrenové kopolymery	obrácené fáze

zdroj: [13]

3.4. Nové trendy v HPLC ⁵

S novými technologiemi přicházejí nové trendy také do kapalinové chromatografie. Vývoj stacionárních fází je úzce spjat s rozvojem chromatografické instrumentace.

Podle van Deemterovy teorie účinnost chromatografického systému roste se zmenšující se velikostí částic a zároveň se rozšiřuje použitelné rozmezí lineárních průtoků mobilní fáze při zachování stejné separační účinnosti. Se snižující se velikostí částic však roste zpětný odpor kolony, který byl dlouhou dobu limitujícím faktorem HPLC instrumentace. Další komplikace spojené s malými částicemi nastaly při plnění kolon, při kterém je zapotřebí velmi vysokých tlaků. Docházelo k deformaci částic, což vedlo ke snížení separační účinnosti a opakovatelnosti analýz. Tento problém byl vyřešen až s objevem nových materiálů (hybridní částice) a technologií (např. patentovaná BEH technologie ethylenových můstků firmy Waters).

*Agilent 1200 Series RRLC,
Agilent Technologies*



zdroj: [21]

vyžadují použití speciálně upravených přístrojů. První systém, využívající tzv. sub-2-mikronové kolony, s názvem Acquity UPLC uvedla na trh na přelomu nového tisíciletí firma Waters. Dala tak vzniknout nové separační technice UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Další výrobci kapalinových chromatografů, kteří stačili zachytit trend separace na kolonách s malými částicemi, byli firma Agilent Technologies

ACQUITY UPLC System, Waters



Zdroj: [10]

šlá. Docházelo k deformaci částic, což vedlo ke snížení separační účinnosti a opakovatelnosti analýz. Tento problém byl vyřešen až s objevem nových materiálů (hybridní částice) a technologií (např. patentovaná BEH technologie ethylenových můstků firmy Waters).

Zatímco monolitní analytické kolony stejně jako partikulární kolony s velikostí částic 3-10 μm jsou snadno zapojitelné do běžných HPLC systémů, tak nové typy analytických kolon s částicemi 1.7-2.2 μm a vnitřními průměry 1.0-4.6 mm již vyžadují použití speciálně

Prominence UFLC, Shimadzu



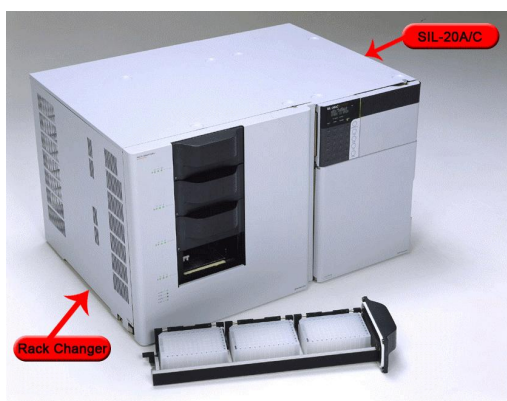
Zdroj: [22]

⁵ Kapitola 3.4 byla vypracována ze zdrojů [3, 5, 7, 10, 21, 22]

s přístrojem Agilent 1200 Series RRLC a firma Shimadzu se systémem Prominence UFLC.

Všechny výše zmíněné přístroje jsou přizpůsobeny vysokým tlakům (60-100 MPa), jsou vybaveny speciálními kapilárními spoji a mají maximálně minimalizovaný systémový objem včetně detekční cely. Detektory musí umožňovat rychlý sběr dat se zachováním dobrého rozlišení a vysoké citlivosti. Vysoká rychlost

Autosampler na vialky SIL-20A/C spojený s autosamplérem na mikrotitrační destičky-Rack Changer, Shimadzu

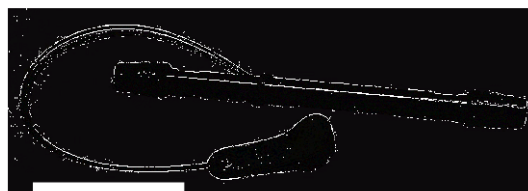


zdroj: [22]

analýz pak umožňuje zapojení speciálních autosamplérů např. Rack changer (Shimadzu) nebo Sample organizer (Waters), které umožňují zpracování velkých množství vzorků s minimálními nároky na lidskou obsluhu. Novinkou jsou rovněž kolonové termostaty (např. u RRLC) vybavené předkolonovým ohříváčem, který snižuje případnou disperzi píků při nízkých průtocích mobilní fáze, a postkolonovým chladičem, jenž chladí mobilní fázi na teplotu optiky detektoru a zabraňuje tak zvyšování šumu. Další výhodou zvýšené teploty mobilní fáze je zmenšení zpětného odporu na koloně.

Novinkou v oblasti analytických kolon je technologie eCord vyvinutá firmou Waters. Jedná se o čip, který je ke koloně trvale připevněn a uchovává Certifikát o analýze. Dále zaznamenává veškerá data o používání kolony jako je počet nástřiků, maximální teplota a tlak, atd. Všechny tyto záznamy nelze přepsat ani odstranit což je výhodné zejména pro laboratoře pracující v režimu ISO norem a v režimu SLP či SVP.

UPLC kolona s čipem eCord Waters



Zdroj: [10]

Mezi další trendy v HPLC patří tzv. on-line chromatografie a miniaturizace analytických systémů. Vzhledem k tomu, že analýzy některých vzorků jsou stále náročnější, je snaha tato stanovení zjednodušit pomocí automatizace. Zapojení speciálních přepínacích kolonových ventilů do HPLC systémů umožňuje vícerozměrnou (multidimensionální) separaci, která poskytuje zvýšení píkovej kapacity, což vede k daleko vyššímu rozlišení.

Miniaturizace je v současnosti celosvětovým trendem ve všech oborech a odvětvích. V chromatografii se hovoří zejména o tzv. mikro- a nano- systémech (mikro-LC, nano-LC), jež umožňují rychlé analýzy velkého množství vzorků při velmi nízkých průtocích mobilní fáze s minimálními nároky na objem vzorků i rozpouštědel. Vzhledem k těmto podmínkám je pro výše zmíněné LC-systémy vhodné spojení s MS detekcí, která je charakterizována vysokou citlivostí a navíc poskytuje informace o struktuře analytů.

3.5. Sběr a úprava biologického materiálu před analýzou ⁶

Biologický materiál můžeme definovat jako multikomponentní systém obsahující širokou paletu látek přírodního původu o různé molekulové hmotnosti, které dohromady tvoří biomatrix. Podle původu se potom dále dělí na materiál lidský, živočišný a rostlinný. Jako analyty pak označujeme stanovované látky, které jsou předmětem našeho zájmu. Ty mohou být endogenního (např. proteiny, vitaminy, enzymy, atd.) i exogenního (např. léčiva a jejich metabolity, pesticidy, polutanty, atd.) původu.

Analýza vzorků biologického materiálu je vzhledem ke složitosti této matrice velice náročná a vyžaduje komplexní znalosti z různých oborů, především pak z oblastí medicíny, biochemie, chemie a biologie. Příprava vzorku patří k základním úkonům při analýze biologického materiálu. Na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení – a to jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska. Volbou vhodné metody přípravy vzorku tedy rozhodujeme nejenom o přesnosti stanovení dané látky (analytu), ale vůbec o možnosti jejího určení.

Základní postupy při úpravě biologického materiálu jakéhokoliv původu jsou víceméně shodné. Tato práce je však zaměřena především na zpracování vzorků lidského původu, zejména pak tělních tekutin - krve a moči.

3.5.1. Vliv preanalytické fáze na laboratorní vyšetření

Laboratorní vyšetření kromě analýzy vzorku zahrnuje přípravu pacienta, vlastní odběr vzorku, zaslání odebraného materiálu do laboratoře a přípravné práce či skladování vzorku před samostatným stanovením. V této souvislosti hovoříme o preanalytickém období, které je z hlediska ovlivnění výsledku laboratorního vyšetření zdaleka nejdůležitější. V této fázi hrají nejvýznamnější roli následující faktory:

- osoba pacienta
- odběr vzorku
- transport vzorku
- uchovávání vzorku před analýzou

První tři faktory se týkají lékařů a sester klinických oborů, zatímco poslední faktor se týká především laboratoří.

⁶ Kapitola 3.5 byla kromě uvedených odkazů vypracována ze zdrojů [23-26]

Osoba pacienta

Tento pojem v sobě zahrnuje jednak faktory, které nelze ovlivnit, ale je nezbytné vzít je v úvahu při hodnocení výsledků, a jednak faktory, které jsou ve většině případů ovlivnitelné a jejichž účinek na laboratorní vyšetření lze eliminovat.

Faktory neovlivnitelné:

- *pohlaví* – zahrnuje různé rozmezí referenčních hodnot u mužů a žen
- *věk* – bere v úvahu rozdílné fyziologické hladiny analytů u dětí, dospělých a seniorů
- *rasa* – referenční hodnoty jsou odlišné v rámci různých etnických skupin díky genetické odlišnosti
- *gravidita* – v těhotenství se díky hormonálním změnám mění poměry některých látek
- *jiné onemocnění* – především chronické choroby mohou zapříčinit falešně pozitivní výsledky testů a tím vést k nesprávným závěrům.

Faktory ovlivnitelné:

- *fyzická aktivita* – mění koncentrace mnohých hormonů, enzymů a metabolitů, velikost těchto změn je závislá na délce a intenzitě zátěže a na trénovanosti jedince
- *psychický stres* – zvyšuje koncentraci některých hormonů a může ovlivňovat sekreci šťáv gastrointestinálního traktu
- *potrava, tekutiny, alkohol* – ovlivňují pH moči a koncentraci některých látek v séru, mohou mít rušící vliv na celou řadu biochemických testů (zejména alkohol by pacient neměl přijímat 24 hodin před vyšetřením)
- *kouření* – zcela ruší vyšetření žaludeční sekrece. Může ovlivňovat rychlost metabolisme léků
- *léky* – mohou působit na metabolismus stanovené látky nebo interferovat při vlastním stanovení.

Odběr vzorku

Hlavním kritériem pro odběr vzorku a objektivní výsledky analýz by měla být reprezentativnost vzorku. Dalším a neméně důležitým faktorem je potom způsob, místo

a doba odběru vzorku. Zásadní je rovněž správné označení odběrové nádoby s přesnou identifikací pacienta.

Odběrové zkumavky na krev



Zdroj: www.isips.org, září 2008

Krev

Krev je biologický materiál, který se nejčastěji posílá k vyšetření. Její analýza nám podává přesné informace o změnách ve složení vnitřního prostředí organismu. Způsob odběru je dán metodikou vyšetření v laboratoři a jejím technickým vybavením. Dnes moderní vyšetřovací metody, tzv. mikrometody, umožňují z velmi malého množství krve provést celou řadu stanovení a testů. Při vyšetření krve se vyšetřuje plná krev, sérum nebo plazma. V případě odběru krve je důležité vzít v úvahu následující faktory:

- *druh odebrané krve* - venózní, tepenná, kapilární
- *doba odběru* – obvykle se doporučuje odběr ranní krve po nočním lačnění, kdy se minimalizuje riziko ovlivnění výsledku potravou
- *poloha pacienta* - doporučuje se odběr vleže, vstoje stoupá koncentrace vysokomolekulárních látek včetně hemtokritu až o 10-15%
- *dezinfekce kůže* - nebezpečí hemolýzy či falešně pozitivních výsledků např. při stanovení alkoholu v krvi
- *odběrová nádoba* – nejvýhodnější jsou plastové odběrové nádoby na jedno použití. Ty mohou být pro odběr srážlivé krve opatřené vrstvou kaolinu nebo skelnou vatou. Oddělení séra dále usnadňuje inertní gel, jehož hustota je zvolena tak, aby po odstředění vytvořil rozhraní mezi krvinkami a vrstvou séra. Použití skleněných nádobek přináší riziko

prasknutí (např. v centrifuze) a následné kontaminace okolí a riziko ovlivnění výsledku testů z důvodu špatného umytí skla.

- *typ krve (srážlivá a nesrážlivá)* – pro získání nesrážlivé krve je zapotřebí přidávat do odběrové nádoby protisrážlivé činidlo (heparin, fluorid sodný, EDTA). Antikoagulant však může měnit složení krve a rušit analýzu např. při stanovení iontů, což je vždy třeba brát v úvahu.

Moč

Moč je tekutina tvořená a vylučovaná ledvinami. Močí se organismus zbavuje celé řady látek, které v něm vznikly za fyziologických i patologických okolností, ale také látek, které se do organismu dostaly zvenčí.

Vzhledem k neinvazivnímu způsobu je odběr moči oproti odběru krve mnohem jednodušší a pro pacienta méně stresující. Vyšetření se provádí obvykle z ranní moči a moč je odebírána buď do různých

odběrových nádobek, nebo do speciálních plastových zkumavek v závislosti na typu a místě stanovení. Díky snadné dostupnosti a značné informativní hodnotě patří analýza tohoto materiálu též mezi nejčastěji stanovované vzorky v biochemických laboratořích.

Odběrové zkumavky na moč



Zdroj: www.isips.org, září 2008

Transport vzorku

Vzorek by měl být po odběru buď náležitě uchován, nebo co nejdříve odeslán do laboratoře k dalšímu zpracování. Během transportu by měl být chráněn před světlem a extrémními teplotami. U přepravy některých vzorků krve je často nezbytná i opatrná manipulace. Mechanická hemolýza je totiž jednou z nejčastějších příčin znehodnocení vzorků krve.

Uchovávání a příprava vzorku před analýzou

Po transportu odebraného vzorku do příslušné laboratoře je veškerá manipulace s ním až do vlastní analýzy označována za laboratorní preanalytickou fázi. I během této

doby však může dojít k chybě, která by ovlivnila výsledek vyšetření. Tomu se snažíme vyvarovat dodržováním přesně definovaných postupů (SLP, SOP, SZP) a automatizací.

Pokud není vzorek ihned zpracován, musí být uchováván tak, aby nedošlo ke zkreslení výsledků pozdějších analýz. Nejčastější způsob uchovávání vzorku je v chladu v lednici při +4°C v dobře uzavřené zkumavce. Další možností je chemická konzervace, která je častější u moči. Nutností je však ověření, zda příslušný konzervant neruší při požadované analýze. Pro dlouhodobé skladování séra, plazmy a moči je vhodné jejich zmrazení při -20°C eventuálně -80°C nebo jejich lyofilizace, což je způsob využívaný především u kontrolních sér. Pro sledování téhož vzorku v různém časovém rozmezí je nutné vzorek rozdělit do několika menších zkumavek, aby nedocházelo k opětovnému rozmrazování a zmrazování biologického materiálu.

Vlastní zpracování vzorku je značně závislé na jeho množství a na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu. K prvotním metodám zpracování patří centrifugace, která je nezbytná např. pro oddělení séra nebo plazmy a deproteinizace sloužící k odstranění látek bílkovinné povahy. Takto upravené vzorky se už mohou přímo analyzovat. Vzhledem ke složité struktuře biologické matrice však bývá přímé stanovení analytů z tohoto materiálu často velmi složité až nemožné a je tedy nezbytné odstranění pokud možno co největšího množství látek, které mají negativní vliv na analýzu. Za tímto účelem se používají různé typy extrakčních metod jako je extrakce do kapaliny (LLE, SDME), extrakce na pevnou fázi (SPE, SPME) a další.[3, 27,28]

V současnosti je stále větší snaha zavádět tzv. on-line stanovení, kdy je veškerá další úprava vzorku součástí automatického procesu, který snižuje množství chyb způsobených lidským faktorem. Nové technologie a přístroje sice stále častěji umožňují téměř plně automatizované analýzy, ovšem tato zařízení bývají velmi nákladná a vyplatí se tak pouze při stanovení velkých sérií vzorků. I proto zůstává samostatná úprava biologického materiálu (extrakce, filtrace, centrifugace, promývání, zakoncentrování či ředění vzorku, atd.) prováděná laboratorními pracovníky nedílnou součástí většiny analytických laboratoří.

3.5.2. Extrakční metody LLE a SPE

Vzhledem k tomu, že součástí této disertační práce bylo využití především dvou typů extrakcí LLE a SPE, je v následujícím textu uveden stručný popis obou metod včetně jejich principu a srovnání.

Extrakce do kapaliny - LLE (liquid-liquid extraction)

Extrakce z kapaliny do kapaliny stále patří mezi velmi důležité analytické separační metody a umožňuje mnoho jednoduchých, rychlých a selektivních dělení různých druhů látek v širokém rozmezí koncentrací.[3] Obecný princip metody vychází z pravidla „*podobné se rozpouští v podobném*“. Separace látek je tedy založena na jejich rozdílné rozpustnosti v systému dvou vzájemně nemísitelných kapalin, kterými jsou většinou vodný roztok a organické rozpouštědlo. Přičemž interakce mezi organickou a vodnou fází by měla být co nejmenší. Zároveň podmínky extrakce se musí upravit tak, aby rozpustnost extrahované látky v kapalině, do níž se extrahuje, byla co největší. Postupy, které mohou nejvíce ovlivnit účinnost LLE jsou:

- *výběr vhodného rozpouštědla* – viz výše.
- *potlačení ionizace analytu* – vzrůstá jeho rozpustnost v organické fázi:
 - úpravou pH,
 - přidavkem solí (vysolovací efekt),
 - přidavkem kovových iontů (tvorba iontových párů).
- *vzájemný poměr fází* - větším množstvím rozpouštědla, do kterého se extrahuje, dosáhneme vyššího výtěžku extrakce. Vhodný je poměr 1:5 až 1:10.
- *opakování extrakce* – účinnost extrakce je větší při použití několika menších podílů organické fáze než při extrakci jedním velkým objemem. V praxi se používá maximálně 2-5 následných extrakcí. V případě nízkého výtěžku je třeba změnit nebo upravit celý extrakční systém.

Výhody LLE	Nevýhody LLE
jednoduchost	tvorba emulzí
minimální nároky na instrumentaci	větší objemy vzorků
nízká cena	vysoká spotřeba organických rozpouštědel
široké možnosti využití	nemožnost automatizace

Ačkoliv je metoda LLE stále jednou z nejvíce používaných extrakčních metod ve všech typech laboratoří, je i vzhledem k výše zmíněným nevýhodám stále více nahrazována metodou SPE. Výhodou extrakce na pevné fázi je především možnost automatizace a podstatné snížení objemu vzorků i rozpouštědel. Tento problém by

mohla vyřešit miniaturizace celého systému. V druhé polovině devadesátých let 20. století byla poprvé popsána metoda mikroextrakce kapalina-kapalina. Tento systém využívá kapku rozpouštědla na konci teflonového vlákna nebo na špičce jehly, tzv. extrakce na jedné kapce (Single-Drop Microextraction, SDME) a principiálně vychází z metody SPME (viz níže). Postup může být následující: injekční (nástříková) jehla s organickým rozpouštědlem (o objemu 1-2 μl) se ponoří do nádoby s vodným roztokem vzorku. Poté je pístem stříkačky vytlačena kapka rozpouštědla do vzorku a po určité době působení (extrakce) se kapka opět vtáhne zpět. Dále se jehla vytáhne ze vzorkové nádoby a provede se nástřik do chromatografického systému. Extrakce může být provedena i v prostoru nad kapalinou v tzv. headspace módu a celý tento proces lze tedy úspěšně aplikovat v HPLC i v GC.[3,27,29,30]

Kritickým faktorem opakovatelnosti celého procesu je teplota a doba extrakce, kdy se vzrůstajícím časem nebo teplotou dochází ke zmenšování objemu kapky. Opačný problém můžeme pozorovat u příliš velkého objemu kapky, kdy se zvětšuje riziko jejího odtržení od vlákna či jehly. Vyřešení těchto nedostatků by mohly přinést další nové způsoby extrakcí označované jako membránové extrakční techniky. Tyto metody využívají vysoce porézní materiály, které slouží k ukotvení jedné z fází. Jedná se např. o metody MMLLE (microporous membrane liquid-liquid extraction) a SLE (supported liquid extraction).[27,31]

Extrakce na pevnou fázi - SPE (solid-phase extraction)⁷

Extrakce tuhou fází je jednostupňová metoda rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je tuhá. Do tuhé fáze přechází analyt z plynné či kapalné fáze.[3] Metoda SPE se používá k odběru a úpravě vzorku. Je vhodná k odstranění rušivých složek matrice, k selektivnímu obohacení (zakoncentrování) vzorku či k izolaci stopových látek.

Princip metody spočívá v selektivním zadržování skupiny látek, nejčastěji organických molekul na pevné fázi, která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce, tzv. cartridge. Pro úspěšnou SPE extrakci je tedy nejdůležitější výběr vhodné tuhé fáze (sorbentu) v závislosti na vlastnostech analytu a způsobu využití SPE.

V současné době je na našem trhu velké množství výrobců či distributorů, kteří nabízejí rozmanité druhy SPE disků a kolonek s různými typy sorbentů, které se velice

⁷ Kapitola Extrakce na pevnou fázi - SPE byla kromě uvedených odkazů vypracována ze zdrojů [32-35]

podobají sorbentům běžných analytických kolon. Hlavním rozdílem je především jiná velikost částic, která se v případě SPE sorbentů pohybuje v rozmezí od 10 do 100 μm . Materiály sorbentů jsou opět stejné jako v kolonách pro HPLC. Od klasických sorbentů na bázi siliky nebo aluminy, přes modifikované a polymerní sorbenty až po různé hybridní materiály.

Výhody SPE	Nevýhody SPE
selektivita	proměnlivost kvality sorbentu při výrobě
jednoduchost	pro některé specifické izolace nejsou na trhu vhodné SPE kolonky
nízká spotřeba rozpouštědel	
reprodukovatelnost	-
časová nenáročnost	kvalita i sortiment SPE kolonek se však neustále zlepšuje a zvětšuje
možnost automatizace	

Provedení SPE

Extrakce na pevnou fázi se používá k rozdělení látek, které jsou předmětem našeho zájmu (analytů) od nečistot (matrice a ostatní látky v ní obsažené). Vzhledem k typu vzorku a požadavkům analytika existuje několik obecných schémat jak dosáhnout požadované separace.

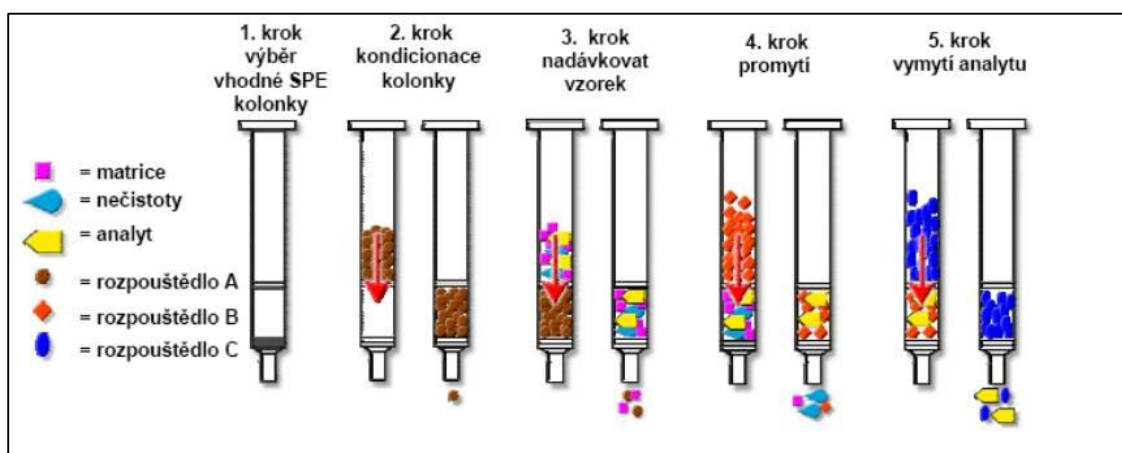
Selektivní extrakce – sorbent slouží k zadržení vybraných látek (buď analytu nebo nečistot).

Selektivní promývání – analyt i nečistoty jsou zadrženy na sorbentu. Nečistoty jsou odstraněny pomocí vhodného rozpouštědla.

Selektivní vymývání – analyt i nečistoty jsou zadrženy na sorbentu. Analyt je vymyt pomocí vhodného rozpouštědla.

Vlastní proces extrakce na pevnou fázi se pak skládá z následujících pěti kroků, které mohou být dle potřeby redukovány. Například při použití SPE k odstranění nečistot selektivní extrakcí lze použít pouze první tři kroky.

Obr. 10 Schematické znázornění postupu provedení SPE



Zdroj: [36]

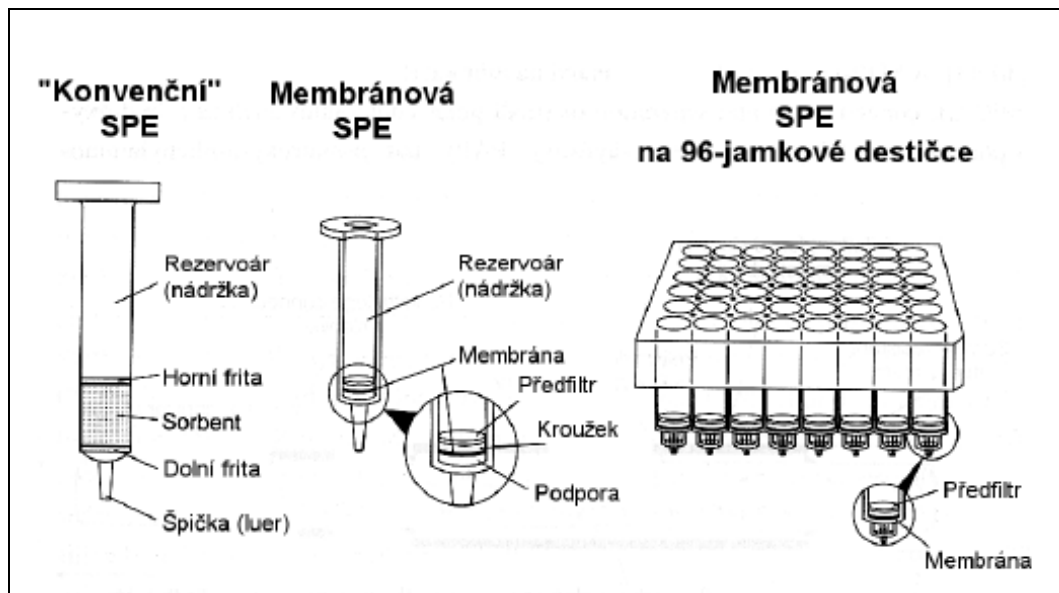
- 1) **Výběr vhodné SPE kolonky** – viz výše
- 2) **Kondicionace kolonky** - příprava kolonky na reprodukovatelnou interakci složek vzorku s pevnou fází, která je umožněna solvatací pevné fáze. Kolonka se propláchne předepsaným rozpouštědlem (aktivace pevné fáze pro interakce se vzorkem) a následně rozpouštědlem podobným vzorku (úprava prostředí pro vlastní vzorek).
Např. Fáze C18: aktivace metanolem, úprava prostředí vodou a následuje vodný roztok vzorku
- 3) **Aplikace vzorku** – podle druhu pevné fáze a vzorku dochází ke specifickým reakcím látek s pevnou fází. K dosažení maximální retence sledované látky je často nutné přizpůsobit vlastnosti extrahované směsi konkrétním reakčním podmínkám (úprava pH, precipitace proteinů apod.). Žádaná skupina látek se pak selektivně sorbuje a nesorbované látky (matrice) procházejí volně kolonkou.
- 4) **Promývání** - propláchnutí sorbentu vhodným rozpouštědlem vede k vymytí zbytků matrice vzorku z kolonky, zatímco stanovované látky zůstávají sorbovány na pevné fázi.
- 5) **Eluce (vymývání)** - kolonka se promývá vhodným elučním rozpouštědlem, dochází k selektivní desorpci izolovaných látek z pevné fáze a k jejich vymytí z kolonky.

Pozn. Tomuto procesu může ještě předcházet krok **Sušení** (např. proudem inertního plynu - nejčastěji dusíku). Zejména v případě pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku.

Instrumentace SPE

Vybavení potřebné pro extrakci na pevnou fázi (SPE) může být velice různorodé. Zpravidla se jedná o kolonky ve tvaru injekční stříkačky bez pohyblivého pístu, které jsou naplněné sorbentem ve formě sloupce nebo membrány. V prvním případě se jedná o tzv. SPE kolonky, které jsou definovány typem pevné fáze, objemem kolonky (1 – 60 ml), maximální průtokovou rychlostí, kapacitou (50 mg – 10 g), minimálním elučním objemem (10 μ l – 50 ml) a materiálem vlastní kolonky (sklo, polypropylen). V druhém případě jde o extrakční disky, které představují moderní formu SPE. Disk je tvořen tenkou kompozitní membránou z PTFE nebo PVC s chemicky vázanou stacionární fází, což přináší řadu výhod oproti konvenční SPE. Větší plocha umožňuje používání větších průtokových rychlostí, menší hmota sorbentu snižuje objemy vzorku i elučního činidla a eliminace tvorby kanálků přináší vyšší účinnost zadrže, zvyšuje kapacitu a výtěžnost. Nevýhodou extrakčních disků je riziko jejich ucpaní, čemuž se předchází předfiltrací, a zatím omezený počet dostupných fází.

Obr. 11 Způsoby provedení SPE



Vlastní realizace může být provedena přetlakem (např. při manuálním provedení, kdy se na roztok v kolonce působí injekčním pístem), podtlakem (za použití vakuového zařízení) nebo odstředěním. Všechny tyto procesy jsou relativně snadno automatizovatelné, což je jedna z největších předností SPE. On-line spojení s některou z chromatografických metod pak přináší řadu dalších výhod. Přímé dávkování vzorku

snižuje bezpečnostní rizika při práci s nebezpečným materiálem, dále se zvyšuje přesnost a citlivost metody a zvýšená produktivita snižuje celkové náklady na jednu analýzu.

Stále se snižující objemy analyzovaných vzorků i použitých rozpouštědel byly jedním z podnětů k vývoji nových metod využívajících principu extrakce na tuhou fázi. Příkladem může být SPE v mikrotitračních destičkách či ve špičkách pipet (ZipTip, Millipore)[37]. Další metoda, která byla vyvinuta především pro spojení s plynovou chromatografií, je metoda mikroextrakce tuhou fází - SPME (solid phase microextraction). Principiálně se jedná o stejnou techniku jako je SPE, ale liší se způsobem provedení. Sorbent je nanesen na krátkém úseku povrchu křemenné kapiláry ve formě tenkého filmu, přičemž povrch této kapiláry je chráněn ocelovým pouzdrem – jehlou, do které může kapilára zajíždět. Výhody SPME spočívají především ve snadném způsobu provedení a ekonomické nenáročnosti (opakované použití vlákna, bez použití rozpouštědel). Naopak nevýhody přináší náročná optimalizace, horší opakovatelnost a malá robustnost metody.

Velice podobnou metodou je potom tzv. extrakce pomocí míchadélka – SBSE (stir bar sorptive extraction). Sorbent je v tomto případě nanesen ve velmi tenké vrstvě (cca 1 mm) na povrch magnetického míchadélka vloženého do skleněného pouzdra.[38] Hlavním pozitivem této metody je především velmi nízký detekční limit ($\mu\text{g} - \text{ng/l}$) a snadné a rychlé provedení. K negativním stránkám patří prozatím málo prozkoumaná možnost opakovaného použití, nízká citlivost pro polárnější analyty a nebezpečí zpětné extrakce rozpouštědlem.

3.6. Sledované látky

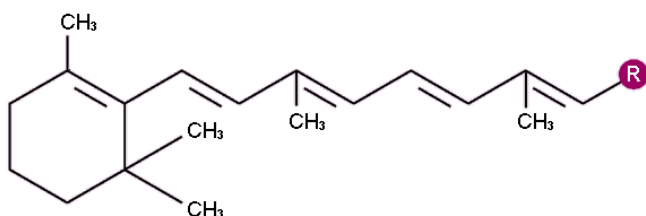
3.6.1. Vitamin A⁸

Vitamin A je esenciální látka hrající významnou roli ve výživě lidského organismu. Poprvé byl popsán na začátku 20. století. Termín „vitamin A“ představuje soubor několika látek – retinolu, retinalu, kyseliny retinové a retinyl esterů. Z hlediska terminologie je důležité i vysvětlení pojmu „retinoidy“, které jsou definovány jako látky strukturně a funkčně spjaté s retinolem. Mezi retinoidy se však řadí i strukturně odlišné látky vykazující aktivitu vitamínu A, jako např. nové syntetické retinoidy využívané v různých oblastech medicíny.

Vitaminu A je tvořen cyklohexenovým jádrem s postranním polyisoprenovým řetězcem (obr. 12). Retinol, též označovaný jako vitamin A – alkohol, představuje nejaktivnější formu vitamínu A. Dehydrogenací retinolu vzniká aldehyd retinal, jehož oxidací dále vzniká kyselina retinová. Přítomnost konjugovaného systému pěti dvojných vazeb dává možnost vzniku různých geometrických izomerů, z nichž nejčastější je konfigurace all-trans, následovaná formami 9-cis, 11-cis, 13-cis a 9, 13-dicis.

Vitamin A se vyskytuje pouze v živočišných tkáních. Bohatým zdrojem je máslo, vaječný žloutek, tresčí játra či další potraviny živočišného původu. Přírodním zdrojem vitamínu A je však i barevné ovoce a zelenina, které obsahují provitamin β -karoten. Jeho hydrolýzou ve střevě vznikají dvě molekuly retinalu, který je pak následně redukován na retinol.

Obr. 12 Struktura vitamínu A



R	
CH ₂ OH	Retinol
CHO	Retinal
COOH	Kyselina retinová

⁸ Kapitola 3.6.1. byla kromě uvedených odkazů vypracována ze zdrojů [23,39,40]

Biologický význam vitamínu A

Vitamin A hraje zásadní roli při růstu, reprodukci a embryonálním vývoji. Reguluje diferenciaci a proliferaci buněk a zajišťuje důležité funkce imunitního systému. Aktivní forma vitamínu A (*11-cis-retinal*) je nezbytná pro vidění, správnou stavbu pokožky a funkci sliznic. Vitamin A má také mírné antioxidační účinky. Silnějším antioxidantem je však β -karoten, který účinně likviduje volné radikály a jiné reaktivní kyslíkové částice (ROS). Kyselina retinová nemůže být v organismu přeměněna na retinol, a tedy nepodporuje vidění či reprodukci má však vlastní biologickou funkci. Podporuje růst a diferenciaci orgánů a v kožním lékařství se využívá při léčbě těžkých forem akné. Vzhledem k teratogenním účinkům se však nesmí podávat těhotným ženám (způsobuje vývojové vady u plodu).

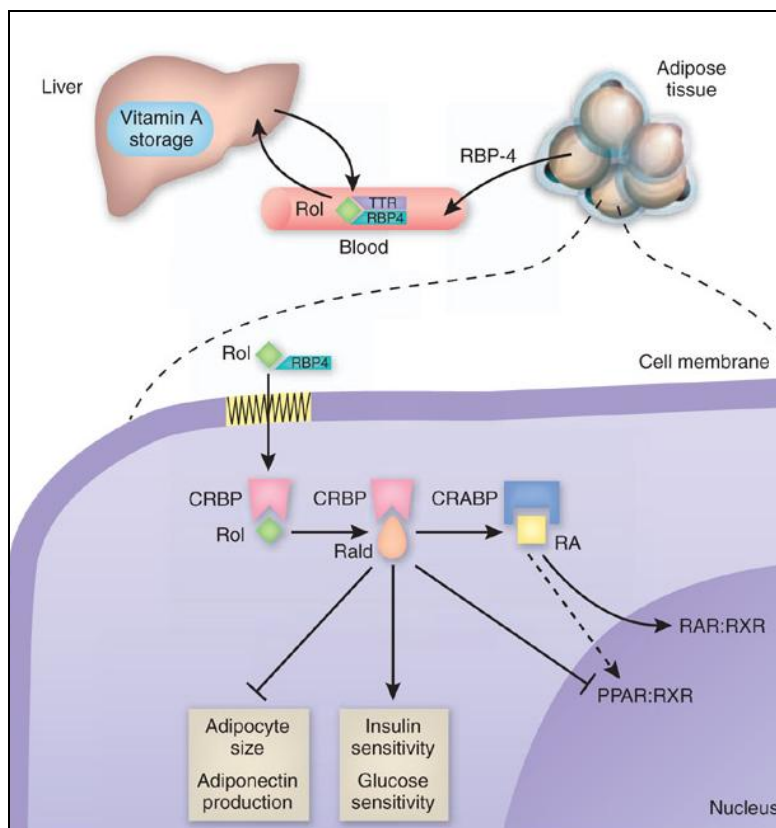
Nedostatek vitamínu A se projevuje zhoršeným nočním viděním. Další pokles může vést až ke keratinizaci epitelálních tkání očí, plic, trávicího a urogenitálního traktu. Předávkování vitamínem A (hypervitaminóza) je pro organismus také nebezpečné, i když může nastat až po dlouhodobém překračování doporučené denní dávky. K projevům intoxikace patří vypadávání vlasů, zvracení, průjem, špatné vidění, ale i poruchy reprodukce (teratogenní účinky). Naopak podávání β -karotenu je z tohoto hlediska považováno za zcela bezpečné.

Metabolismus vitamínu A

Retinol se v potravě nevyskytuje ve volné formě, která je chemicky nestálá, nýbrž ve formě esterů s vyššími mastnými kyselinami, nejčastěji jako retinyl palmitát. Ve vitaminových přípravcích se naopak retinol nachází ve formě acetátu. Vstřebávání vitamínu A probíhá v tenkém střevě a je závislé na množství tuků, proteinů a žlučových kyselin přítomných v trávicím traktu. Estery rozpuštěné v tucích z potravy jsou emulgovány žlučí a následně ve střevní stěně hydrolyzovány na retinol. Po průchodu střevní stěnou je většina retinolu zpět přeměněna na estery s mastnými kyselinami, které jsou uzavřeny do chylomikronů v lymfě. Z lymfatického systému se dostávají jednak do krevního oběhu, ale také do jater, kde jsou uloženy v adipocytech a slouží jako rezervoár vitamínu A. Mimo jaterní buňky (v plazmě) se retinol vyskytuje vázaný na specifickou bílkovinu RBP (Retinol Binding Protein). Fyziologické hladiny retinolu se u dospělých jedinců pohybují v rozmezí 0,83 – 2,27 $\mu\text{mol/l}$. [41]

Retinol a retinal jsou působením dehydrogenáz a reduktáz přítomných ve tkáních přeměňovány navzájem, jedná se tedy o obousměrný a vratný proces. Malá část retinalu však může být oxidována na kyselinu retinovou, což je naopak reakce nevratná. [41,43]

Obr. 13 Metabolismus vitaminu A



Zdroj: [42]

Terapeutické využití vitaminu A

Z rozmanitých biologických funkcí vitaminu A v organismu vyplývá velký potenciál a praktické využití retinoidů v různých medicínských oborech, především v dermatologii a onkologii.

Tretinoin (kyselina all-trans retinová - ATRA) a isotretinoin (13-cis-retinová kyselina) se používají k léčbě akné či jiných dermatologických potíží. Další analoga (etretinat, acitretin) jsou aplikovány u psoriázy. [44,45]

V současné době je pozornost lékařů zaměřena na využití retinoidů v prevenci a terapii různých onkologických onemocnění vyplývajících z antiproliferační aktivity retinoidů či jejich schopnosti regulovat diferenciaci a apoptózu buněk. Například výše zmiňovaný tretinoin se také používá v léčbě akutní promyelocytární leukémie (APL).

Kyselina retinová totiž umí obnovit funkci leukemických buněk a přeměnit je zpět na buňky zdravé. Klinické studie ukazují, že chemoterapie v kombinaci s podáním kyseliny retinové umožňuje definitivní vyléčení APL až u 80 % případů. [46]

V současnosti se indikace retinoidů rozšiřuje na další druhy nádorů, zvláště rakoviny prostaty, pankreatu, mozku či (zatím experimentálně) na rakovinu prsu. Jejich terapeutické využití je však značně limitováno vysokou toxicitou či vznikem rezistence. Vývoj receptor-selektivních retinoidů a prohloubení znalostí o mechanismu působení těchto látek v budoucnu jistě povede k dalšímu rozšíření aplikace retinoidů v terapii různých forem rakoviny. [47]

3.6.2. Vitamin E⁹

Vitamin E je dalším zástupcem vitaminů rozpustných v tucích. Toto označení opět představuje skupinu více látek zahrnující α -, β -, γ -, δ -tokoferol a α -, β -, γ -, δ -tokotrienol. Struktura společná všem formám vitaminu E sestává z chromanolového kruhu, na který je navázaný hydrofóbní isoprenoidní řetězec tvořený 16 atomy uhlíku. Na chromanolovém kruhu se nachází jedna až tři methylové skupiny, podle jejichž počtu a polohy se rozlišují α -, β -, γ -, δ -molekuly. Fytylový (isoprenoidní) řetězec je u tokoferolů nasycený a u tokotrienolů nenasycený – obsahuje tři dvojně vazby. Struktura všech látek patřící do skupiny vitaminu E je znázorněna na obrázku (obr. 14). [41]

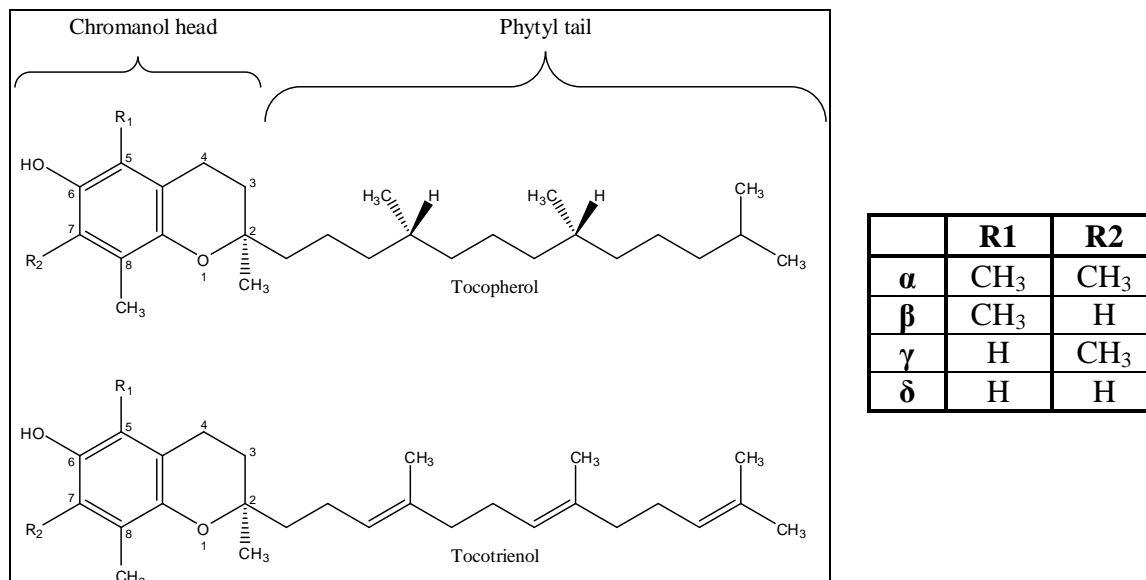
Vitamin E byl objeven Evansem a Bishopem v roce 1922 při sledování souvislosti mezi plodností a výživou, kdy byla u laboratorních krys zjištěna nezbytnost tohoto vitaminu pro jejich úspěšnou reprodukci. Poprvé byl vitamin E izolován v roce 1936 a o dva roky později byla identifikována jeho chemická struktura. Funkce vitaminu E v lidském organismu nebyla řádně objasněna až do 60. let minulého století. [41]

V molekule tokoferolů/ tokotrienolů se nacházejí tři centra asymetrie: C2 uhlík chromanolového kruhu a C4' a C8' uhlíky na fytylovém konci, z čehož teoreticky vyplývá možnost vzniku osmi stereoizomerů u každé z osmi látek vitaminu E. V přírodě se však vyskytuje nejčastěji R, R, R- forma. Nevyšší biologickou aktivitou se vyznačuje R, R, R- α -tokoferol, dříve označovaný jako D- α -tokoferol. Synteticky připravený α -tokoferol naopak obsahuje všechny stereoizomerní formy ve stejném poměru. Ve vitaminových přípravcích se většinou setkáme s estery vitaminu E (nejčastěji tokoferol

⁹ Kapitola 3.6.2. byla kromě uvedených odkazů vypracována ze zdrojů [48-50]

acetátem). Hlavním přírodním zdrojem vitaminu E jsou rostlinné oleje, čerstvá listová zelenina, vaječný žloutek, oříšky, obilné klíčky a mák.

Obr. 14 Struktura vitaminu E



Biologický význam vitaminu E

Vitamin E je účinný antioxidant hrající zásadní roli v ochraně buněčných membrán a plazmových lipoproteinů před oxidativním poškozením vyvolaným působením volných radikálů. Volné radikály obsahují ve své molekule nepárový elektron, díky němuž velmi ochotně reagují s nenasycenými mastnými kyselinami, proteiny, uhlovodíky či DNA. Úloha vitaminu E v ochraně membrán erytrocytů před oxidačním stresem tak představuje v současné době jednu z hlavních a prokázaných fyziologických funkcí tohoto vitaminu.

Biologická dostupnost a aktivita jednotlivých forem vitaminu E se liší. Nejaktivnější je přirozený R, R, R- α -tokoferol charakterizovaný biologickou aktivitou 1,49 IU/mg (IU = mezinárodní jednotka). O trochu menší aktivitu už vykazuje racemická směs α -tokoferolu a tokotrienoly vykazují aktivitu už pouze 0,45 IU/mg. Přestože množství γ -tokoferolu v potravě je vyšší než množství α -tokoferolu, plazmové koncentrace γ -tokoferolu tvoří pouze asi 10 % koncentrační hladiny α -tokoferolu. Z toho vyplývá, že α -tokoferol je nejhojnější forma vitaminu E v plazmě.

Metabolismus vitamínu E

Absorpce vitamínu E z potravy probíhající v tenkém střevě je úzce spojena s absorpcí lipidů. Předpokladem je tedy neporušený proces trávení tuků a také přítomnost látek tukové povahy (např. nasycené mastné kyseliny), které usnadňují vznik micel, jejichž prostřednictvím je vitamin E absorbován do buněk mukózy tenkého střeva. Vitamin E je pak zabudován do chylomikronů a v této formě vstupuje přes lymfatický systém do oběhu a dále do jater. Část vitamínu E je přenesena do svalů a tukové tkáně. Na rozdíl od jiných v tucích rozpustných vitaminů, nemá tento vitamin specifický transportní plazmatický protein, ale je transportován na lipoproteinech krevní plazmy (LDL, HDL, VLDL).

Ne všechny formy vitamínu E jsou však stejnou měrou zabudovávány do lipoproteinů krevní plazmy. Naopak na této úrovni dochází k určité „diskriminaci“ jednotlivých forem vitamínu E. Preferován je především R,R,R- α -tokoferol, zatímco ostatní stereoizomery a většina γ -tokoferolu jsou vyloučeny do žluče. Z toho také vyplývá vyšší biologická dostupnost a účinnost právě D-formy α -tokoferolu. Přirozená hladina α -tokoferolu se pohybuje kolem 25 $\mu\text{mol/l}$ a u γ - a δ -tokoferolů přibližně 3 $\mu\text{mol/l}$. V potravě se hladiny jednotlivých forem vitamínu E liší, avšak ve smíšené stravě převažuje většinou α - a γ -tokoferol. [39]

Vzhledem k protektivní funkci buněčných membrán je vitamin E obsažen ve všech tkáních. Nejvyšší koncentrace pak byly stanoveny v tukové tkáni a v játrech.

Terapeutické využití vitamínu E

Potenciální využití vitamínu E v terapii různých onemocnění bývá spojováno především s jeho antioxidačními schopnostmi. V současné době se vědecký zájem obrací především na objasnění vztahu mezi zvýšeným podáním vitamínu E a jeho vlivu na prevenci či léčbu onemocnění spojených s oxidačním stresem (kardiovaskulární choroby, rakovina, Alzheimerova choroba). Přestože bylo provedeno mnoho klinických studií věnujících se prevenci kardiovaskulárních onemocnění prostřednictvím podávání vitamínu E, výsledky jsou nepřesvědčivé a rozporuplné. Podobně v případě studií hledající souvislost mezi hladinami vitamínu E a vznikem rakoviny byla snížená incidence rakoviny prokázána pouze ve dvou studiích. Z výše zmíněného vyplývá, že ačkoliv je samotný vitamin E esenciální látkou pro mnoho pochodů v organismu, jeho terapeutické využití stále vyvolává mnoho otázek a je předmětem vědeckých studií. Pomocí sledování hladin vitamínu E v lidském séru u různých pacientů je však možné

hodnotit oxidační stres jejich organismu, což může být nápomocné pro stanovení konečné diagnózy i pro sledování terapeutického postupu. [51,52]

3.6.3. Význam stanovení vitaminů A a E v biologickém materiálu¹⁰

Podání chemoterapeutik při terapii rakoviny je spojené se vznikem oxidačního stresu a narušení antioxidační rovnováhy v organismu. Sledování sérových hladin některých látek, například retinolu, α -tokoferolu a γ -tokoferolu, umožňuje monitorovat tento oxidační stres u pacientů podstupujících chemoterapii či radioterapii. Dále může přispět k objasnění souvislostí mezi vznikem rakoviny, její léčbou pomocí různých cytotoxických látek a změnami hladin těchto vitaminů. Například u pacientek s rakovinou prsu a vaječníků léčených kombinací paclitaxelu s carboplatinou pozitivně reagujících na chemoterapeutickou léčbu bez projevů toxicity byly zjištěny zvýšené hladiny α -tokoferolu a retinolu. Nižší hladiny α -tokoferolu byly naopak sledovány u pacientů, kde se projevila toxicita terapie. [53]

Podobně lze prostřednictvím sledování hladiny vitaminu A v séru odhalit poškození střevní sliznice po chemo- a radioterapii. Na tomto principu spočívá test absorpce vitaminu A, kdy je u onkologických pacientů sledováno, zda dochází k malabsorpci vitaminu A způsobené funkční změnou intestinální sliznice, a zdali tento jev může mít vliv na nutriční stav pacienta. Součástí testu je ranní odběr séra (vzorek 1) následovaný podáním dávky 360 000 IU vitaminu A. Po pěti hodinách je znovu odebráno sérum (vzorek 2). Test je vyhodnocen na základě srovnání hladin retinolu a retinyl esterů v obou vzorcích.

Metody analýzy

V literatuře se nejčastěji setkáme s metodami pro současné stanovení dvou látek - retinolu a α -tokoferolu. Mnohdy bývají mezi analyty zařazeny i β - a γ -tokoferol, které však na reverzní fázi nelze separovat, proto se většinou hodnotí jako suma obou látek. Vedle retinolu bývají stanovovány i jeho metabolity - retinyl palmitát a retinyl stearát, či retinyl acetát – forma přítomná ve vitaminových přípravcích. Karoteny, xanthiny a lykopen jsou přírodní látky s významnou antioxidační aktivitou úzce související s

¹⁰ Kapitola 3.6.3. byla kromě uvedených odkazů vypracována ze zdrojů [23,39,40,41]

metabolismem retinolu (ze dvou molekul β -karotenu vzniká jedna molekula retinolu), a proto bývají také předmětem analýzy společně s vitaminy A a E.

Metodou volby pro analýzu vitaminů A a E je stanovení pomocí kapalinové chromatografie na reverzních stacionárních fázích. Jako mobilní fáze se používá většinou methanol, méně často pak ethanol, acetonitril či jejich kombinace, anebo se přidá malý podíl nepolárního rozpouštědla (chloroform, butanol, hexan, tetrahydrofuran, ethyl acetát). Aplikace normální chromatografie se také objevuje v publikovaných pracích. Umožňuje lepší separaci strukturně podobných látek (jednotlivé tokoferoly či izomery kyseliny retinové). Nepříjemností normálního módu je použití organických rozpouštědel (dichlormethan, hexan), dále nestabilita silikagelové fáze či citlivost systému na stopy vlhkosti.

Chromatografie látek vitamínu E na normálních (silikagelových) stacionárních fázích poskytuje rozdělení všech čtyř tokoferolů a tokotrienolů spolu s lepším rozlišením β - a γ - izomerů. Kromě toho nevyžaduje před stanovením odstranění triacylglycerolů z matrice, což se s výhodou využívá v potravinové analýze. Pořadí eluce jednotlivých látek vyplývá z jejich polaritě a je dáno vznikem vodíkových interakcí mezi fenolickými OH skupinami tokoferolů/ tokotrienolů a silanolovými skupinami na povrchu silikagelu. α -tokoferol obsahuje tři methylové skupiny, a proto je jako nejméně polární látka eluován první, následovaný β -, γ - a δ - tokoferolem. Přítomnost tří dvojných vazeb ve fytylovém řetězci tokotrienolů zvyšuje jejich polaritu, a proto jsou tyto látky vymyty vždy za odpovídajícími tokoferoly. I přes tyto výhody, při současném stanovení tokoferolů, retinoidů a případně i karotenoidů je preferována reverzní chromatografie.

Na oktadecyl-silikagelových fázích jsou tokoferoly/ tokotrienoly vymývány z kolony v opačném pořadí než v normálním módu. Nejvíce je zadržen α -tokoferol, nejméně pak δ - tokoferol. Tokotrienoly elují před odpovídajícími tokoferoly. β - a γ - tokoferol/ tokotrienol většinou nelze na reverzní fázi separovat.

V případě separace retinoidů je situace podobná. Popsané a prakticky používané metody pracují jak v normálním tak v reverzním módu. Normální stacionární fáze umožňují separaci geometrických izomerů, zatímco v reverzním systému je toto rozlišení obtížné. Vzhledem k rozdílné polaritě retinolu a jeho esterů s mastnými kyselinami (palmitát, stearát, oleát) je pro tato stanovení doporučováno provedení chromatografie na reverzní fázi s použitím gradientové eluce.

Pro detekci studovaných vitaminů lze využít různé detekční techniky. Tradiční přístup představuje UV spektrofotometrická detekce. Kvůli rozdílné absorpční schopnosti těchto látek není detekce při jedné vlnové délce možná, avšak použitím moderní instrumentace s programovatelnou vlnovou délkou v čase analýzy či s možností záznamu absorpce při dvou vlnových délkách současně je možné nastavit vhodné parametry na základě spektrálních vlastností daných látek. Pro dosažení vysoké citlivosti metody jsou jednotlivé analyty detekovány při jejich absorpčních maximech – 325-330 nm pro retinol a 290-295 nm pro α -tokoferol. V současné době se s výhodou používají vysoce citlivé detektory diodového pole (DAD, PDA), které umožňují v jednom okamžiku proměření celého spektra. Mezi alternativní detekční techniky patří elektrochemická či fluorescenční detekce, které v praxi nejsou tolik využívány, avšak poskytují vysoce citlivé a selektivní analýzy.

Spojení HPLC s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (MS) představuje moderní trend poslední doby. Ačkoliv HPLC-MS poskytuje bohaté informace o analyzovaných látkách, aplikace této techniky na biologické vzorky je vzhledem ke složitosti této matrice docela obtížná, a i proto je stále vděčným předmětem dalšího výzkumu. Pro stanovení vitaminů A a E je nejčastěji využita chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) či ionizace elektrosprejem (ESI). Například práce R. Andreoli et al.[54] popisuje jednoduchou metodu pro současné stanovení retinolu, α -tokoferolu a β -karotenu v lidském séru pomocí HPLC-MS-MS využívající APCI v pozitivním módu. Na C8 chromatografické koloně bylo pomocí mobilní fáze sestávající z methanolu a dichlormethanu (95:5, v/v) v izokratickém módu dosaženo separace všech tří látek během 6,5 minut – retinol eluoval již v 1,5 minutě a retenční čas tokoferolu byl přibližně 3 minuty. Tato rychlá metoda vyniká také ve vysoké citlivosti dosahující jednotek nmol a v selektivitě vůči ostatním složkám analyzovaného séra, která je daná především díky využití kolizní reakce, kdy je v určitém okamžiku sledován konkrétní přechod sledovaného iontu na iont dceřinný.

Většina dalších prací věnujících se současnému stanovení vitaminů A a E v lidském séru či plazmě však využívá HPLC na oktadecylsilikagelových (C18) stacionárních fázích v kombinaci s UV detekcí, nejčastěji s použitím DAD. V případě separace pouze těchto dvou vitaminů je aplikována většinou izokratická eluce pomocí mobilní fáze složené buď z čistého methanolu [55] nebo směsi methanolu s méně polárními rozpouštědly (acetonitril, hexan, tetrahydrofuran) [56-58]. Zatímco starší práce uvádějí delší dobu analýzy (až 16 min) [56], s využitím modernější instrumentace

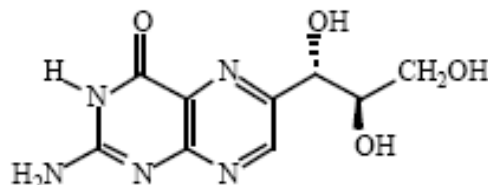
a dokonalejších kolon je v nedávných pracích dosaženo veľmi rýchlych analýz (3 min) [58]. Mnoho prací se věnuje analýze rozmanitější skupiny látek, kdy vedle vitaminů A a E jsou stanovovány i karotenoidy či vitamin D. Separace takových směsí analytů pak vyžaduje použití gradientové eluce [59-62].

Práce týmu D. Siluk [63] a G. Taibi [64] uvádějí využití fluorimetrické detekce při stanovení retinolu, α -, γ -, ev. δ - tokoferolu v lidském séru a plazmě. Obě publikované metody byly využity pro klinické studie na velkém souboru pacientů. V novější publikaci z r. 2007 bylo dosaženo vysoké citlivosti stanovení (70 nmol/l pro retinol, 50 a 250 nmol/l pro γ - a δ -tokoferol a 1,16 μ mol/l pro α -tokoferol).

Z uvedených dat je patrné, že význam i sledovanost výše zmíněných látek je velká a každý z nových způsobů stanovení nachází své uplatnění nejen v klinickém výzkumu, ale i v klinické praxi.

3.6.4. Neopterin¹¹

Neopterin byl objeven v roce 1963, kdy se jej podařilo izolovat ze včelích larev včel dělnic. Chemicky se jedná o 2-Amino-4-hydroxy-6-(D-erythro-1', 2', 3'-trihydroxypropyl)-pteridine, jenž patří do skupiny nekonjugovaných pteridinů, která je biosynteticky odvozená od guanosin trifosfátu (GTP). Enzymatickým štěpením GTP vzniká nejprve 7,8-dihydroneopterin trifosfát, ze kterého se pomocí dalších enzymů tvoří 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, 7,8-dihydroneopterin či neopterin.

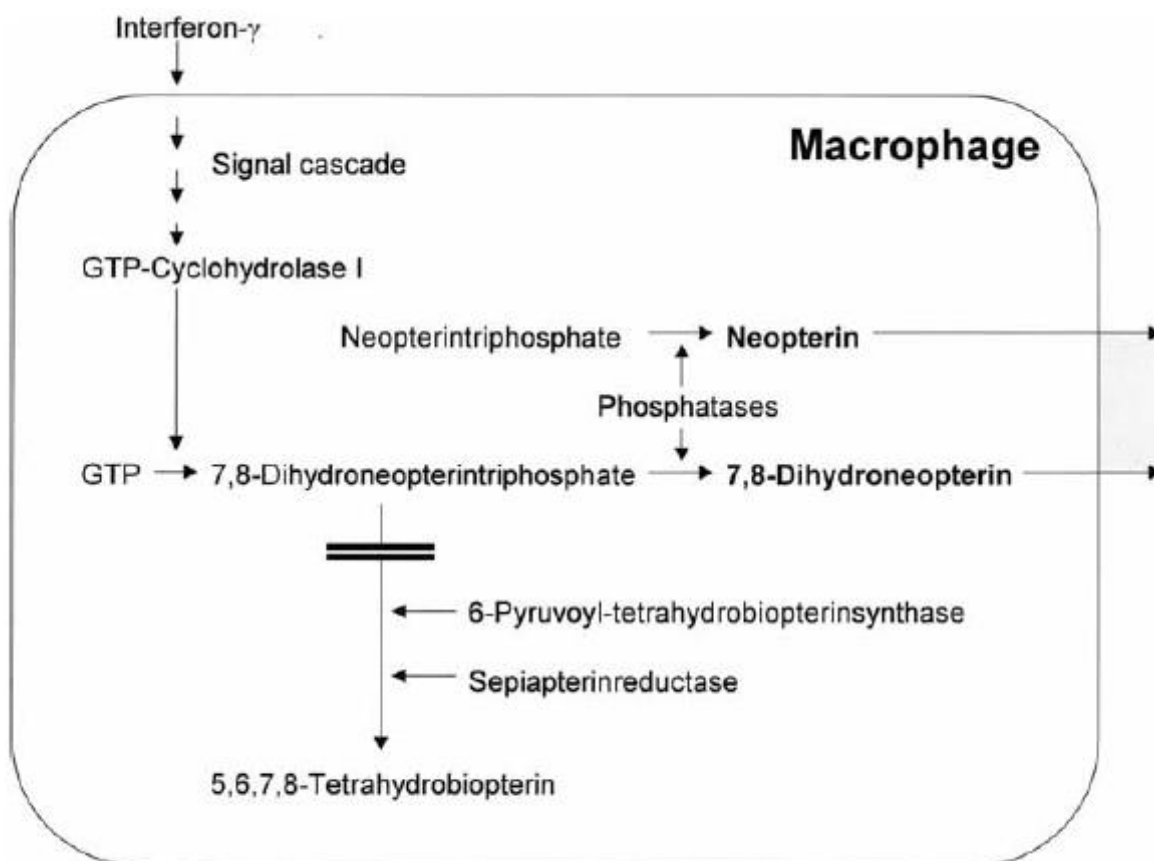


Tetrahydrobiopterin je nezbytným kofaktorem celé řady monooxygenáz aromatických aminokyselin a také je odpovědný za konverzi argininu na citrulin a oxid dusnatý. Při aktivaci enzymu GTP cyklohydrolázy I interferonem- γ produkuje většina buněk jako jsou fibroblasty a endoteliální buňky převážně tetrahydrobiopterin a pouze malé množství neopterinu a jeho derivátů. Naopak monocyty-makrofágy u lidí a primátů po aktivaci GTP cyklohydrolázy I vytváří větší množství 7,8-dihydroneopterin fosfátu, který je kvůli relativnímu nedostatku 6-pyruvoyl-tetrahydropterin syntázy přeměňován na 7,8-dihydroneopterin a neopterin. Díky tomu neopterin představuje

¹¹ Kapitola 3.6.4. byla kromě uvedených odkazů vypracována ze zdrojů [77,81,82]

užitečný a důležitý parametr monitorování aktivace imunitního systému, který doprovází řadu onemocnění.

Obr. 15 Biosyntéza neopterinu a jeho derivátů v lidském monocytu/makrofágu



Zdroj: [81]

Biologický význam neopterinu a jeho derivátů

Hlavní biochemická a fyziologická funkce neopterinu a jeho derivátů není doposud zcela objasněna. Při aktivaci buněčné imunity se zvyšuje koncentrace Th1 buněk, které produkují interferon- γ . Dochází k uvolňování prozánětlivých cytokinů a současně se u lidských monocytů-makrofágů zvyšuje kapacita sekrece ROS. Přitom zde existuje signifikantní vztah mezi množstvím uvolněného neopterinu a schopností sekrece ROS. Neopterin tak může sloužit nejen jako indikátor oxidačního stresu organismu způsobenou aktivací imunitního systému, ale též sám k oxidačnímu stresu přispívá, a to tím, že zesiluje účinky oxidativních sloučenin jako je např. peroxid vodíku.[65]

Naopak některé redukované formy pteridinových derivátů jako 7,8-dihydroneopterin a 5,6,7,8-tetrahydroneopterin jsou považovány za antioxidanty a byly

obecně označeny za silné „vychytávače“ volných radikálových částic (ROS) *in vitro* i *in vivo*. [66-68]

Oxidační stres též významně ovlivňuje různé redoxní systémy a je úzce spojen s iniciací apoptózy či genovou expresí cytokinů jako je TNF α . Neopterin a jeho deriváty jsou považovány za spouštěče těchto procesů a hrají tedy důležitou roli i v těchto biochemických pochodech.

Vzhledem k výše zmíněným vlastnostem může sledování koncentračních hladin neopterinu v séru a v moči přispět k diagnostice i prognóze některých chorob nebo lze s jeho pomocí sledovat oxidační stres organismu. Například u akutních virových onemocnění jako jsou chřipka, spalničky, zarděnky, příušnice, atd. se koncentrační hladiny neopterinu v tělních tekutinách významně zvyšují. A to mnohem dříve než si organismus začne vytvářet specifické protilátky. Jakmile se imunitní systém úspěšně vypořádá s infekcí a koncentrace specifických protilátek (např. IgG) vzroste, hladina neopterinu klesne na normální hodnoty. Ovšem v případě chronických virových infekcí jako je např. HIV, koncentrace neopterinu sice po určité době klesne, ale ne až do normálních hodnot. Produkce neopterinu zůstává zvýšená po celou dobu prvotní fáze nákazy, během které se většinou neobjevují žádné příznaky. A tento fakt má již značný prognostický význam: čím vyšší je koncentrace neopterinu v séru nebo v moči, tím silnější bude progresse AIDS. Sledování hladin neopterinu tak může přispět k prognóze choroby podobně jako další prediktivní markery jako jsou buňky CD4+ a HIV-1 RNA.

Podobně je tomu i u nádorových onemocnění. Povrch nádorových buněk je totiž změněn, následkem čehož může dojít k aktivaci systému specifické buněčné imunity a tedy i ke zvýšené produkci neopterinu. Tento jev zvýšené koncentrace neopterinu v séru či v moči však závisí na typu, druhu i stádiu rakovinového onemocnění. Například u hematologické neoplazie se vyskytuje asi z 90%, zatímco u karcinomu prsu je pozorován pouze u cca 20% pacientů. Z tohoto důvodu je sledování hladin neopterinu pro diagnostiku nevhodné. Naproti tomu prognostický význam je zcela nezpochybnitelný. Monitorování hladin neopterinu v séru či v moči pomáhá předvídat, nejen jak silný bude průběh onemocnění a jakou má pacient šanci na přežití, ale může také včas odhalit relaps nádorového onemocnění v post-terapeutické fázi.

Podobné vztahy byly pozorovány také u některých neurologických, kardiovaskulárních a autoimunitních chorob. Sledování produkce neopterinu tak může přispět k lepšímu porozumění patogeneze různých onemocnění.

Stanovení neopterinu v moči a v séru

Neopterin (oxidovaná forma) a 7,8-dihydroneopterin (redukována forma) jsou nízkomolekulární látky ($M_w = 253$ a 255 g/mol), které jsou uvolňovány v relativně stálém množství. V literatuře je uváděn poměr oxidované formy neopterinu a celkového neopterinu (oxidovaná plus redukována forma). Tento poměr je 1:3 v moči a arteriální krvi a 1:2 v séru získaného z venózní krve. Obě formy neopterinu absorbují v UV oblasti, ovšem absorpční spektra stejně jako chromatografické chování neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu jsou velmi podobné. Proto lze spektrofotometricky stanovit pouze celkový neopterin. [69] Vzhledem k velké citlivosti neopterinu na denní světlo a ke značné nestabilitě jeho redukována formy je spektrofotometrické stanovení neopterinu pro klinickou praxi nevhodné.[70] Mnohem častější a vhodnější metodou pro stanovení neopterinu je metoda HPLC s fluorimetrickou detekcí.[71-76]

Jedno z prvních měření neopterinu v moči u pacientů s malignitami a virovými infekcemi pomocí HPLC bez úpravy vzorků moče provedl Wachter a kol. v roce 1979. Tuto metodu v roce 1982 potom pro klinické aplikace dále zpracovali Hausen a Fuchs. Od této doby zůstává tato metoda až na drobné modifikace téměř beze změn. Stanovení se provádí v izokratickém módu na kolonách s reverzní fází C18. Mobilní fází je většinou fosfátový pufr o pH 6,4 a průtok je uváděn v rozsahu 0,8 – 1,5 ml/min. Pro fluorimetrické stanovení se nejčastěji používají vlnové délky $\lambda_{ex.353}$ a $\lambda_{em.438}$ nm.

Při stanovování neopterinu v moči se musí brát v úvahu rozdílné hustoty moči, proto je koncentrace neopterinu v moči vyjadřována v $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu. Měření kreatininu se provádí současně se stanovením neopterinu rovněž pomocí HPLC, ale s UV detekcí při 235 nm.

Modifikovanou verzi pro stanovení neopterinu v séru vypracoval Werner a kol. [71]. Pro analýzu velkých sérií vzorků byly vyvinuty metody využívající techniku radioimmunoassay (RIA) [78] a enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). V současnosti jsou obě tyto metody již docela rozšířené a komerčně snadno dostupné. [79,80] Nicméně chromatografické stanovení je dosud považováno za standardní a referenční metodu používanou především ve výzkumných laboratořích.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části této disertační práce je uveden krátký přehled publikovaných prací včetně jejich stručného komentáře. První kapitola se zabývá analytickou tematikou, je věnována publikacím s prvním autorstvím a metodě pro stanovení neopterinu a kreatininu. Druhá kapitola pak uvádí souhrn biomedicínských prací a studií, k jejichž vzniku nově vyvinuté analytické metody nemalou měrou přispěly.

4.1. Přehled prací s analytickou tematikou

4.1.1. Optimalizace a validace HPLC metody pro současné stanovení vitamínu A a E v lidském séru s využitím monolitické kolony a detekce diodového pole

Úvod

Předmětem studia byl vývoj vhodné analytické metody pro současné stanovení retinolu a α -tokoferolu v lidském séru se zaměřením na rychlost a jednoduchost analytického postupu. Pozornost byla soustředěna na využití HPLC a monolitické kolony, která díky svým vlastnostem umožňuje vysoké průtoky mobilní fáze a dosažení velmi krátkých časů analýz. V klinické laboratoři, kde se rutinně zpracovává velké množství biologických vzorků, přináší rychlá a jednoduchá metoda značnou časovou úsporu a podstatné zvýšení pracovní kapacity.

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, publikací popisujících analytické postupy pro stanovení vitamínů A a E v biologickém materiálu existuje mnoho. Metodu volby představuje HPLC se zapojením částicových sorbentů na bázi C18. Přestože byl v posledních letech zaznamenán velký zájem o monolitické materiály včetně monolitních sorbentů aplikovaných v oblasti analytické chemie, využití monolitických kolon se zatím nejeví zdaleka jako rutinní, což dokládá poměrně malý počet prací publikovaných na toto téma. Studie zaměřené na monolitické kolony se věnují spíše technologii jejich přípravy, testování a fyzikálním a chromatografickým vlastnostem. Několik článků se věnuje využití monolitních kolon v analýze léčiv a jejich metabolitů, polutantů či potravinářských aditiv, ale také chirálním či bioanalytickým separacím. Předkládaná práce představuje doposud jedinou publikovanou aplikaci monolitických kolon pro

analýzu vitaminů A a E. Výhodné vlastnosti monolitické kolony jsou demonstrovány prostřednictvím srovnání téže analýzy uskutečněné na HPLC systému s částicovou C18 kolonou.

Výsledky a diskuse

Podmínky analýzy

Pro separaci analyzovaných látek byla využita monolitní kolona C18 (100 x 4.6 mm).

Optimální chromatografické podmínky zahrnovaly:

- Mobilní fáze: 100% MeOH
- Průtok mobilní fáze: 2,5 ml/min
- Zpětný tlak na koloně: 3,3 MPa (480 psi)
- Teplota kolony: 25°C
- Objem nástřiku: 50 µl
- DAD detekce: retinol – 325 nm
α-tokoferol – 290 nm
- Celkový čas analýzy: 1,8 min

Původní metoda aplikovaná na analýzu studovaných látek využívající částicovou kolonu C18 (150 x 4.6 mm; velikost částic 5 µm) je charakterizovaná následujícími podmínkami:

- Průtok mobilní fáze: 1,5 ml/min
- Zpětný tlak na koloně: 6,5 MPa (950 psi)
- Objem nástřiku: 100 µl
- Celkový čas analýzy: 8 min

Ostatní parametry jsou totožné s výše zmíněnou metodou.

Obě metody byly využity pro analýzu vzorků krve pacientů léčených na geronto-metabolické klinice FN HK. Centrifugací získané vzorky séra byly zpracovány pomocí LLE, která sestávala z deproteinace ethanolem a následného vytřepání do hexanu. Vzorek určený pro nástřik do systému HPLC byl získán odpařením hexanu do sucha a rozpuštěním odparku v mobilní fázi.

Validace metody

V rámci validace vyvinutých metod (s monolitní a částicovou kolonou) byly hodnoceny následující parametry:

- přesnost – příprava a analýza souboru 10 vzorků, stanovení opakovatelnosti retenčního času a plochy píku daného analytu vyjádřené jako relativní směrodatná odchylka
- správnost – pomocí kontrolních setů Bio-Rad a ClinCheck
- výtěžnost – metoda standardního přídávku
- linearita – 6 koncentračních úrovní, rozsah koncentrací zvolen dle reálných hladin retinolu a α -tokoferolu v séru
- citlivost – (limit detekce-LOD a limit kvantifikace-LOQ) – LOD odpovídá koncentraci, při níž je poměr signálu k šumu větší než 3, u LOQ větší než 10
- selektivita – v séru mohou být přítomny i ostatní tokoferoly (β -, γ -, δ -). Dostatečné rozlišení píků všech tokoferolů prokazuje selektivitu chromatografického systému. β - a γ -tokoferol mají v daném systému shodné eluční profily, proto nejsou navzájem separovány.

Na základě výsledků validace lze konstatovat, že obě vyvinuté metody je možné použít jako vhodné validní postupy pro hodnocení hladin retinolu a α -tokoferolu ve vzorcích séra.

Porovnání kolon

Zatímco výsledky validace se u obou kolon příliš neliší, hlavní rozdíl mezi oběma systémy spočívá v retenčních časech hodnocených látek, zpětném tlaku na koloně a celkové spotřebě mobilní fáze. Doba analýzy u monolitní kolony je čtyřikrát kratší než v případě částicové kolony. S tím souvisí i 2,5krát nižší spotřeba mobilní fáze, a to i přesto, že průtoková rychlost je při použití monolitní kolony téměř dvojnásobná. Srovnání je zajímavé i z hlediska zpětného tlaku a životnosti použitých kolon. U částicové kolony se po analýze velkého počtu biologických vzorků zvýší zpětný tlak z počátečních 950 psi na dvojnásobek (cca 2000 psi) a navíc dochází k prodlužování retenčních časů a zhoršení tvaru píků hodnocených analytů. Naopak u monolitní kolony je počáteční tlak poloviční (480 psi) a po cca 1000 analýzách se zvýší na stále přijatelných 900 psi, avšak retenční charakteristiky obou analytů zůstávají neměnné.

Diskuse

Pokud je mi známo, doposud nebyl ve vědecké literatuře popsán jiný analytický postup pro stanovení těchto látek využívající monolitickou kolonu. Vyvinutá metoda však posloužila pro srovnání s novými přístupy v kapalinové chromatografii, konkrétně s využitím UPLC pro analýzu studovaných látek.[83] Ačkoliv z pohledu spotřeby mobilní fáze nemůže monolitní kolona systému UPLC konkurovat (průtok MF s UPLC = 0,48 ml/min), tak z hlediska rychlosti a citlivosti stanovení je monolitická kolona zcela srovnatelná s UPLC. Navíc, vezmeme-li v úvahu pořizovací náklady na systém UPLC, je použití monolitní kolony jednoznačně ekonomičtější i přes vyšší spotřebu rozpouštědel.

Závěr

Pro analýzu retinolu a α -tokoferolu v séru byla vyvinuta a validována nová jednoduchá a rychlá HPLC metoda založená na použití monolitní kolony. Výhody nové metody byly demonstrovány pomocí srovnání s klasickou částicovou kolonou. Vyvinutá metoda byla využita pro hodnocení oxidačního stresu u pacientek s rakovinou prsu léčených inhibitory aromatázy. Díky rychlosti, citlivosti a jednoduchosti stanovení umožňuje tato metoda analýzu velkého počtu vzorků, a proto je s výhodou aplikovatelná v oblasti klinického monitorování hladin studovaných vitaminů.

Popsaná metoda včetně praktického využití byla publikována v časopise *Analytica Chimica Acta* (viz. Příloha 1)

4.1.2. Vývoj a validace HPLC metody pro současné stanovení α -tokoferolu, retinolu a retinyl esterů v lidském séru pomocí monolitní kolony

Úvod

Metoda byla vyvinuta za účelem sledování vedlejších nežádoucích účinků chemoterapie či radioterapie u onkologických pacientů. Pokroky v úspěšnosti farmakologické léčby maligních nádorů během posledních desetiletí jsou bohužel vyváženy značnou toxicitou terapeutických postupů, která se projevuje nejčastěji gastrointestinálními poruchami a narušením antioxidační rovnováhy organismu. Hodnocení gastrointestinální toxicity je dodnes většinou založeno na subjektivních potížích popsaných pacientem. Z tohoto pohledu se možnost objektivního posouzení míry gastrointestinální toxicity prostřednictvím spolehlivých laboratorních metod jeví jako nezbytný a důležitý nástroj pro hodnocení nežádoucích účinků protirakovinné léčby.

Vitamin A se vstřebává v tenkém střevě. Následné zvýšení sérových hladin retinyl esterů po jednorázovém podání vitamínu A vypovídá o funkci tenkého střeva. Vitamin E (α -tokoferol) souvisí s rovnováhou antioxidačních procesů v organismu, které také mohou být v důsledku protirakovinné léčby narušeny. Sledování hladin těchto látek pomocí vhodných analytických metod tak umožňuje objektivně a kvantitativně hodnotit míru negativního vlivu chemo- a radioterapie u léčených pacientů.

Popsaná metoda zahrnuje stanovení retinolu, α -tokoferolu, retinyl palmitátu a retinyl stearátu během jedné analýzy ve vzorcích lidského séra pomocí HPLC na monolitní koloně.

Výsledky a diskuse

Podmínky analýzy

Pro separaci analyzovaných látek byla využita monolitní kolona C18 v módu gradientové eluce. Optimální chromatografické podmínky zahrnovaly:

- Mobilní fáze: 0 – 2,1 min - 95% MeOH/ 5% H₂O (v/v)
2,1 – 4,9 min – 60% MeOH/ 40% 2-propanol (v/v)
- Průtok mobilní fáze: 3 ml/min
- Teplota kolony: 25°C

- Objem nástřiku: 20 μ l
- DAD detekce: retinol – 325 nm
 α - tokoferol – 295 nm
retinyl estery – 330 nm
- Celkový čas analýzy: 6 min

Vzorky séra byly zpracovány metodou LLE pomocí směsi hexanu s toluenem (8:2, v/v) a deproteinace ethanolom. Extrakce do organické fáze byla zopakována dvakrát. Po odpaření čistého extraktu se odparek rozpustil ve směsi n-hexanu a methanolu (1:3, v/v) a tento vzorek mohl být nastříknut do HPLC systému.

Validace metody

Validace metody sestávala z provedení testu vhodnosti systému a prověření jednotlivých validačních parametrů na základě doporučení mezinárodní konference pro harmonizaci (ICH guidelines):

- test vhodnosti systému – hodnocení parametrů popisujících separační vlastnosti chromatografického systému (počet teoretických pater, HETP, asymetrie píku a rozlišení
- přesnost - příprava a analýza souboru 10 vzorků, stanovení opakovatelnosti retenčního času a plochy píku daného analytu vyjádřené jako relativní směrodatná odchylka
- správnost – výtěžnost metody vyhodnocená na třech koncentračních úrovních, každá hladina analyzována třikrát s použitím metody standardního přídatku
- linearita – kalibrační křivka pro 6 koncentračních úrovní, rozsah koncentrací analyzovaných látek zvolen na základě reálných hladin v séru
- citlivost (LOD, LOQ) - LOD odpovídá koncentraci, při níž je poměr signálu k šumu větší než 5, LOQ je rovno desetinásobku hodnoty koncentrace odpovídající poměru signálu k šumu
- selektivita – demonstrována na základě hodnot rozlišení jednotlivých píků a separace stanovovaných analytů s možnými interferujícími látkami podobného charakteru (retinyl acetát, retinyl propionát)
- stabilita – stabilita zásobních a pracovních roztoků standardů byla testována při pokojové teplotě, 4°C a -25°C. Stabilita při -25°C je u retinolu

zaručena po dobu 6 měsíců, u retinyl esterů 1 měsíc. α -tokoferol byl skladován při 4°C, stabilita ověřena po dobu 6 měsíců.

Na základě výsledků validace lze konstatovat, že obě vyvinuté metody je možné použít jako vhodné a validní postupy pro hodnocení hladin retinolu a α -tokoferolu ve vzorcích séra.

Diskuse

Vyvinutá metoda byla ověřena na souboru onkologických pacientů před podáním léčby, pacientů léčených chemo- či radioterapií a na skupině zdravých kontrolních subjektů. U zdravých jedinců se po podání vitamínu A prokazatelně zvýšily hladiny retinyl esterů oproti stavu před podáním, kdy byly téměř pod limitem detekce. U retinolu bylo pozorováno jen mírné zvýšení koncentrace. V případě neléčených pacientů byly výsledky shodné se zdravou skupinou. Naopak u pacientů, kteří absolvovali chemo- či radioterapii, byly hladiny esterů retinolu po podání vitamínu A velmi nízké, prakticky totožné s koncentrací před podáním. Výsledky analýz tedy jednoznačně poukázaly na rozdíly ve vstřebání vitamínu A u zdravých jedinců, neléčených nemocných a pacientů po léčbě.

Závěr

Stanovení α -tokoferolu, retinolu a retinyl esterů představuje účinný nástroj pro monitorování toxicity protirakovinné léčby. Hlavní předností vyvinuté metody je současné stanovení všech analytů v poměrně krátkém čase, což lze s výhodou využít ve velkých klinických studiích pro hodnocení toxicity dnes běžně používaných chemoterapeutik či toxicity nových léčiv.

Vyvinutá metoda byla publikována v časopise Journal of Separation Science a je uvedena v Příloze 2.

4.1.3. Stanovení neopterinu a kreatininu

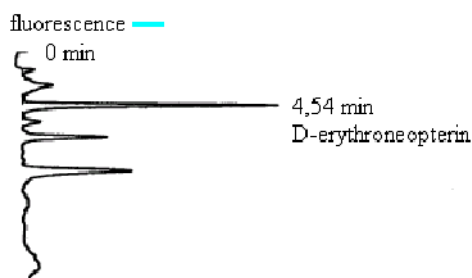
Jelikož značná část publikovaných prací byla věnována stanovení neopterinu a kreatininu, je nezbytné vysvětlit historii zavedení této metody. Námí používaná metoda byla převzata z původních prací profesorů Wachtera, Hausena a Fuchse [77,84], kterou dále pro potřeby laboratoře GMK optimalizovala a validovala Dr. Solichová.[85,86] Vzhledem k tomu, že v roce 2005 byl do laboratoře GMK zakoupen nový kapalinový chromatograf (Shimadzu, LC 20A Prominence), který nahradil doposud používaný starší přístroj HP 1084 A, bylo nutno převést stávající metodu na novou instrumentaci. Modernizace celé metody se tak stala další náplní této disertační práce.

Původní metoda

Pro separaci analyzovaných látek byla používána částicová kolona C18 (150 x 3,3 mm, s velikostí částic 5 μm , Tessek) v módu izokratické eluce. Stanovovaným analytem byl pouze neopterin eluovaný v čase 4,54 min. Koncentrace kreatininu byly měřeny Jaffého kinetickou metodou na Ústavu klinické biochemie FN HK. Optimální chromatografické podmínky zahrnovaly:

- Mobilní fáze: fosforečnanový pufr (pH 6,4; 15 mmol/l)
- Průtok mobilní fáze: 0,8 ml/min
- Teplota kolony: 25°C
- Objem nástřiku: 20 μl
- Fluorimetrická detekce: λ_{ex} 353 nm, λ_{em} 438 nm
- Celkový čas analýzy: 10 min
- LOD: 90 nmol/l
- LOQ: 300 nmol/l

Obr. 16 Příklad chromatografického záznamu z integrátoru (moč)



Nová metoda

Nové technologické možnosti s sebou přinesly značné změny. Jednou z největších byla změna způsobu zaznamenávání a vyhodnocování dat. Manuální vyhodnocování chromatografických záznamů z integrátoru nahradilo počítačové zpracovávání naměřených výsledků pomocí sofistikovaného softwaru. Další významnou novinkou byla možnost použití mikrotitračních destiček v automatickém dávkovači s regulovatelnou teplotou v rozmezí 4-40°C společně s možností přesného a opakovatelného nástřiku malých objemů.

Významnou změnou bylo rovněž použití dvou detektorů, PDA a fluorescenčního detektoru, což nám umožnilo stanovovat zároveň neopterin i kreatinin bez dalšího čekání na výsledky z jiné laboratoře. Nejvíce možností pro změnu celé metody však nabízel široká škála dostupných sorbentů, a to jak v analytických kolonách tak v předkolonkách.

Z důvodu nutnosti zpracování velkého souboru vzorků byla převzata většina parametrů z původní chromatografické metody. Pro ověření správnosti nové metody byla opakovaně použita série kontrolních vzorků, které byly analyzovány ještě původní metodou na starší instrumentaci. Současně bylo provedeno porovnání naměřených dat s výsledky získanými pomocí jiných metod (RIA, Jaffého metoda).

Nové chromatografické podmínky zahrnovaly následující změny:

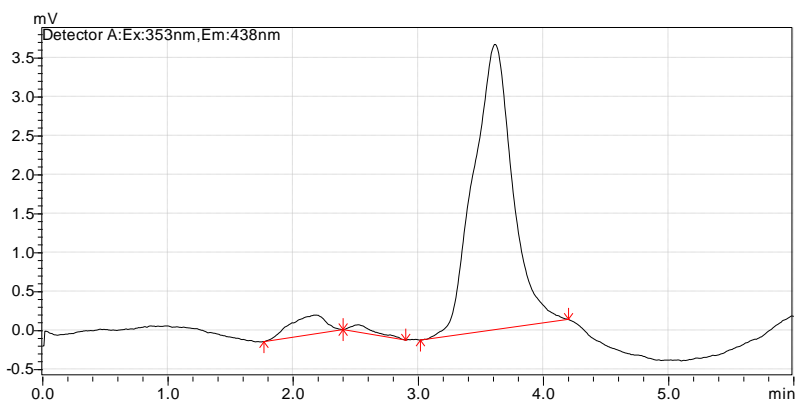
- Objem nástřiku: 1 μ l
- Celkový čas analýzy: 6 min
- LOD: 3,53 nmol/l
- LOQ: 10,79 nmol/l

Pro vlastní stanovení neopterinu bylo v původní metodě využito kombinace sorbentu C18 se stoprocentně vodnou mobilní fází. Vzhledem k tomu, že literatura doporučuje pro analýzy na reverzních fázích alespoň malý obsah organických rozpouštědel a složení mobilní fáze jsme s ohledem na letité zkušenosti rakouských kolegů nechtěli měnit, rozhodli jsme se tedy vyzkoušet některé z nových typů sorbentů, které umožňují práci s čistě vodnou mobilní fází.

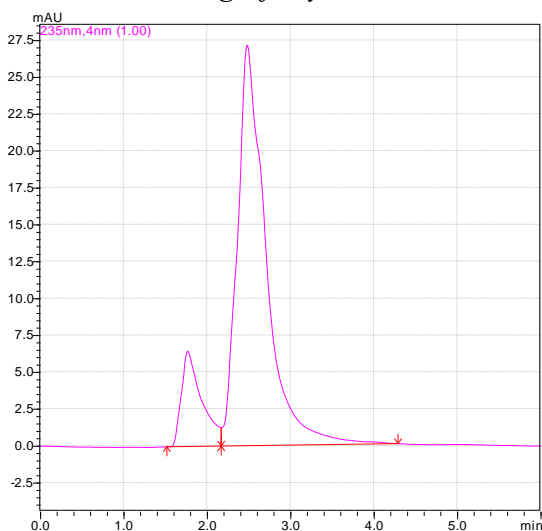
Polymerní sorbent

Příkladem je kolona C18 Asahipak ODP-50 4D, 150 x 4,6 mm, 5 μ m, Shodex. Životnost doposud používaných kolon byla relativně krátká, proto jsme chtěli využít předkolony a přepínacího ventilu, abychom snížili obsah balastních látek, které se dostávají na analytickou kolonu společně se stanovovanými látkami. Bohužel retence našich analytů na předkolonách byla velmi malá a pouze prodlužovala celkový čas analýzy. A ačkoliv se volba této stacionární fáze zdála zprvu jako ideální, tak po několika desítkách analýz jsme začali pozorovat zhoršující se tvar chromatografických píků a nižší separační účinnost polymerní kolony.

Obr. 17 Chromatografický záznam neopterinu na koloně Asahipak (moč)



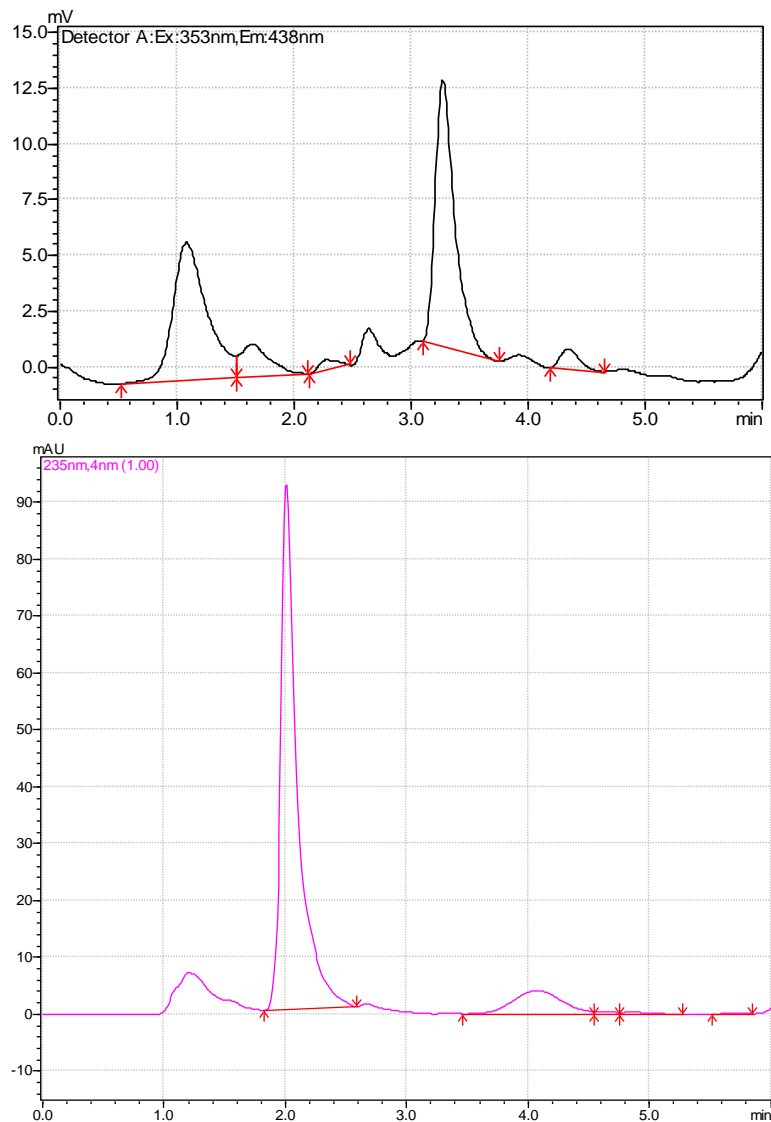
Obr. 18 Chromatografický záznam kreatininu na koloně Asahipak (moč)



Hybridní sorbent

Příkladem je kolona *Gemini C18*, 150 x 3,0 mm, 5 μ m, *Phenomenex*. Tento typ sorbentu se ukázal jako mnohem vhodnější. Tvar píků i separační účinnost kolony zůstávaly stejné i po několika stech analýzách, a proto jsme tuto kolonu vybrali jako nejvhodnější. Veškerá data uvedená v níže popsaných publikacích byla získána s použitím této kolony.

Obr. 18 Chromatografické záznamy neopterinu a kreatininu na koloně *Gemini* (moč)



4.2. Aplikace vyvinutých analytických metod v klinické praxi

Všechny výše zmíněné analytické metody byly vyvinuty na podnět lékařů z různých oborů, kteří měli zájem sledovat netradičně stanovované látky v krvi a moči svých pacientů. Vzhledem k tomu, že nejvíce jsem spolupracoval s týmem profesora Melichara z Oddělení onkologie a radioterapie, tak se většina uvedených prací zabývá sledováním vybraných analytů u pacientů s nádorovým onemocněním.

4.2.1. Sledování sérových hladin antioxidačních vitaminů u onkologických pacientů

Poškození antioxidační rovnováhy u léčených onkologických pacientů je přisuzováno toxickým účinkům chemo- a radioterapie. Ve studii prof. Melichara [87] uskutečněné na Oddělení onkologie a radioterapie FN Hradec Králové byly sledovány sérové hladiny α -tokoferolu, retinolu a neopterinu. Všechny tyto látky hrají důležitou roli v antioxidační rovnováze organismu. Neopterin je navíc považován za indikátor aktivace imunitního systému a v rámci studia souvislostí mezi jeho hladinami a biochemickými pochody v organismu napadeném zhoubným nádorem je neopterin stanovován jak v séru, tak v moči onkologických pacientů.

Studie byla provedena na souboru 28 pacientek s rakovinou prsu a vaječníků léčených kombinací paclitaxelu a carboplatiny. Hladiny všech látek byly sledovány před zahájením a v průběhu chemoterapie. Oba vitaminy byly analyzovány pomocí výše zmíněné HPLC metody, neopterin byl pro účely této studie hodnocen radioimunoanalýzou (RIA). Cílem studie bylo jednak objasnit, jak se mění hladiny vybraných analytů během chemoterapie, ale také nalézt případnou souvislost mezi sérovými hladinami sledovaných látek a přítomností či absencí závažných projevů toxicity vyvolaných chemoterapií.

Výsledky studie byly ve srovnání s dříve publikovanými pracemi překvapivé. Během terapie došlo k výraznému zvýšení hladin α -tokoferolu a retinolu a současně ke snížení hladiny neopterinu. U pacientek se závažnými projevy toxicity byly naopak pozorovány nižší hladiny α -tokoferolu.

Překvapivost výsledků spočívá v rozporu s dříve publikovanými pracemi, kde bylo pozorováno snížení hladin těchto látek během chemoterapie, což je vysvětlováno

rozvojem oxidačního stresu a systémové zánětlivé odpovědi v souvislosti s toxickými účinky chemoterapie. Zvýšené hladiny vitaminů zjištěné v rámci této studie jsou proto vysvětlovány pravděpodobným potlačením systémové zánětlivé odpovědi organismu na chemoterapii. Tuto ideu podporuje i fakt, že zvýšené hladiny antioxidantních vitaminů byly pozorovány právě u pacientek s nízkým projevem toxicity, zatímco u pacientek se závažnými projevy toxicity (leukopenie, anemie, průjem, nausea) byly hladiny α -tokoferolu nižší.

V práci prof. Melichara je také nastíněna otázka, zdali výše sérových hladin α -tokoferolu před zahájením terapie může mít nějaký vliv na míru rozvoje závažných projevů toxicity během chemoterapie. Pro objasnění této otázky by bylo potřeba provést rozsáhlejší klinickou studii. Na praktickém příkladu však bylo demonstrováno, že validní analytická metoda pro stanovení hladin sledovaných analytů je opravdu důležitým nástrojem pro získání platných výsledků, pomocí nichž mohou být objasněny nové skutečnosti nejen v oblasti onkologického výzkumu.

4.2.2. Sledování hladiny neopterinu v moči u onkologických pacientů

Dalším směrem klinického výzkumu prof. Melichara je studium neopterinu a jeho významu v diagnostice a léčbě různých druhů rakoviny. Vědecké publikace týmu prof. Melichara jsou zaměřeny na sledování hladiny neopterinu u pacientů trpících různými druhy rakoviny a na zkoumání vztahů a závislostí mezi hladinami neopterinu a dalšími faktory (prognóza onemocnění, celkový stav pacienta, účinek chemoterapie atd.). Hladina neopterinu v moči je analyzována pomocí HPLC výše zmíněnou metodou.

V následujícím textu bude stručně shrnut klinický význam stanovení neopterinu v moči, jak vyplývá ze sedmi vybraných vědeckých článků autorského kolektivu prof. Melichara zaměřených na danou tematiku. Pro všechny zmíněné publikace byla použita data získána HPLC analýzou neopterinu v moči onkologických pacientů.

Hladina neopterinu v moči byla sledována u pacientů trpících různými druhy nádorových onemocnění: rakoviny vaječnicků (EOC, epithelial ovarian carcinoma a jiné druhy) [88, 89], prsu [90], horní části zažívacího traktu, slinivky břišní a žlučových cest [91], rakoviny jater [92], plic, hlavy a krku [93] a kolorektálním karcinomem [94]. Cílem výzkumu bylo nalezení vztahu mezi hladinou neopterinu a souvisejícími parametry, které zahrnují:

- prognózu onemocnění
- průběh léčby (vliv podání chemoterapeutik na hladinu neopterinu)
- účinek chemoterapie a zdravotní stav pacienta
- projevy toxicity chemoterapie
- parametry gastrointestinální permeability (parametry charakterizující bariérovou funkci střevní sliznice, pomocí plynové chromatografie se zjišťují hladiny různých sacharidů v moči po jejich perorálním podání)
- další parametry – hladina hemoglobinu, krevních částic, antioxidačních vitaminů.

Obecně je prostřednictvím měření neopterinu sledována aktivace imunitního systému a zánětlivá odpověď organismu v souvislosti s vybraným onemocněním a jeho léčbou.

Práce zaměřené na sledování hladiny neopterinu u pacientek s rakovinou vaječníků [88, 89] popisují zjištění významně zvýšených hladin tohoto markeru jak u primárních nádorů, tak u pacientek s metastázemi z jiných nádorů. První zmíněná studie byla provedena na souboru 49 pacientek. Vyšší hladiny neopterinu byly pozorovány u pacientek s vážnými projevy toxicity vyvolané chemoterapií. Naopak u pacientek s nižšími hladinami neopterinu byla lepší prognóza onemocnění a delší doba přežití. V druhé práci bylo sledováno pouze 5 pacientek, avšak s vyšší frekvencí odběrů moči a měření neopterinu, a to před zahájením léčby a poté každý den během terapie. Změny hladin neopterinu u jednotlivých pacientek byly sice odlišné, ale průběh koncentrace neopterinu u jednotlivých pacientek odrážel klinický stav nemocných. Ze studie jednoznačně vyplynulo, že zvýšená hladina neopterinu koresponduje se zhoršením zdravotního stavu nemocných, s podáním léčebné dávky a s toxickými projevy chemoterapie.

U pokročilých stádií kolorektálního karcinomu byla přítomnost zvýšených hladin neopterinu již dříve popsána. V případě ostatních nádorů zažívacího traktu je však význam neopterinu méně znám, a proto je další práce prof. Melichara [91] zaměřena na sledování neopterinu na souboru 53 pacientů s rakovinou horní části gastrointestinálního traktu, slinivky břišní a žlučových cest. I u těchto diagnóz byly ve srovnání s kontrolní skupinou zjištěny zvýšené hladiny neopterinu.

V publikaci věnující se karcinomu tlustého střeva [94] jsou shrnuty výsledky studie, jejíž součástí bylo kromě měření neopterinu také hodnocení parametrů gastrointestinální permeability u skupiny 21 pacientů trpících kolorektálním karcinomem a léčených kombinací cytostatik (cetuximab, irinotecan, leucovorin, 5-fluorouracil). Zjištěná data poukazují na spojitost mezi gastrointestinální permeabilitou a systémovou aktivací imunitního systému. Sledování jak neopterinu, tak propustnosti střevní sliznice může mít význam pro určení prognózy tohoto onemocnění.

Další práce [92] vznikla na základě sledování hladiny neopterinu u skupiny 154 pacientů trpících primárními a sekundárními nádory jater. I v tomto případě byly ve srovnání s kontrolní skupinou hladiny neopterinu zvýšené. Byl pozorován i statisticky významný vztah mezi koncentrací neopterinu a věkem pacientů, koncentrací hemoglobinu a množstvím některých krevních částic (erytrocytů, krevních leukocytů a krevních destiček).

Vztah mezi hladinou neopterinu a množstvím hemoglobinu byl zkoumán i v práci zaměřené na rakovinu prsu [90]. U skupiny 194 pacientek byly zjištěny výrazně zvýšené hladiny neopterinu během chemoterapie současně doprovázené sníženou koncentrací hemoglobinu.

Poslední publikace [93] popisuje výsledky studie zaměřené na hodnocení koncentrace neopterinu v moči a parametrů střevní permeability u 16 pacientů trpících rakovinou plic, hlavy a krku léčených gefitinibem. U těchto nádorů byly již dříve pozorovány zvýšené hladiny neopterinu v moči. Tato práce se proto soustřeďuje více na objasnění souvislosti mezi účinkem gefitinibu (= blokáda receptorů epidermálního růstového faktoru) a aktivací imunitního systému (prostřednictvím měření neopterinu).

Výše popsané klinické aplikace jen částečně přibližují náplň a směr onkologického výzkumu vědeckého týmu profesora Melichara. Pro měření neopterinu u vybraných skupin pacientů byla využita HPLC metoda umožňující současné stanovení neopterinu a kreatininu v moči. Přestože se pro hodnocení neopterinu v biochemických laboratořích častěji využívá metoda RIA, pro analýzu větších souborů vzorků je vhodnější a levnější použití HPLC, což bylo ověřeno i aplikací metody na klinický výzkum prováděný na onkologickém oddělení FN HK.

5. PŘEHLED VŠECH PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

I. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection

Lubor Urbánek, Dagmar Solichová, Bohuslav Melichar, Josef Dvořák, Iveta Svobodová and Petr Solich

Analytica Chimica Acta, 573, 2006, str. 267-272

II. Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using a monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects

Lubor Urbánek, Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Bohuslav Melichar, Veronika Opletalová, Petr Solich

Journal of Separation Science, 29, 2006, str. 2485-2493

III. Urinary neopterin in patients with liver tumors

Bohuslav Melichar, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Lubor Urbánek, Pavel Veselý and Karolina Melicharová

Tumori, 92,2006, str. 318-322

IV. Urinary neopterin in patients with ovarian cancer

Bohuslav Melichar, Lubor Urbanek, Lenka Krcmová, Hana Kalabova, Iveta Svobodova, Emanuela Dragounova, Pavel Vesely, Radomír Hyspler, Dagmar Solichova

Pteridines, 17, 2006, str. 145-153

V. Urinary neopterin in patients with upper gastrointestinal, biliary and pancreatic carcinomas

Bohuslav Melichar, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Lubor Urbánek, Karolina Melicharová

Pteridines, 17, 2006, str. 20-24

- VI. Serial urinary neopterin measurements reflect the disease course in patients with epithelial ovarian carcinoma treated with paclitaxel/platinum chemotherapy**
Bohuslav Melichar, Hana Kalabova, Lubor Urbanek, Eva Malirova, Dagmar Solichova
Pteridines, 18, 2007, str. 1-7
- VII. Urinary neopterin in patients treated with gefitinib**
Hana Kalabova, Josef Dvorak, Radomír Hyspler, Alena Ticha, Lenka Krcmova, Lubor Urbanek, Dagmar Solichova, Bohuslav Melichar
Pteridines, 18, 2007, str. 95-100
- VIII. Serum alpha-tocopherol, retinol and neopterin during paclitaxel/carboplatin chemotherapy**
Bohuslav Melichar, Hana Kalábová, Lenka Krčmová, Lubor Urbánek, Radomír Hyšpler, Eva Malířová and Dagmar Solichová
Anticancer Research, 27, 2007, str. 4397-4402
- IX. Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate column**
I. Citová, L. Havlíková, L. Urbánek, D. Solichová, L. Nováková, P. Solich
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 2007, str. 675-681
- X. Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell counts in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy**
Bohuslav Melichar, Lubor Urbánek, Lenka Krčmová, Hana Kalábová, Karolina Melicharová, Eva Malířová, Helena Hornychová, Aleš Ryška, Radomír Hyšpler and Dagmar Solichová
Anticancer Research, 28, 2008, str. 2389-2396

XI. Gastrointestinal permeability - a parameter of possible prognostic importance in metastatic colorectal carcinoma

Bohuslav Melichar, Radomír Hyspler, Hana Kalabova, Lubor Urbanek, Lenka Krcmova, Dagmar Solichova

Pteridines, 19, 2008, str. 19-22

XII. Permeability and Vitamin A Absorption in Patients With Chemotherapy-induced Diarrhea

Melichar B, Dvorák J., Krcmova L., Hyspler R., Urbánek L., Solichová D.

American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials, 31, 2008, str. 580-584

6. PŘEHLED VYBRANÝCH PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ A PŘEDNÁŠEK

Postery:

- **Optimization and validation of HPLC method for simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection**
Lubor Urbánek, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Petr Solich
Mezinárodní konference IMA 05 - Iraklion, Řecko, 2.-6.10. 2005
- **Using monolithic stationary phase for HPLC determination of serum retinol, α -tocopherol and retinyl esters after absorption test of vitamin A**
L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, B. Melichar, V. Opletalová, P. Solich
Mezinárodní symposium ISC 2006 – Kodaň, Dánsko, 21.-25.8. 2006
- **Využití chromatografie pro stanovení liposolubních vitaminů a cholesterolu u gerontologických pacientů s poruchami kognice**
D. Solichová, R. Hyšpler, A. Tichá, I. Svobodová, L. Urbánek, L. Krčmová, P. Žďárský, B. Jurašková, L. Sobotka
12. celostátní gerontologický kongres: Nejčastější onemocnění ve stáří-strategie v terapii, diagnostice a následné péči, Hradec Králové, 15.-17.11. 2006
- **Využití nových stacionárních fází a moderní HPLC instrumentace v klinickém výzkumu**
L. Urbánek, D. Solichová, L. Krčmová, B. Melichar, P. Solich
Advances in chromatography and electrophoresis, Chiranal 2007, Olomouc, 24.-27.6. 2007
- **Troubleshooting of simultaneous determination of neopterin and creatinine in biological samples**
L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, B. Melichar, P. Solich
12th international meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, RDPA 2007, Island of Elba, Italy, 23.-26.9. 2007

Přednášky:

- **HPLC stanovení neopterinu v moči s využitím autosampleru Rack Changer/c Prominence**
L. Urbánek, D. Solichová
Odborný seminář uživatelů analytické instrumentace SHIMADZU - Vlachovice
27.-28.4. 2006

- **Uplatnění HPLC v klinickém monitoringu**
L. Urbánek, D. Solichová, L. Krčmová
Odborný seminář gerontologické a metabolické kliniky FN HK, 24.1. 2007

- **Utilization of liquid chromatography for the monitoring of cancer patients**
L. Urbánek, D. Solichová, B. Melichar, L. Krčmová, P. Solich
26th International Winter-Workshop: Clinical, Chemical and Biochemical Aspects of Pteridines, St.Christoph, Austria 4.-11.3. 2007

7. PŘÍLOHY

7.1. Příloha 1

Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection

Lubor Urbánek, Dagmar Solichová, Bohuslav Melichar, Josef Dvořák, Iveta Svobodová and Petr Solich

Analytica Chimica Acta, 573, 2006, str. 267-272



Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection

Lubor Urbánek^{a,b}, Dagmar Solichová^{b,*}, Bohuslav Melichar^c,
Josef Dvořák^c, Iveta Svobodová^b, Petr Solich^a

^a Charles University in Prague, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital in Hradec Králové, Department of Metabolic Care and Gerontology, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^c Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital in Hradec Králové, Department of Oncology and Radiotherapy, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Received 29 November 2005; received in revised form 13 February 2006; accepted 15 February 2006

Available online 6 March 2006

Abstract

In this study a novel, simple and rapid reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) procedure for simultaneous determination of vitamins A and E (retinol and alpha-tocopherol) in blood serum has been developed and validated using monolithic column and diode-array detection (DAD).

The monolithic column Chromolith Performance RP-18e (100 mm × 4.6 mm) was operated at ambient temperature. One hundred percent methanol at flow rate 2.5 ml min⁻¹ was used as a mobile phase. Detection of both compounds was performed with diode-array detector, retinol was monitored at 325 nm and alpha-tocopherol at 295 nm.

The linear dependence between peak area and concentration ranged from 0.25 to 10.00 μmol l⁻¹ for retinol and 0.5–50.0 μmol l⁻¹ for alpha-tocopherol. The limit of detection (LOD) for retinol was 0.02 μmol l⁻¹ and limit of quantification (LOQ) was 0.07 μmol l⁻¹. The limit of detection (LOD) for alpha-tocopherol was 0.1 μmol l⁻¹ and limit of quantification (LOQ) was 0.3 μmol l⁻¹. Retinol was eluted in 0.8 min and alpha-tocopherol in 1.4 min. The simultaneous analysis of vitamin A and E can be achieved in less than 2 min.

The implementation of monolithic column Chromolith Performance shortens the time of analysis of both vitamins four times in comparison with using traditional particulate column Pecosphere C 18 (150 mm × 4.6 mm), 5 μm. This fact may play an important role for routine clinical analysis of biological samples.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Retinol; Alpha-tocopherol; Monolithic column; Liquid chromatography

1. Introduction

Oxygen free radicals are involved in the pathogenesis of most common disorders, including atherosclerosis and cancer. The production of oxygen free radicals is normally balanced by antioxidants, e.g. vitamin A (retinol) and vitamin E (alpha-

tocopherol) [1]. The perturbations of the balance between the production of oxygen free radicals and antioxidant defences are involved in the pathogenesis of tissue damage in inflammation, aging, or in carcinogenesis.

There has been published many papers considerably interested in the evaluation of retinol and alpha-tocopherol in observational as well as interventional studies aiming at studying the cancer chemopreventive properties of these compounds [2]. Therefore, rapid and sensitive methods allowing the simultaneous determination of these micronutrients are very needed [3,4].

A number of analytic methods to study the concentrations of retinol or alpha-tocopherol has been published recently [5–10].

* Corresponding author at: Department of Metabolic Care and Gerontology, University Hospital, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.
Tel.: +42 495832429; fax: +42 495832001.

E-mail address: solich@lfhk.cuni.cz (D. Solichová).

Reversed-phase chromatography on octadecyl-modified silica (ODS) columns may be considered to represent the method of choice, although the use of normal-phase chromatography on Lichrosorb Si 60 column has also been described [11]. The concentrations of individual vitamins or combinations of two or three vitamins can be chromatographed isocratically. More complicated mixtures may require a gradient program. Conventional detection techniques include ultraviolet–visible (UV–vis), diode array (DAD), fluorimetric or electrochemical detection with different detection limits [4].

For clinical laboratories a time- and cost-reducing method is of considerable interest. Taibi and Nicotra [5] and Moreno and Salvado [6] achieved separation of vitamins A and E within 10–14 min. While the analysis of a significant number of samples using the common silica HPLC columns may be expensive in terms of time and resources, an application of monolithic columns into the clinical practice could solve these problems.

A monolithic column is made of a highly porous rod with two types of pore structure—macropores (typically with a size of 2 μm) and mesopores (size of about 13 nm). This special porous character of the monolithic column allows relatively high mobile phase flow rates (1–9 ml min^{-1}) while keeping the backpressure low. Due to the favourable properties of monolithic materials, the risk of destruction and damage of the column by movement of the sorbent inside the column is eliminated and reliability as well as reproducibility of the analysis are improved [12–14].

In spite of these advantages the monolithic columns have not been used as widely as would be expected. Studies on the use of monolithic columns so far have focused mainly on preparation, testing, physical and chromatography properties of monolithic columns [13,15–17]. On the other hand, the number of articles dealing with practical applications of monolithic columns is still relatively low, although there has been a marked increase in the last 2 years [18]. These recent publications mostly include analysis of drugs and metabolites [19–23], environmentally relevant substances [24], food additives [25–27], chiral separations [28], as well as bioanalytical separations [29–31].

On the other hand, there are also some disadvantages of monolithic columns to be mentioned. They concern relatively high price, short list of different commercially distributed sorbents or worse peak shapes at higher flow rate.

The aim of this work was the development and validation of a novel, routine, fast, inexpensive and selective method for the determination of retinol and alpha-tocopherol in serum using a DAD with an isocratic elution. The present method was used to monitor of both vitamins A and E in serum and lipoprotein fractions of elderly patients with breast cancer before and during treatment with aromatase inhibitors.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Retinol and DL- α -tocopherol were obtained from Fluka (Sigma Aldrich, Prague, Czech Republic). Tocopherol Set of α -, β -, γ - and δ -tocopherol was purchased from Calbiochem (Merck, Darmstadt, Germany). Following standards were used:

vitamins A/E by HPLC Control Set from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) and the ClinChek-Control lyophilised human serum kit for HPLC analysis of vitamins A and E from Recipe (Recipe Chemicals + Instruments Labortechnik, Munich, Germany). HPLC-grade methanol and *n*-hexane for the preparation of standard solutions were obtained from Merck (Merck, Darmstadt, Germany). Ethanol denaturated with 5% methanol for deproteinisation procedure was obtained from Lachema (Brno, Czech Republic). Distilled methanol of p.a. purity for HPLC mobile phase was supplied by Penta (Prague, Czech Republic). Helium 4.6 and nitrogen 6.0 were purchased from Linde (Prague, Czech Republic).

2.2. Chromatography

The analyses were performed using the Perkin Elmer HPLC set (Norwalk, USA) comprising of a LC 200 pump, a LC 200 autosampler, LC Column Oven 101 thermostat and LC 235C diode-array detector attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. Separation of retinol and alpha-tocopherol were performed using the Chromolith Performance RP-18e, 100 mm \times 4.6 mm monolithic column (Merck, Darmstadt, Germany). As the mobile phase 100% methanol was used at the flow rate of 2.5 ml min^{-1} and column pressure 3.3 MPa (480 psi). The block heater LC Oven 101 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) was utilised to keep the analytical column temperature at 25 $^{\circ}\text{C}$. The injection volume was 50 μl . The DAD detection of retinol and alpha-tocopherol was carried out at 325 and 295 nm, respectively. The total time of analysis was 1.8 min.

The Pecosphere C18, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μm particle size reverse phase column (Perkin Elmer, Norwalk, USA) was used at the flow rate of 1.5 ml min^{-1} and column pressure 6.5 MPa (950 psi). The injection volume was 100 μl and the total time of analysis was 8 min. The other conditions and instrumental equipment were equivalent with the method using monolithic column.

2.3. Preparation of standards and samples

Stock solutions of retinol and tocopherol (α -, β -, γ -, δ -) standards were prepared as follows: 1 mmol l^{-1} retinol solution was prepared by dissolving in methanol. Tocopherol standards were firstly dissolved in *n*-hexane (1 mmol l^{-1}) and then diluted by methanol to get 0.5 mmol l^{-1} stock solutions. These retinol and tocopherol standard solutions were stored at -25 and 4 $^{\circ}\text{C}$, respectively. For the calibration, working solutions of both standards were diluted by methanol in volumetric flasks in the concentration range: 0.25–10.00 $\mu\text{mol l}^{-1}$, for retinol and 0.5–50.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ for alpha-tocopherol. The calibration was accomplished at six concentration levels. The stability of stock and working solutions was 6 months.

The protocol was approved by the institutional ethical committee, and all patients signed an informed consent. Blood samples were drawn from the peripheral vein after twelve hours overnight fast. The samples were then centrifuged (1600 \times g, 10 min, 16 $^{\circ}\text{C}$) and serum was separated. In the liquid–liquid

extraction (LLE) procedure, 500 μl of serum was deproteinized by cool ethanol denatured with 5% methanol (500 μl , 5 min, 4 °C). Then 2500 μl of *n*-hexane was added to this mixture and extracted for 5 min by a vortex apparatus. After centrifugation (1600 $\times g$, 10 min, 0 °C), the aliquot (2000 μl) of the clean extract was separated and evaporated under nitrogen (60 °C). The residue was dissolved in 400 μl methanol and analysed by reversed-phase HPLC using the external standard calibration.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

In order to validate the developed method, precision, accuracy, recovery, linearity and detection and quantitation limits were evaluated.

For the determination of the precision of the method, ten samples prepared individually from one lyophilised human serum of one concentration level were analysed. The method precision expressed by repeatability of peak area and retention time was determined as the relative standard deviation (R.S.D.) calculated from the obtained data. Table 1 comprises R.S.D. values of retinol and alpha-tocopherol, respectively.

The accuracy of the method was tested by using the Bio-Rad control set and the ClinChek-Control kit. The values obtained were always in acceptable range (Table 2). The recovery was determined by performing of three measurements of the serum pool spiked with 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of retinol and 5.0 and 10.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of alpha-tocopherol using both columns (Table 1).

Linearity was measured in six concentration levels in the range of 0.25–10.00 and 0.5–10.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ for retinol and 0.5–50.0 and 5.0–50.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ for alpha-tocopherol, using the monolithic and particulate columns. Each solution was injected three times. Table 1 shows the regression equations and correlation coefficients calculated-based data obtained. For the quantitation, the external standard method was used instead of using retinol acetate and tocopherol acetate as internal standards because of possible contamination of patients' serum by these compounds. (These vitamins were administered to patients in forms of their acetates).

The limit of detection (LOD) was defined as the compound concentration that produced a signal-to-noise ratio greater than three and the limit of quantification (LOQ) was evaluated as the concentration equal to 10 times the value of the signal-to-noise ratio (Table 1).

The separation of α -tocopherol together with β -, γ - and δ -tocopherols proves satisfactory selectivity of both methods (Fig. 1). The overlap of β - and γ -tocopherol peaks is not of practical significance because of very low concentration of β -tocopherol in human serum.

3.2. Comparison of columns

Validation values of monolithic and particulate column were similar, but some parameters e.g. retention times, backpressure on columns and consumption of mobile phase, differed.

Using the monolithic column, retention times of retinol and alpha-tocopherol were 0.8 and 1.4 min, respectively and the total

Table 1
Validation parameters of retinol and α -tocopherol

	Vitamin A (retinol)		Vitamin E (α -tocopherol)	
	Chromolith Performance RP-18e	Pecosphere C-18	Chromolith Performance RP-18e	Pecosphere C-18
Repeatability-area (R.S.D. %)	5.58	4.51	5.93	0.91
Repeatability-retention time (R.S.D. %)	0.10	0.08	0.37	0.29
Accuracy (% recovery) ^a	98.5	91.2	100.3	103.0
Accuracy (R.S.D. %) ^a	5.98	3.24	2.06	1.68
Accuracy (% recovery) ^b	100.0	92.5	103.3	99.7
Accuracy (R.S.D. %) ^b	6.93	2.20	2.32	1.52
Calibration range ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0.25–10.00	0.5–10.0	0.5–50.0	5.0–50.0
Equation	$y = 3629.3x + 531.38$	$y = 194\,681x + 2269.9$	$y = 59\,165x + 625.92$	$y = 11\,913x - 897.13$
Correlation coefficient ^c	$R^2 = 0.9999$	$R^2 = 0.9992$	$R^2 = 0.9997$	$R^2 = 0.9996$
LOD ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0.02	0.02	0.1	0.1
LOQ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0.07	0.07	0.3	0.3

^a A serum pool spiked with 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of retinol and 5.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of α -tocopherol, spike volume was 5 μl .

^b A serum pool spiked with 1.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of retinol and 10.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of α -tocopherol, spike volume was 5 μl .

^c Linearity was measured in six concentration levels.

Table 2
Test of the method accuracy using the particulate column and monolithic column

	Pecosphere C-18		Chromolith Performance RP-18e	
	Bio-Rad control set level I ^a	ClinChek-control kit level I ^b	Bio-Rad control set level I ^a	ClinChek-control kit level I ^b
Vitamin A (retinol)	0.42/0.38–0.73	3.20/2.32–3.48	0.41/0.38–0.73	3.05/2.32–3.48
Vitamin E (α -tocopherol)	6.94/6.04–10.68	22.46/19.04–28.33	7.46/6.04–10.68	22.79/19.04–28.33

^a Measured value/acceptable range ($\mu\text{mol l}^{-1}$).

^b Measured value/control range ($\mu\text{mol l}^{-1}$).

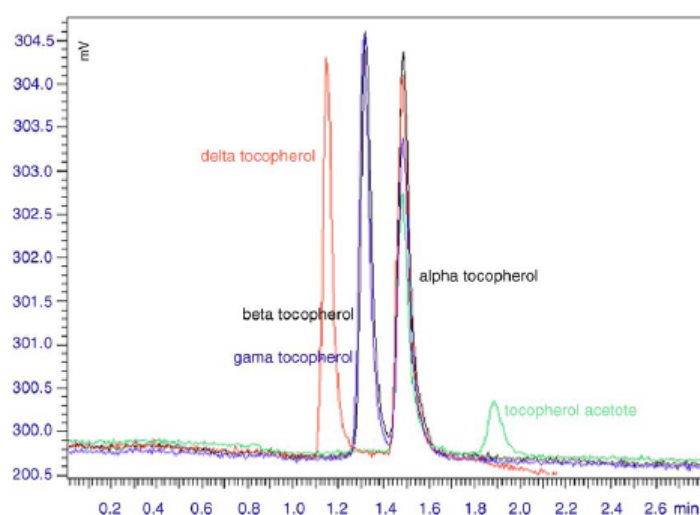


Fig. 1. Chromatogram of tocopherols (α -, β -, γ -, δ -) and tocopherol acetate using the Chromolith Performance RP-18e monolithic column.

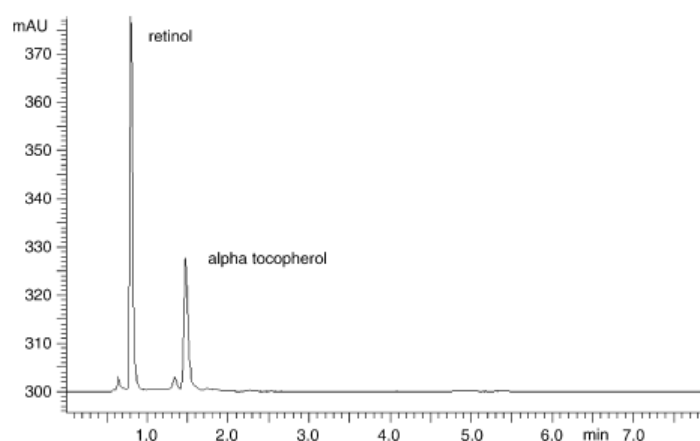


Fig. 2. An example of chromatogram of patient serum using the Chromolith Performance RP-18e monolithic column. Concentrations of retinol and α -tocopherol are 3.15 and 28.25 $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectively.

analysis time was 1.8 min, which is four times less than using the particulate column, with the total analysis time of 8 min. By performing analyses of a large number of samples the implementation of monolithic column reduced the consumption of mobile phase approximately 2.5 times, although the Chromolith column flow rate was higher than the Pecosphere one. Also the comparison between backpressure and column life showed a difference. The backpressure of a new Pecosphere particulate column was around 1000 psi and after analyses of a large amount of human serum samples the column pressure increased up to 2000 psi and more. In this case, longer retention times of both vitamins and less distinct peak shapes were observed. On the other hand, the initial backpressure of a new Chromolith monolithic column was approximately 480 psi and after 1000 injections of biological material the value increased up to 900 psi; no changes of retention times or peak shapes were seen.

3.3. Application of method

Complications of atherosclerosis and cancer are the most frequent causes of death in developed countries. Antitumor

Table 3
An example of retinol and α -tocopherol concentrations in patient serum and lipoprotein fractions

	Chromolith Performance RP-18e		Pecosphere C-18	
	Retinol ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	α -Tocopherol ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Retinol ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	α -Tocopherol ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
Serum	3.15	28.25	2.82	28.44
VLDL	0.11	8.90	0.11	7.39
LDL	0.35	15.40	0.33	16.21
HDL	1.16	5.96	1.03	5.68

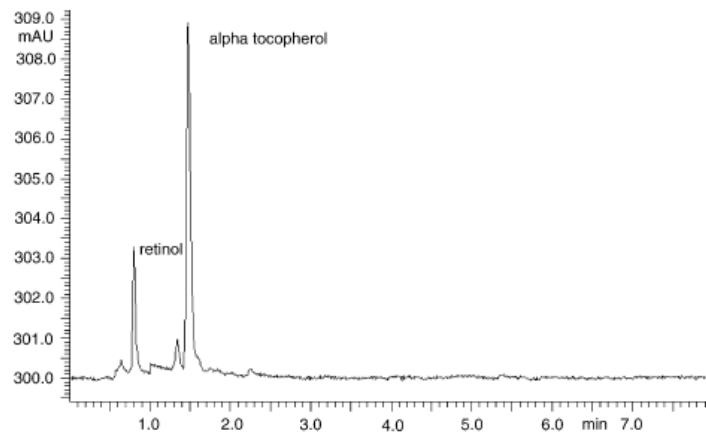


Fig. 3. An example of chromatogram of lipoprotein fraction (VLDL) from patient serum using the Chromolith Performance RP-18e monolithic column. Concentrations of retinol and α -tocopherol are 0.11 and 8.90 $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectively.

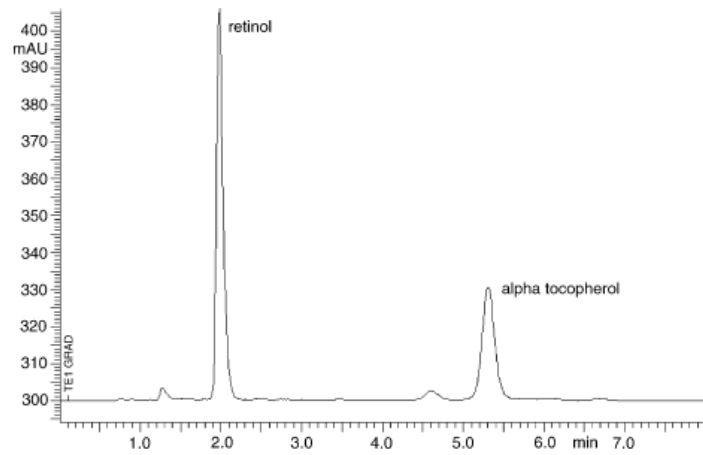


Fig. 4. An example of chromatogram of patient serum using the Pecosphere C-18 particulate column. Concentrations of retinol and α -tocopherol are 2.82 and 28.44 $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectively.

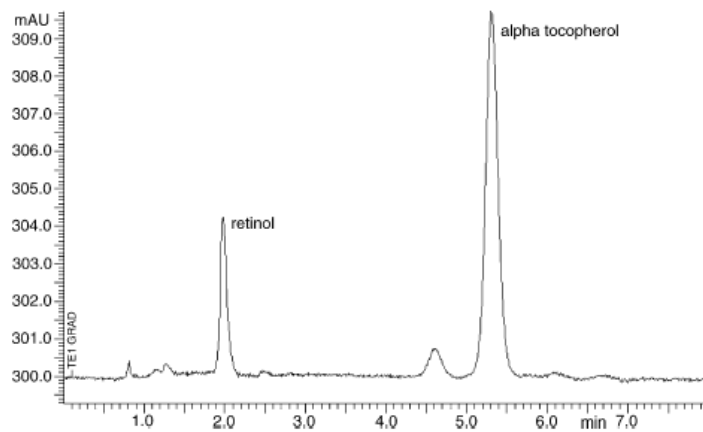


Fig. 5. An example of chromatogram of lipoprotein fraction (VLDL) from patient serum using the Pecosphere C-18 particulate column. Concentrations of retinol and α -tocopherol are 0.11 and 7.39 $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectively.

therapy may also affect progression of atherosclerosis. In contrast to tamoxifen, which is known to decrease blood cholesterol, the third generation aromatase inhibitors are known to increase blood cholesterol levels, possibly increasing the risk of atherosclerosis. In addition many cytotoxic drugs also induce oxidative stress and potentially increase the risk of atherosclerosis.

The method evaluated in the present study was utilised for the assessment of oxidative stress through monitoring of vitamins A and E concentrations in human serum and lipoprotein fractions. The method was a part of a complex biochemical analysis of blood samples collected from elderly patients with breast cancer before and during the treatment with aromatase inhibitors.

Some examples of the application of this method in the clinical practice are shown in Table 3 and Figs. 2–5. (Comparison of particulate and monolithic column).

4. Conclusion

In this study, a new fast and simple HPLC method for selective and sensitive determination of retinol and alpha-tocopherol in human serum using monolithic column for clinical monitoring was developed and validated. The method utilizing monolithic column was compared with determination using standard particulate column.

This method will allow analysis of a large number of samples in clinical studies at relatively low cost, resulting in better understanding of the metabolism of these micronutrients in common disorders like cancer or atherosclerosis.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Health Czech Republic Project no. NR/8048-3, Research Project MZO 00179906 and by the Ministry of Education Czech Republic, Project MSM 0021620822. The authors wish to express their gratitude to Marie Mejstřáková for technical assistance.

References

- [1] D. Dreher, A.F. Junod, *Eur. J. Cancer* 32A (1996) 30.
- [2] P. Stocker, J.-F. Lesgards, N. Vidal, F. Chalier, M. Prost, *Biochim. Biophys. Acta: Gen. Subjects* 1621 (2003) 1.

- [3] M.K. Kim, S.H. Ahn, Y.Ch. Lee-Kim, *Nutr. Res.* 21 (2001) 797.
- [4] T. Arnold, H. Nau, R. Ruehl, in: W.O. Song, G.R. Beecher, R.R. Eitenmiller (Eds.), *Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water-Soluble Vitamins*, Chapter 1 (Chemical Analysis Series, vol. 154), John Wiley and Sons Inc., New York, 2000, p. 3.
- [5] G. Taibi, C.M.A. Nicotra, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 261.
- [6] P. Moreno, V. Salvado, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 207.
- [7] M.A. Rodríguez-Delgado, J.F. Díaz-Flores Estévez, F. Díaz-Flores Estévez, C. Hernández Calzadilla, C. Díaz Romero, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 991.
- [8] H. Ortega, J.L. Coperías, P. Castilla, D. Gómez-Coronado, M.A. Lasunción, *J. Chromatogr. B* 803 (2004) 249.
- [9] D. Talwar, T.K.K. Ha, J. Cooney, Ch. Brownlee, D. St JO'Reilly, *Clin. Chim. Acta* 270 (1998) 85.
- [10] S.R. Sirimanne, D.G. Patterson Jr., L. Ma, J.B. Justice Jr., *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 129.
- [11] S. Casal, B. Macedo, M.B.P.P. Oliveira, *J. Chromatogr. B* 763 (2001) 1.
- [12] Web address: <http://www.chromolith.com>.
- [13] K. Miyabe, G. Guiochon, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 853.
- [14] N. Tanaka, M. Motokawa, H. Kobayashi, K. Hosoya, T. Ikegami, in: F. Švec, T.B. Tennikova, Z. Deyl (Eds.), *Monolithic Materials Preparation, Properties and Applications*, Chapter 8 (Journal of Chromatography Library, vol. 67), Elsevier, Amsterdam, 2003, p. 173.
- [15] M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, T. Ikegami, N. Tanaka, *Monolithic Silica Columns with Various Skeleton Sizes and Through-pore Sizes for Capillary Liquid Chromatography*, (Analytical Separation News, vol. 10), Elsevier, 2002, p. 4.
- [16] T.B. Tenikova, J. Reusch, *J. Chromatogr. A* 1065 (2005) 13.
- [17] P. Coufal, M. Čihák, J. Suchánková, E. Teasařová, Z. Bosáková, K. Štulík, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 99.
- [18] K. Cabrera, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 843.
- [19] L. Nováková, L. Matyssová, D. Solichová, M.A. Koupparis, P. Solich, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 191.
- [20] M.M. Hefnawy, H.Y. Aboul-Enein, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 291.
- [21] F. Geber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, Ch. Siffrin, Ch. Spoendlin, *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 127.
- [22] A. Bugey, Ch. Staub, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 555.
- [23] C. Pistos, J.T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 737.
- [24] A.S. Yazdi, Z. Es'haghi, *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 136.
- [25] J. Pöhl, T. Hyötyläinen, O. Ranta-Aho, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 25.
- [26] A.M. van Nederkassel, M. Daszykowski, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 1096 (2005) 177.
- [27] M.A. Vian, V. Tomao, S. Gallet, P.O. Coulomb, J.M. Lacombe, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 224.
- [28] Z. Chen, K. Uchiyama, T. Hobo, *J. Chromatogr. A* 942 (2002) 83.
- [29] N.C. van de Merbel, H. Poelman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 495.
- [30] L. Xiong, R. Zhang, F.E. Regnier, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 187.
- [31] P. Božek, M. Hutta, B. Hrivňáková, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 24.

7.2. Příloha 2

Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using a monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects

Lubor Urbánek, Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Bohuslav Melichar, Veronika Opletalová, Petr Solich

Journal of Separation Science, 29, 2006, str. 2485-2493

Lubor Urbánek^{1,2}
 Lenka Krčmová¹
 Dagmar Solichová²
 Bohuslav Melichar³
 Veronika Opletalová⁴
 Petr Solich¹

¹Charles University in Prague,
 Department of Analytical
 Chemistry, Faculty of Pharmacy,
 Hradec Králové, Czech Republic

²Charles University in Prague,
 Faculty of Medicine and
 University Hospital in Hradec
 Králové, Department of
 Metabolic Care and Gerontology,
 Hradec Králové, Czech Republic

³Charles University in Prague,
 Faculty of Medicine and
 University Hospital in Hradec
 Králové, Department of
 Oncology and Radiotherapy,
 Hradec Králové, Czech Republic

⁴Charles University in Prague,
 Department of Pharmaceutical
 Chemistry and Drug Control,
 Faculty of Pharmacy, Hradec
 Králové, Czech Republic

Original Paper

Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of α -tocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using a monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects

Among other side effects, administration of anticancer agents is accompanied by manifestations of gastrointestinal toxicity and disturbances of antioxidant balance. The monitoring of these toxic effects in clinical practice is impeded by a dearth of reliable laboratory methods. Therefore, a simple and rapid reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for selective and sensitive determination of retinol, α -tocopherol, and retinyl esters (retinyl-palmitate and retinyl-stearate) in blood serum has been developed and presented in this study. A Series 200 LC HPLC instrument from Perkin Elmer (Norwalk, USA) with diode-array detector (DAD) was used for the analysis. Separations of retinol, α -tocopherol, retinyl-palmitate, and retinyl-stearate were performed using a Chromolith Performance RP-18e, 100 \times 4.6 mm monolithic column from Merck (Darmstadt, Germany). Gradient elution was used at a flow rate of 3 mL/min; the mobile phase was methanol-water (95:5, v/v) for 0–2.1 min and methanol-2-propanol (60:40, v/v) for 2.1–4.9 min. The total time of analysis was 6 min. The injection volume was 20 μ L and the analysis was performed at ambient temperature. Detection of retinol, α -tocopherol, and retinyl esters was carried out at 325, 295, and 330 nm, respectively. For practical assessment of the method, the vitamin A absorption test was performed on seven healthy controls as well as on six patients with non-small cell lung carcinoma or head and neck carcinoma previously treated by chemotherapy and/or radiotherapy, six patients with rectal carcinoma before chemoradiotherapy, four patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST) before treatment with imatinib, and a breast cancer patient with chemotherapy-induced diarrhea. Present data demonstrate the feasibility of large scale HPLC determination of vitamin E, vitamin A, and retinyl esters in human serum using a silica monolithic column, and this method may represent a valuable aid in the laboratory monitoring of the toxicity of anticancer therapy.

Keywords: HPLC / Monolithic column / Retinol / Retinyl esters / α -Tocopherol

Received: April 19, 2006; revised: August 4, 2006; accepted: August 17, 2006

DOI 10.1002/jssc.200600153

1 Introduction

The remarkable progress achieved during the past decades in medical therapy of malignant disorders has been

Correspondence: Dr. Dagmar Solichová, Department of Metabolic Care and Gerontology, University Hospital, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.

E-mail: solich@lfhk.cuni.cz

Fax: +420-495832001

Abbreviations: HETP, height equivalent of a theoretical plate; LLE, liquid-liquid extraction; SST, system suitability test

at the price of significant toxicity that accompanies cancer treatment. The myriad different side effects of pharmacological agents used for cancer therapy include manifestations of gastrointestinal toxicity and disorders of antioxidant balance.

Although gastrointestinal toxicity represents one of the most common side effects of administration of cytotoxic agents, the assessment of gastrointestinal toxicity still relies mostly on anamnestic data. There is an obvious need for laboratory methods for objective assessment of

such gastrointestinal toxicity. Previous studies have demonstrated that the measurement of intestinal permeability may be used for detection and monitoring of the gastrointestinal toxicity of cytotoxic agents [1]. However, there are several factors limiting the use of intestinal permeability measurements in the assessment of gastrointestinal toxicity, and laboratory tests based on different principles are needed.

Vitamin A is absorbed in the small intestine [2]. The resulting marked rise in serum retinyl esters may be used for assessment of the function of the small bowel [3, 4].

Vitamin E represents a major antioxidant in serum [5, 6]. Administration of cytotoxic agents and, to a lesser extent, biological agents, may be associated with antioxidant stress. Disorders of antioxidant balance involving vitamin E may also be involved in the toxicity associated with radiotherapy [7] or chemotherapy [8].

In the present report we describe the development and validation of an HPLC method for determination of vitamin E, vitamin A, and retinyl esters in human serum using a silica monolithic column for the monitoring of side effects of anticancer therapy.

2 Experimental

2.1 Chemicals and reagents

All-*trans*-retinol and DL- α -tocopherol were obtained from Fluka (Prague, Czech Republic). Retinyl-acetate, retinyl-propionate, and retinyl-palmitate were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Retinyl-stearate was synthesized at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, using the modified method described by Huang and Goodman [9]. Slovakofarma vitamin A capsules (30 000 IU) from Zentiva (Hlohovec, Slovakia) were administered to patients during vitamin A absorption tests.

Vitamin A/E by HPLC Control Set from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) and the ClinChek-Control lyophilized human serum kit for HPLC analysis of vitamins A and E from Recipe (Recipe Chemicals + Instruments Labortechnik, Munich, Germany) were used for the validation process. HPLC-grade methanol and *n*-hexane for the preparation of standard solutions were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol denatured with 5% methanol for the deproteinisation procedure was obtained from Lachema (Brno, Czech Republic). Methanol and toluene of p.a. purity for the HPLC mobile phase were supplied by Penta (Prague, Czech Republic). HPLC gradient 2-propanol was obtained from Scharlau Chemie (Sentmenat, Spain). Helium 4.6 was purchased from Linde (Prague, Czech Republic).

2.2 Chromatography

The analyses were performed using a Perkin Elmer HPLC set-up (Norwalk, USA) comprising an LC 200 pump, an LC 200 autosampler, an LC Column Oven 101 thermostat, and an LC 235C Diode Array Detector attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. Separation of retinol, α -tocopherol, retinyl-palmitate, and retinyl-stearate was performed using a Chromolith Performance RP-18e, 100 \times 4.6 mm monolithic column Merck (Darmstadt, Germany). Gradient elution was used at a flow rate of 3 mL/min; mobile phase methanol-water (95 : 5, v/v) for 0–2.1 min and methanol-2-propanol (60 : 40, v/v) for 2.1–4.9 min. The total time of analysis was 6.0 min.

A block heater LC Oven 101 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) was utilized to keep the analytical column temperature at 25°C. The injection volume was 20 μ L. The DAD detection of retinol, α -tocopherol, retinyl-palmitate, and retinyl-stearate was carried out at 325, 295, and 330 nm, respectively.

2.3 Preparation of standards and samples

2.3.1 Standard solutions

Stock solutions of retinol and α -tocopherol standards were prepared as follows: a 500 μ mol/L retinol solution was prepared by dissolution in methanol; α -tocopherol standard was dissolved in *n*-hexane to prepare a solution of concentration 2000 μ mol/L. The stock solutions of retinyl esters (2000 μ mol/L) were prepared by dissolution in *n*-hexane. The stock solutions of retinol and retinyl esters were stored at –25°C. The stock solution of α -tocopherol standard was stored at 4°C.

For the calibration, working solutions of stock standards were diluted with methanol in volumetric flasks in the concentration ranges: 0.10–10.00 μ mol/L for retinol; 0.5–50.0 μ mol/L for α -tocopherol; 0.5–40.0 μ mol/L for retinyl-palmitate; and 0.5–20.0 μ mol/L for retinyl-stearate. The calibration was accomplished at six concentration levels. The stability of stock and working solutions of retinol and α -tocopherol was six months. The stability of stock and working solutions of retinyl esters was one month.

2.3.2 Vitamin A absorption test

For practical assessment of the method, the vitamin A absorption test was performed. Blood samples were drawn from the peripheral vein after a twelve-hour overnight fast and they were marked as sample one. These samples were centrifuged (1600 \times g, 10 min, 16°C) and the serum was separated and stored at –85°C. Then, a single oral dose of vitamin A (360 000 IU) was administered to patients. The second blood sample was collected five

Table 1. System suitability test.

	Theoretical plates (N)	Height equivalent of theoretical plate (HETP) (mm)	Tailing factor	Resolution
Retinol	3 771	26.52	1.16	7.456
α -Tocopherol	2 372	42.15	1.16	8.639
Retinyl-palmitate	60 814	1.64	1.06	3.380
Retinyl-stearate	73 202	1.37	1.25	–

Table 2. Intra-day precision of the method.

<i>n</i> = 10	Mean of area (unit) \pm SD	RSD (%)	Mean of retention time (min)	RSD (%)
Retinol	15 821.25 \pm 836.7	5.29	0.68 \pm 0.010	0.73
α -Tocopherol	13 899.25 \pm 929.1	6.68	2.18 \pm 0.041	1.92
Retinyl-palmitate	56 057.99 \pm 4539.4	8.10	4.48 \pm 0.014	0.33
Retinyl-stearate	19 783.51 \pm 1117.5	5.65	4.76 \pm 0.014	0.32

hours after administration of vitamin A and processed by the same procedure.

The institutional ethical committee approved the protocol of this study and all patients signed an informed consent to participate in the study.

2.3.3 Sample preparation

In the liquid-liquid extraction (LLE) procedure, 2500 μ L of *n*-hexane-toluene (8:2, v/v) mixture was added to 500 μ L of serum and extraction performed for 5 min with shaking. The mixture was deproteinized by cool ethanol denatured with 5% methanol (500 μ L, 5 min, 4°C) and extracted for 5 min by the same apparatus. After centrifugation (1600 \times g, 10 min, 0°C), an aliquot (2000 μ L) of the clear extract was taken. Another 2000 μ L of *n*-hexane-toluene (8:2, v/v) mixture was added to the rest of the serum sample to repeat the extraction process. The collected clear extract was evaporated down in a vacuum concentrator. Then the residue was dissolved in 100 μ L of *n*-hexane and 300 μ L of methanol and finally 20 μ L of the sample was injected onto the chromatographic column (The residues obtained after evaporation can be stored at –25°C and these samples are stable for three weeks under these conditions.)

3 Results

3.1 Method validation

Method validation was performed according to the European Pharmacopoeia [10] and the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines Q2A and Q2B [11, 12] consisting of two parts: System Suitability Test (SST) and Validation parameters.

3.1.1 System suitability test

Within the system suitability test (SST), some chosen parameters describing the separation properties of the

chromatographic system were determined. Table 1 summarizes the calculated values of the number of theoretical plates, height equivalent of a theoretical plate (HETP), tailing factor, and resolution.

3.1.2 Validation parameters

3.1.2.1 Precision

For the determination of method precision, ten samples prepared individually from one lyophilized human serum at a single concentration level were analyzed. The method precision expressed by repeatability of peak area and retention time was determined as the relative standard deviation (RSD) calculated from the obtained data. Table 2 lists the RSD values of retinol, α -tocopherol, retinyl-palmitate, and retinyl-stearate.

3.1.2.2 Accuracy

The accuracy of the method was tested as recovery, which was determined by performing three measurements at three concentration levels. The serum pool was spiked with 0.5 μ mol/L and 1.0 μ mol/L of retinol, 5.0 μ mol/L and 10.0 μ mol/L of α -tocopherol, 10.0 μ mol/L, 5.0 μ mol/L, and 10.0 μ mol/L of retinyl-palmitate, and 5.0 μ mol/L, 2.5 μ mol/L, and 5.0 μ mol/L of retinyl-stearate. The mean recovery (*n* = 3) was determined. All data are presented in Tables 3, 4, and 5.

3.1.2.3 Linearity

The linearity of the calibration curves was determined using the LINREGRE program developed at the Department of Biophysics and Physical Chemistry at the Faculty of Pharmacy, Charles University, at six concentration levels in the range of 0.1–10.0 μ mol/L for retinol, 0.5–50.0 μ mol/L for α -tocopherol, 0.5–40.0 μ mol/L for retinyl-palmitate, and 0.5–20.0 μ mol/L for retinyl-stearate. Each solution was injected into the column three times. The regression equations and correlation coefficients calcu-

Table 3. Recovery – Level 1.

n = 3	c_0 ($\mu\text{mol/L}$)	c_1 ($\mu\text{mol/L}$)	R_1 (%)
Retinol	0.98	0.82	83.7
α -Tocopherol	14.40	13.87	96.3
Retinyl-palmitate	10.00	9.70	97.0
Retinyl-stearate	5.00	4.50	90.0

c_0 – expected (calculated) concentration, c_1 – real concentration (measured value), $R_1 = 100 \cdot c_1/c_0$

Table 4. Recovery – Level 2.

n = 3	c_0 ($\mu\text{mol/L}$)	c_1 ($\mu\text{mol/L}$)	R_1 (%)
Retinol	0.50	0.48	96.0
α -Tocopherol	5.00	4.50	90.0
Retinyl-palmitate	15.00	15.60	104.0
Retinyl-stearate	7.50	11.06	88.5

c_0 – expected (calculated) concentration, c_1 – real concentration (measured value), $R_1 = 100 \cdot c_1/c_0$

Table 5. Recovery – Level 3.

n = 3	c_0 ($\mu\text{mol/L}$)	c_1 ($\mu\text{mol/L}$)	R_1 (%)
Retinol	1.00	0.96	96.0
α -Tocopherol	5.00	4.39	87.8
Retinyl-palmitate	20.00	19.26	96.3
Retinyl-stearate	10.00	10.06	100.6

c_0 – expected (calculated) concentration, c_1 – real concentration (measured value).

lated on the basis of data obtained for retinol, α -tocopherol, and retinyl esters are shown in Table 6.

3.1.2.4 Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) was defined as the compound concentration that produced a signal-to-noise ratio greater than five and the limit of quantification (LOQ) was evaluated as the concentration equal to ten times the value of the signal-to-noise ratio (Table 7).

3.1.2.5 Selectivity

For quantitation, the external standard method was applied instead of using retinyl-acetate or retinyl-propio-

Table 7. LOD and LOQ.

	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)
Retinol	0.04	0.08
α -Tocopherol	0.50	1.10
Retinyl-palmitate	9.40 ^{a)}	0.02
Retinyl-stearate	0.05	0.10

^{a)} nmol/L.

nate as internal standard, as is commonly done, because of possible contamination of patients' serum by these compounds. Vitamin A was administered to patients in the form of its acetate during the vitamin A absorption test. The good selectivity of this method for retinyl-acetate and retinyl-propionate and other compounds is documented in Fig. 1 and Table 1 together with the resolution values.

3.1.2.6 Stability

The stability of stock and working standard solutions of retinol, α -tocopherol, retinyl-palmitate, and retinyl-stearate was tested at room temperature, 4°C, and –25°C. The best stabilities were recorded at –25°C, i.e., six months for retinol and one month for retinyl esters. The stock and working solutions of α -tocopherol were stable for six months at 4°C.

3.1.2.7 Application of method

For practical assessment of the method, the vitamin A absorption test was performed on seven healthy controls as well as on six patients with non-small cell lung carcinoma or head and neck carcinoma previously treated by chemotherapy and/or radiotherapy, six patients with rectal carcinoma before chemoradiotherapy, four patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST) before treatment with imatinib, and a breast cancer patient with chemotherapy-induced diarrhea.

Serum concentrations of retinol, of retinyl esters before and after the vitamin A absorption test, and of α -tocopherol are shown in Table 8. Only a small increase in serum retinol was observed after oral administration of vitamin A. In contrast, the concentrations of retinyl esters rose markedly from pre-test concentrations that were often around the limits of detection. The increase

Table 6. Linearity.

	Equation	Correlation coefficient R	Residual deviation S_{res}	Reliability (%)
Retinol	$y = 18341x + 738.52$	0.9997	174	99.9
α -Tocopherol	$y = 1280x + 429.36$	0.9998	339	99.9
Retinyl-palmitate	$y = 6340x + 468.9$	0.9995	2210	99.9
Retinyl-stearate	$y = 5565x - 716$	0.9998	482	99.9

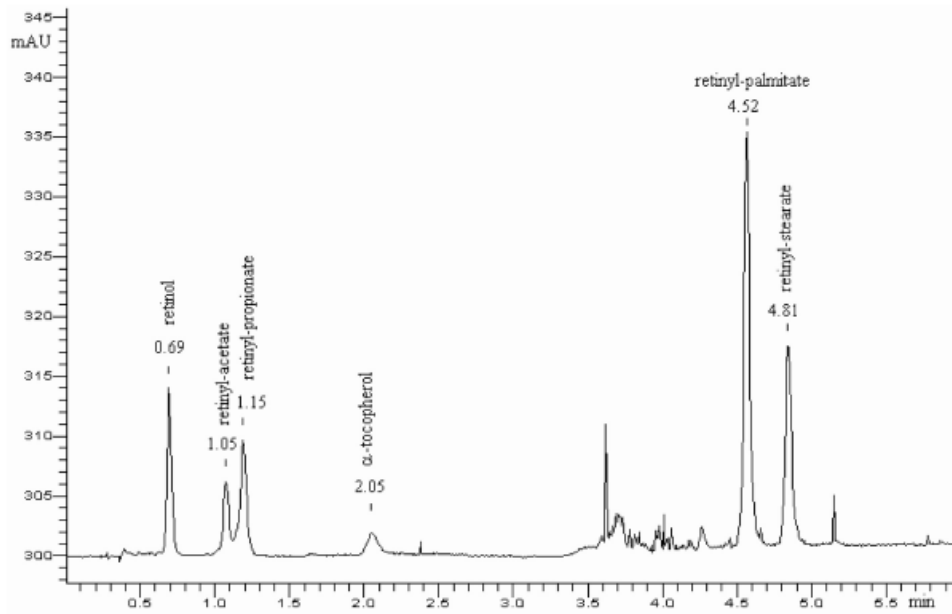


Figure 1. Selectivity of retinol, retinyl-acetate, retinyl-propionate, α -tocopherol, retinyl-palmitate and retinyl-stearate standards

Table 8. Clinical study.

	Healthy controls (n = 7)	Head and neck cancer patients and non-small cell lung cancer patients before gefitinib therapy (n = 6)	Metastatic GIST (n = 4)	Rectal carcinoma pa- tients before therapy (n = 7)
Retinol pre-test ($\mu\text{mol/L}$)	2.962 \pm 0.708 (1.935–3.864)	2.107 \pm 0.739 (1.054–3.254)	2.681 \pm 1.027 (1.679–4.109)	3.229 \pm 1.248 (2.032–5.779)
Retinyl-palmitate pre-test ($\mu\text{mol/L}$)	0.142 \pm 0.176 (0–0.496)	0.483 \pm 0.567 (0–1.326)	0.185 \pm 0.290 (0–0.610)	0.223 \pm 0.253 (0–0.670)
Retinyl-stearate pre-test ($\mu\text{mol/L}$)	0.277 \pm 0.211 (0–0.497)	0.198 \pm 0.174 (0–0.406)	0.172 \pm 0.200 (0–0.364)	0.173 \pm 0.168 (0–0.390)
α -Tocopherol post-test ($\mu\text{mol/L}$)	18.300 \pm 6.824 (9.839–29.804)	13.294 \pm 8.225 (1.485–26.362)	13.495 \pm 3.295 (11.085–18.366)	18.933 \pm 7.335 (5.311–28.446)
Retinol post-test ($\mu\text{mol/L}$)	3.485 \pm 1.169 (2.167–5.381)	2.164 \pm 0.888 ^{a)} (0.564–3.150)	3.317 \pm 0.806 (2.261–4.188)	3.625 \pm 1.545 (2.312–6.747)
Retinyl-palmitate post-test ($\mu\text{mol/L}$)	23.205 \pm 21.068 (2.808–63.231)	4.491 \pm 3.968 ^{b)} (0–10.905)	31.491 \pm 29.767 (6.312–67.964)	37.473 \pm 36.706 (4.211–107.593)
Retinyl-stearate post-test ($\mu\text{mol/L}$)	10.361 \pm 8.816 (1.503–25.773)	2.004 \pm 1.938 ^{a)} (0.233–5.602)	14.264 \pm 13.241 (2.698–31.013)	15.046 \pm 13.490 (1.900–38.897)
Retinol increase ($\mu\text{mol/L}$)	0.523 \pm 0.638 (–0.619–1.517)	0.057 \pm 0.342 (–0.490–0.390)	0.636 \pm 0.476 (0.079–1.242)	0.396 \pm 0.673 (–0.523–1.472)
Retinol increase (%)	16.5 \pm 19.0 (–21.8–39.3)	–0.33 \pm 25.0 (–46.5–23.8)	28.6 \pm 21.3 (1.9–53.1)	12.8 \pm 21.0 (–14.8–51.0)
Retinyl-palmitate increase ($\mu\text{mol/L}$)	23.057 \pm 21.073 (2.725–63.009)	4.008 \pm 3.869 ^{a)} (0–10.809)	31.297 \pm 29.717 (6.293–67.945)	37.241 \pm 36.707 (4.192–107.574)
Retinyl-palmitate increase (fold)	500.8 \pm 695.2 (16.0–1993.5)	24.0 \pm 44.0 ^{a)} (0–113.5)	1010.9 \pm 1715.3 (62.9–3577.1)	969.6 \pm 2074.6 (24.6–5662.8)
Retinyl-stearate increase ($\mu\text{mol/L}$)	10.055 \pm 8.751 (1.011–25.390)	1.772 \pm 1.886 ^{a)} (0.133–5.233)	14.042 \pm 13.185 (2.600–30.649)	14.830 \pm 13.450 (1.602–38.507)
Retinyl-stearate increase (fold)	39.4 \pm 24.7 (3.1–68.4)	9.0 \pm 6.3 ^{a)} (1.541–15.324)	78.3 \pm 78.6 (14.3–186.8)	86.9 \pm 83.8 (6.5–249.9)

^{a)} $p < 0.05$ compared to control group and both other cancer patient groups.

^{b)} $p < 0.05$ compared to control group and patients with rectal carcinoma.

^{c)} $p = 0.05$ compared to control group.

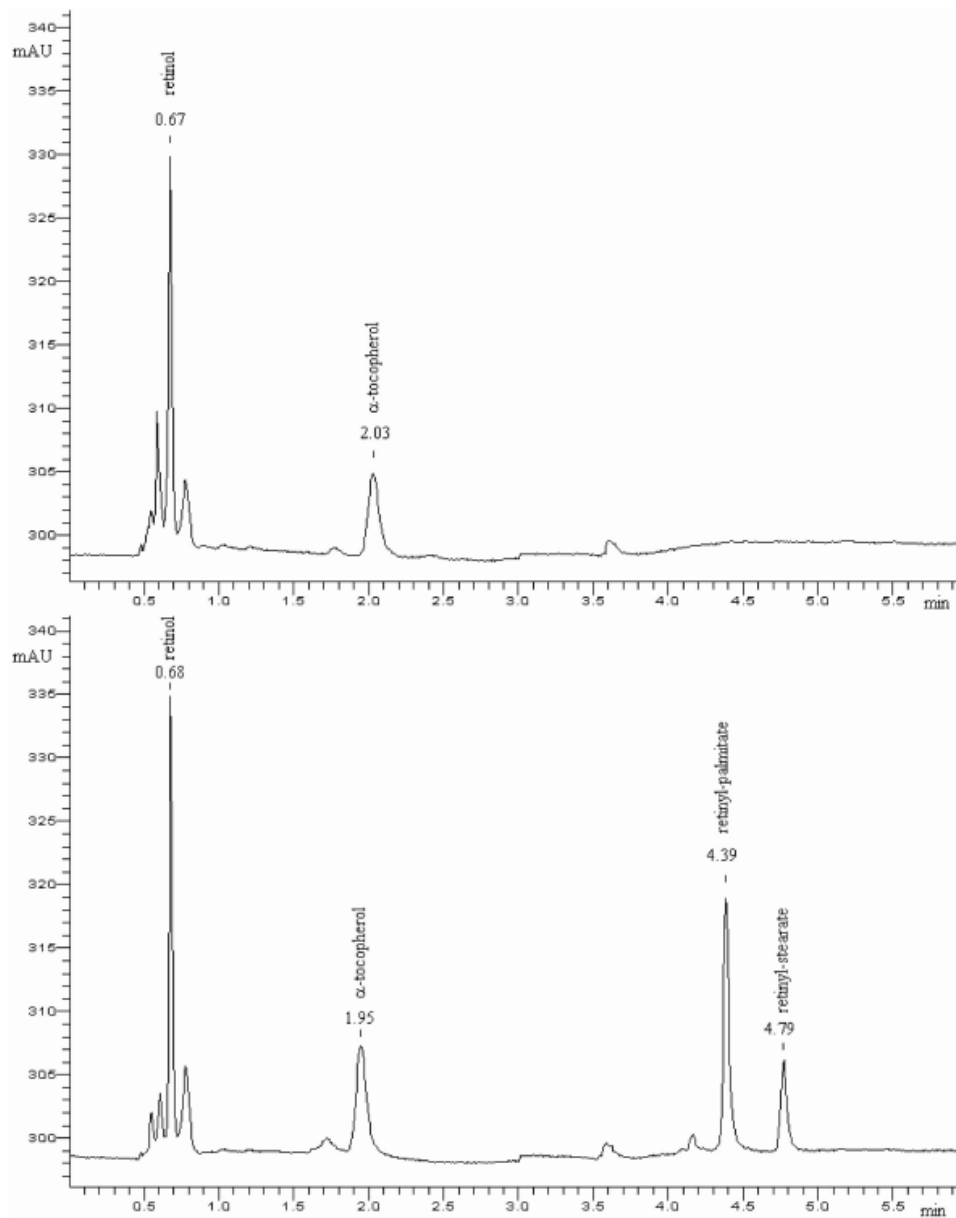


Figure 2. Retinol, retinyl-palmitate and retinyl-stearate before and after administration of vitamin A in a normal subject

was usually several hundred-fold for retinyl-palmitate and several dozen-fold for retinyl-stearate (the limit of quantitation was used to calculate the increase in the case of pre-test concentrations below the limit of quantitation). No differences were observed in post-absorption retinol and retinyl ester concentrations between the chemotherapy-naive patients with rectal carcinoma and GIST and controls. In contrast, compared to controls, patients with lung, head, and neck carcinomas exam-

ined before gefitinib therapy (all of them had been previously treated by chemotherapy and/or radiotherapy) had significantly lower concentrations of post-absorption retinyl esters while lower concentrations of post-absorption retinol were only of borderline significance. The retinyl esters, whether studied as post-absorption concentrations, absolute increase in concentration, or an increase expressed as a multiple of the original value, even in the present limited cohort allowed a clear dis-

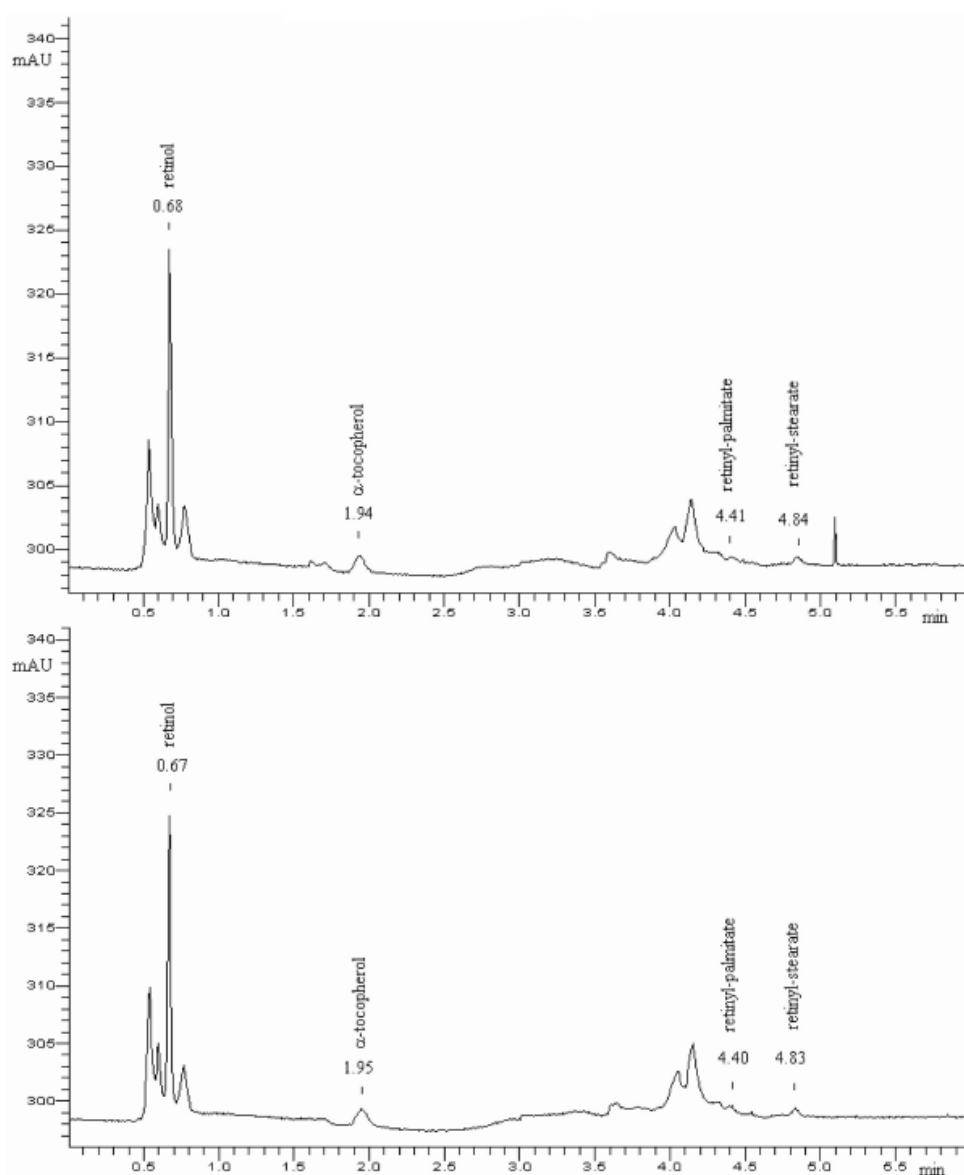


Figure 3. Retinol, retinyl-palmitate and retinyl-stearate before and after administration of vitamin A in a breast cancer patient with chemotherapy-induced diarrhea

inction between pretreated patients with lung or head and neck carcinomas, and other groups. The typical chromatograms of retinol, retinyl-palmitate, and retinyl-stearate before and after administration of vitamin A in a normal subject and a breast cancer patient with chemotherapy-induced diarrhea are shown in Figs. 2 and 3.

4 Discussion

Currently, many different methods are available for the determination of retinol, α -tocopherol, and retinyl esters

in biological samples [13–20]. Most of these procedures are expensive in terms of time and resources and the utilization of monolithic columns might thus be advantageous [21]. Although a number of studies have been published on the preparation, testing, and physical and chromatographic properties of monoliths [22–27], the number of articles dealing specifically with applications of monolithic columns in clinical practice is still relatively low despite a marked increase in the last three years [28]. These recent publications mostly cover analysis of drugs and metabolites [29–33], environmentally relevant sub-

stances [34], food additives [35–37], chiral separations [38], as well as bioanalytical separations [39–41]. In order to determine the above-mentioned micronutrients in biological material, a new, fast, and simple HPLC method using a monolithic column for clinical monitoring was developed and validated.

The determination of vitamin E, vitamin A, and retinyl esters may represent a valuable method for monitoring the toxicity of anticancer therapy. Present data indicate that the determination of retinyl esters (retinyl-palmitate and retinyl-stearate) may represent a sensitive tool to detect small bowel dysfunction associated with anticancer therapy. Moreover, the administration of vitamin E has been shown to alleviate some side effects of radiotherapy [7] or chemotherapy [8]. Serum vitamin E is not being routinely measured in cancer patients, but serial monitoring of vitamin E levels may be a prerequisite for any therapeutic use of this antioxidant vitamin. In routine monitoring, large numbers of samples need to be processed and a major advantage of the present method is the simultaneous determination of α -tocopherol, retinol, retinyl-palmitate, and retinyl-stearate in a relatively short time. The present method may therefore find use in large prospective studies evaluating the toxicity of currently used anticancer drugs or in monitoring the toxicity of a new agent.

Laboratory tests evaluating the intestinal toxicity of cytotoxic agents and the effect of interventions aimed at alleviating these side effects are urgently needed in medical practice. Intestinal permeability measurements may sometimes be associated with logistical problems, and may be impossible to perform or to interpret in some patients. Vitamin A absorption may represent an alternative to intestinal permeability measurement. Although vitamin A absorption has been used to monitor gastrointestinal disorders associated with malabsorption [3], this method has so far not been used to investigate gastrointestinal side effects of anticancer therapy. Present data indicate that the determination of retinyl-palmitate and/or retinyl-stearate represents a potentially useful test to detect gastrointestinal toxicity of chemotherapy. Prospective longitudinal studies should evaluate the utility of this method in monitoring the gastrointestinal toxicity of anticancer agents.

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic Project No NR/8048-3, Research Project MZO 00179906 and by the Ministry of Education of the Czech Republic, Project MSM 0021620822.

5 References

- [1] Melichar, B., Dvorak, J., Hyspler, R., Zadak, Z., *Chemotherapy* 2005, 51, 336–338.
- [2] Harrison, E. H., Hussain, M. M., *J. Nutr.* 2001, 131, 1405–1408.
- [3] Johnson, E. J., Krasinski, S. D., Howard, L. J., Alger, S. A., et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 1992, 55, 857–864.
- [4] v. Reinersdorff, D., Bush, E., Liberato, D. J., *J. Lipid Res.* 1996, 37, 1875–1885.
- [5] Debier, C., Larondelle, Y., *Br. J. Nutr.* 2005, 93, 153–174.
- [6] Stocker, P., Lesgards, J.-F., Vidal, N., Chalier, F., Prost, M., *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 2003, 1621, 1–8.
- [7] Delanian, S., Porcher, R., Balla-Mekias, S., Lefaix, J. L., *J. Clin. Oncol.* 2003, 21, 2545–2550.
- [8] Pace, A., Savarese, A., Picardo, M., Maresca, V., Pacetti, U., Del Monte, G., Biroccio, A., Leonetti, C., Jandolo, B., Cognetti, F., Bove, L., *J. Clin. Oncol.* 2003, 21, 927–931.
- [9] Huang, H. S., Goodman, D. S., *J. Biol. Chem.* 1965, 240, 2839–2844.
- [10] *European Pharmacopoeia 4th edition (Ph. Eur. 4)*, Council of Europe, Strasbourg 2001, Chromatographic Separation Techniques (2.2.46), 61.
- [11] International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: *Text on Validation of Analytical Procedures*, US FDA Federal Register, Vol. 60, March 1995, p. 11260.
- [12] International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, US FDA Federal Register, Vol. 62, March 1997, p. 27463.
- [13] DeRuyter, M. G. M., De Leenheer, A. P., *Clin. Chem.* 1978, 24, 1920–1923.
- [14] Bankson, D. D., Russell, R. M., Sadowski, J. A., *Clin. Chem.* 1986, 32, 35–40.
- [15] Barua, A. B., Furr, H. C., Janick-Buckner, D., Olson, J. A., *Food Chem.* 1993, 46, 419–424.
- [16] Sowell, A. L., Huff, D. L., Yeager, P. R., Caudill, S. P., Gunter, E. W., *Clin. Chem.* 1994, 40, 411–416.
- [17] van Breemen, R. B., Nikolic, D., Xu, X., Xiong, Y., van Lieshout, M., West, C. E., Schilling, A. B., *J. Chromatogr. A* 1998, 794, 245–251.
- [18] Barua, A. B., Olson, J. A., *J. Chromatogr. B* 1998, 707, 69–79.
- [19] Hartmann, S., Froescheis, O., Ringenbach, F., Wyss, R., et al., *J. Chromatogr. B* 2001, 751, 265–275.
- [20] Schmidt, C. K., Brouwer, A., Nau, H., *Anal. Biochem.* 2003, 315, 36–48.
- [21] Urbánek, L., Solichová, D., Melichar, B., Dvorák, J., et al., *Anal. Chim. Acta* 2006, 573–574, 267–272.
- [22] Miyabe, K., Guiochon, G., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 853–873.
- [23] Tanaka, N., Motokawa, M., Kobayashi, H., Hosoya, K., Ikegami, T., in: Švec, F., Tennikova, T. B., Deyl, Z. (Eds.), *Monolithic Materials Preparation, Properties and Applications*, Elsevier, Amsterdam 2003, pp. 173–196.
- [24] Tenikova, T. B., Reusch, J., *J. Chromatogr. A* 2005, 1065, 13–17.
- [25] Coufal, P., Cihák, M., Suchánková, J., Teasarová, E., Bosáková, Z., Štulík, K., *J. Chromatogr. A* 2002, 946, 99–106.
- [26] Randon, J., Huguet, S., Piram, A., Puy, G., Demesmay, C., Rocca, J.-L., *J. Chromatogr. A* 2006, 1109, 19–25.
- [27] Courtois, J., Byström, E., Irgum, K., *Polymer* 2006, 47, 2603–2611.
- [28] Cabrera, K., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 843–852.

- [29] Nováková, L., Matysová, L., Solichová, D., Koupparis, M. A., Solich, P., *J. Chromatogr. B* 2004, 813, 191–197.
- [30] Hefnawy, M. M., Aboul-Enein, H. Y., *Anal. Chim. Acta* 2004, 504, 291–297.
- [31] Geber, F., Krummen, M., Potgeter, H., Roth, A., et al., *J. Chromatogr. A* 2004, 1036, 127–133.
- [32] Bugey, A., Staub, Ch., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 35, 555–562.
- [33] Karlsen, A., Blomhoff, R., Gundersen, T. E., *J. Chromatogr. B* 2005, 824, 132–138.
- [34] Yazdi, A. S., Es'haghi, Z., *J. Chromatogr. A* 2005, 1082, 136–142.
- [35] Pól, J., Hyötyläinen, T., Ranta-Aho, O., Riekkola, M.-L., *J. Chromatogr. A* 2004, 1052, 25–31.
- [36] van Nederkassel, A. M., Daszykowski, M., Massart, D. L., Vander Heyden, Y., *J. Chromatogr. A* 2005, 1096, 177–186.
- [37] Vian, M. A., Tomao, V., Gallet, S., Coulomb, P. O., Lacombe, J. M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1085, 224–229.
- [38] Chen, Z., Uchiyama, K., Hobo, T., *J. Chromatogr. A* 2002, 942, 83–91.
- [39] van de Merbel, N. C., Poelman, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 495–504.
- [40] Xiong, L., Zhang, R., Regnier, F. E., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030, 187–194.
- [41] Božek, P., Hutta, M., Hrivnáková, B., *J. Chromatogr. A* 2005, 1084, 24–32.

7.3. Příloha 3

Urinary neopterin in patients with liver tumors

Bohuslav Melichar, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Lubor Urbánek, Pavel Veselý
and Karolina Melicharová

Tumori, 92,2006, str. 318-322

URINARY NEOPTERIN IN PATIENTS WITH LIVER TUMORS

Bohuslav Melichar^{1,2}, Dagmar Solichová³, Iveta Svobodová³, Lubor Urbánek³, Pavel Veselý¹, and Karolína Melicharová³

¹Department of Oncology and Radiotherapy, ²Department of Medicine, ³Department of Gerontology and Metabolic Care, Charles University Medical School Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Aims and background: Primary and secondary liver tumors are associated with poor prognosis. Neopterin is an indicator of systemic immune activation, and increased neopterin concentrations have been associated with poor prognosis in a wide range of malignant tumors.

Methods: Urinary neopterin was determined by high-performance liquid chromatography in 154 patients with primary and secondary liver tumors. The survival of different groups of patients was compared by log-rank test, and Cox regression was used for multivariate analysis.

Results: Urinary neopterin was significantly increased in patients compared to controls. A statistically significant correlation was observed between urinary neopterin and age of the patients, hemoglobin concentration, mean erythrocyte volume and peripheral blood leukocyte or platelet count. In univariate analysis, uri-

Key words: liver, metastases, neopterin.

nary neopterin below 214 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine, peripheral blood leukocytes below $8 \times 10^9/\text{L}$, hemoglobin equal to or above 125 g/L, no extrahepatic tumor, stage of liver involvement, and colorectal, breast or ovarian primary were significant prognostic factors for survival. In multivariate analysis, Bengtsson stage, presence of extrahepatic involvement, primary other than colorectal, breast or ovarian carcinoma, peripheral blood leukocyte count and urinary neopterin were independent prognostic factors. Increased urinary neopterin during and at the end of follow-up was also associated with poor prognosis.

Conclusions: Urinary neopterin is increased in patients with liver tumors. Neopterin is an independent prognostic indicator in patients with liver tumors along with Bengtsson stage, presence of extrahepatic disease, primary site and peripheral blood leukocyte count.

Introduction

The liver is the most common site of metastatic disease. The prognosis of patients with liver metastases is poor, and, with the exception of brain metastases, usually worse than the prognosis of patients with metastatic involvement of other organs¹. Liver resection offers the only chance of cure, but even in patients undergoing radical resection for liver metastases the long-term cure rate is well below 50%. Liver resection is possible only in a minority of patients, and in patients treated with non-surgical therapies including hepatic arterial infusion and systemic chemotherapy, long-term survival is rare². The median survival of untreated patients is around 6 months, but with the advent of effective chemotherapy, the median survival is now more than 12 months in patients with liver metastases of some types of primary tumors, notably colorectal carcinoma³ and breast carcinoma⁴.

In the Western world, primary liver tumors are much less common than liver metastases. The prognosis of patients with primary liver cancer is also poor, with median survival of untreated patients again in the range of 6 months. As in patients with liver metastases, radical resection is the only curative treatment and is, unfortunately, possible only in a minority of patients.

Advanced tumors are associated with increased concentrations of neopterin in urine or serum, and high neopterin levels have been associated with poor prognosis⁵. Neopterin is produced by macrophages activated by interferon gamma and elevated neopterin concentrations have been observed in patients with different primary tumors⁶, including primary liver tumors^{7,8}, but the information on the prognostic significance of urinary neopterin in primary and secondary liver tumors is still limited. Increased neopterin concentrations have also been reported in patients with benign liver disorders^{9,10}. In the present study, we evaluated urinary neopterin in patients with primary and metastatic liver cancer.

Material and methods

A retrospective analysis was performed of urinary neopterin measurements performed between 1998 and 2000 as part of a research project approved by the institutional ethics committee, in which immune system activation in patients with liver tumors was evaluated. Urine samples were collected from 154 patients, 88 men and 66 women aged 60 ± 11 years (range, 26-79 years) with histologically verified malignant liver tumors, treated at the Department of Oncology and Radiotherapy, Charles University Medical School Teach-

Acknowledgements: Supported by Research Project MZO 00179906 and a grant of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR 8156-3.

Correspondence to: Bohuslav Melichar, MD, PhD, Department of Oncology and Radiotherapy, Charles University Medical School Teaching Hospital, Building 23, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic. Tel +420-49-5834574; fax +420-49-5832081; e-mail melichar@fnhk.cz

Received December 2, 2005; accepted March 6, 2006.

ing Hospital, and 33 healthy controls, 16 men and 17 women aged 49 ± 13 years (range, 28-88 years). One hundred and twenty-four patients had metastatic liver tumors (39 patients with isolated liver metastases), and 30 patients had primary liver tumors (including patients with biliary tract tumors). Sixty-four patients were chemotherapy naïve and 90 patients had received previous therapy. One hundred and twenty patients were examined before the start of the first or subsequent line of therapy. In all of these 120 patients, the stage of liver metastases was determined based on imaging studies or surgical protocols according to the criteria described earlier¹¹. Briefly, stage 1 was defined as involvement of less than 25% of the liver parenchyma restricted to one lobe, stage 2 as involvement of 25% to 75% of the liver parenchyma, and stage 3 as involvement of more than 75% of the liver parenchyma.

Morning urine specimens were collected and stored at -20°C until analysis (within 3 months of sample collection). Urinary neopterin was measured by high-performance liquid chromatography. Creatinine was determined by the Jaffé reaction, and the results were expressed as neopterin/creatinine ratio ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine) as described earlier¹². Peripheral blood cell count was performed as described¹³. Hemoglobin was measured by a photometric method using sodium lauryl sulfate; leukocytes were detected by flow cytometry and platelets by impedance method using a Sysmex XE-2100 blood analyzer (Sysmex, Kobe, Japan).

The survival was measured from the time of sample collection to death or last follow-up. No patients were lost to follow-up and the last visit of surviving patients was in 2005. The survival of patients was analyzed by the Kaplan-Meier method and survival of different groups of patients was compared by the log-rank test. Urinary neopterin concentrations of patients and controls were compared by the Mann-Whitney *U* test, neopterin before and during the treatment was compared by the Wilcoxon signed rank test, and correlations between urinary neopterin and hematological pa-

rameters were investigated by Spearman's rank correlation. Multivariate analysis was performed using the Cox regression analysis with the results expressed as hazard ratio (HR). Statistical significance was based on a $P \leq 0.05$ significance level. The analyses were performed using NCSS 2001 software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA).

Results

Urinary neopterin was significantly increased in 120 patients with liver tumors studied before the start of therapy compared with 33 controls (186 ± 170 vs 110 ± 52 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine, Mann-Whitney *U* test, $P = 0.001$). However, when the comparison was restricted to individual primary sites, a statistically significant difference compared to controls was observed only in patients with colorectal carcinoma and cholangiocarcinoma (Table 1). No statistically significant difference was observed in urinary neopterin levels between patients with and without extrahepatic tumor (201 ± 174 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine vs 164 ± 162 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine) nor between chemotherapy-naïve and previously treated patients (181 ± 147 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine vs 192 ± 193 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine). When the patients were divided based on the chemosensitivity of the primary tumor into a group with tumors of higher chemosensitivity (colorectal, breast and ovarian carcinoma) and a group with tumors of lower chemosensitivity (other primaries), urinary neopterin was significantly higher compared to controls in both of these groups.

Urinary neopterin exhibited a weak but statistically significant correlation with age of the patients, hemoglobin concentration, mean erythrocyte volume and peripheral blood leukocyte or platelet count (Table 2).

The median survival of 120 patients evaluated before the start of therapy was 11 months. Nine patients were alive at the time of writing with a follow-up between 67 and 85 months. Survival was significantly longer in patients with urinary neopterin below 214 $\mu\text{mol/mol}$ crea-

Table 1 - Urinary neopterin ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine) in 120 patients with liver metastases of different primaries evaluated before the start of treatment

Primary	No. of patients	Mean \pm standard deviation	Range	No. of patients with urinary neopterin ≥ 214 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (%)	<i>P</i> (compared to controls)	Mean \pm standard deviation
Colorectal carcinoma	62	190 ± 172	42 - 1122	17 (27)	0.0009	$187 \pm 180^*$
Breast carcinoma	10	118 ± 50	44 - 206	0 (0)	NS	
Ovarian carcinoma	5	275 ± 369	41 - 930	1 (20)	NS	
Cholangiocarcinoma	12	175 ± 94	70 - 361	3 (25)	0.016	$186 \pm 153^*$
Gallbladder carcinoma	4	218 ± 127	83 - 332	2 (50)	NS	
Hepatocellular carcinoma	6	157 ± 87	39 - 240	3 (50)	NS	
Adrenal carcinoma	1	969	-	1 (100)	-	
Carcinoid	1	87	-	0 (0)	-	
Gastric carcinoma	4	170 ± 94	47 - 258	2 (50)	NS	
Lung carcinoma	2	136 ± 77	81 - 190	0 (0)	-	
Melanoma	6	165 ± 120	73 - 369	2 (33)	NS	
Pancreatic carcinoma	5	134 ± 76	42 - 224	1 (20)	NS	
Renal cell carcinoma	1	288	-	1 (100)	-	
Unknown	1	121	-	0 (0)	-	

NS, not significant; * $P < 0.01$.

Table 2 - Correlations of urinary neopterin with age and hematological parameters in 120 patients evaluated before the start of treatment

Variable	Mean \pm standard deviation	Correlation with urinary neopterin (r_s)	<i>P</i>
Age (years)	60 \pm 11	0.304	0.0007
Leukocytes ($10^9/L$)	9.0 \pm 3.2	0.256	0.005
Hemoglobin (g/L)	126 \pm 17	-0.221	0.02
Mean erythrocyte volume (fl)	89 \pm 8	-0.186	0.04
Platelets ($10^9/L$)	291 \pm 121	0.176	0.05

tinine (Figure 1), peripheral blood leukocytes below $8 \times 10^9/L$, hemoglobin equal or above 125 g/L, patients without extrahepatic tumor, and patients with colorectal, breast or ovarian primaries (Table 3). Bengtsson stage was also associated with significant differences in

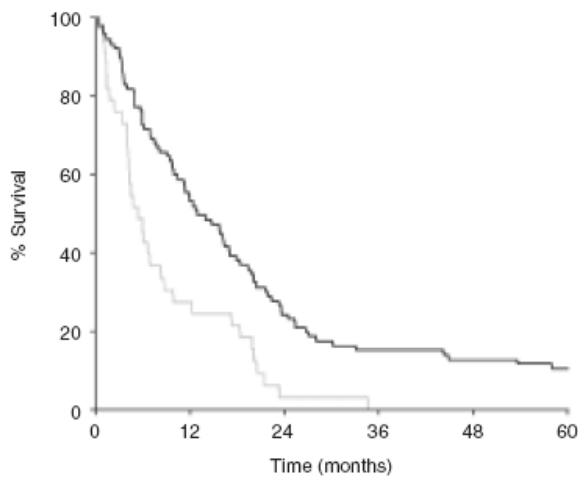


Figure 1 - Survival of patients with urinary neopterin $<214 \mu\text{mol/mol}$ creatinine (bold line) and $\geq 214 \mu\text{mol/mol}$ creatinine (dashed line).

survival. On multivariate analysis, Bengtsson stage, presence of extrahepatic involvement, primary other than colorectal, breast or ovarian carcinoma, peripheral blood leukocyte count below $8 \times 10^9/L$, and urinary neopterin below $214 \mu\text{mol/mol}$ creatinine were independent prognostic factors (Table 4).

Urinary neopterin exhibited a consistent, marked and statistically significant increase after interleukin-2-based immunotherapy in 7 patients (332 ± 303 vs $830 \pm 331 \mu\text{mol/mol}$ creatinine, $P = 0.02$). In contrast, no significant change was observed after 5-fluorouracil-based chemotherapy administered systemically ($n = 16$) or as hepatic arterial infusion ($n = 10$; data not shown). Urinary neopterin also predicted survival when measured during the course of therapy. In 99 patients, 2 and more (mean 6 ± 5 , median 5) urinary neopterin measurements were available during a mean follow-up of 6 ± 5 (median 4) months. Mean urinary neopterin was significantly higher in the last compared to the first measurement (215 ± 176 vs $181 \pm 238 \mu\text{mol/mol}$ creatinine, $P = 0.001$). The patients with a final neopterin value below $214 \mu\text{mol/mol}$ creatinine had a significantly better

Table 4 - Multivariate analysis of prognostic indicators

Parameter	Hazard ratio	95% confidence interval	<i>P</i>
Bengtsson stage 1 (yes vs no)	0.48	0.29 - 0.79	0.004
Bengtsson stage 3 (no vs yes)	0.35	0.19 - 0.64	0.0008
Extrahepatic tumor (no vs yes)	0.54	0.36 - 0.81	0.003
Primary other than colorectal, breast or ovarian carcinoma (yes vs no)	1.75	1.17 - 2.62	0.006
Leukocytes ($< vs \geq 8 \times 10^9/L$)	0.56	0.37 - 0.85	0.006
Urinary neopterin ($< vs \geq 214 \mu\text{mol/mol}$ creatinine)	0.59	0.38 - 0.92	0.02

Table 3 - Univariate analysis of prognostic indicators

Parameter	Cutoff for survival analysis	Median survival (months)	<i>P</i> (log-rank test)
Urinary neopterin ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine)	$<214 \mu\text{mol/mol}$ creatinine ($n = 87$) vs $\geq 214 \mu\text{mol/mol}$ creatinine ($n = 33$)	13 vs 6	0.002
Leukocytes ($10^9/L$)	$<8 \times 10^9/L$ ($n = 52$) vs $\geq 8 \times 10^9/L$ ($n = 68$)	16 vs 6	0.002
Hemoglobin (g/L)	$<125 \text{ g/L}$ ($n = 51$) vs $\geq 125 \text{ g/L}$ ($n = 69$)	8 vs 12	0.009
Mean erythrocyte volume (fl)	$<84 \text{ fl}$ ($n = 30$) vs $\geq 84 \text{ fl}$ ($n = 90$)	9 vs 11	0.16
Platelets ($10^9/L$)	$<270 \times 10^9/L$ ($n = 58$) vs $\geq 270 \times 10^9/L$ ($n = 62$)	11 vs 10	0.10
Extrahepatic tumor	no ($n = 47$) vs yes ($n = 73$)	18 vs 8	0.006
Bengtsson stage	1 ($n = 28$) 2 ($n = 78$) 3 ($n = 14$)	23 11 5	0.0004
Primary	group 1* ($n = 77$) vs 2** ($n = 43$)	16 vs 6	0.04
Age (years)	<65 years ($n = 73$) vs ≥ 65 years ($n = 47$)	12 vs 8	0.59
Sex	female ($n = 47$) vs male ($n = 73$)	10 vs 11	0.46
Previous therapy	yes ($n = 56$) vs no ($n = 64$)	13 vs 10	0.73

*Colorectal, breast or ovarian carcinoma; **primaries other than colorectal, breast or ovarian carcinoma.

prognosis (median survival 9 vs 4 months, $P = 0.002$). When the earliest other measurement (excluding measurements after cytokine therapy) was evaluated in 80 of the 120 patients studied before the start of therapy as well as in 34 additional patients studied during treatment, urinary neopterin below 214 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine was again predictive of longer survival (median 16 vs 7 months, $P = 0.0006$).

Discussion

In the present study, significantly increased urinary neopterin concentrations were observed in the whole group of patients with liver tumors compared to controls. This observation is not unexpected, as elevated urinary or serum neopterin concentrations have been reported in patients with hepatocellular carcinoma⁸ as well as in patients with tumors metastasizing to the liver⁵. Because of the overlap of urinary neopterin concentrations observed in patients with a normal range of urinary neopterin values, urinary neopterin determination may not be helpful in the diagnosis of tumor or distant (in this case liver) metastases, but the present data confirm that systemic immune activation, reflected by increased neopterin concentrations, is an independent indicator of poor prognosis in cancer patients⁵. Increased serum neopterin concentrations were also associated with shorter survival in patients with hepatic cirrhosis¹⁰.

When individual primary sites were distinguished, significantly increased urinary neopterin concentrations were observed only in patients with colorectal carcinoma and cholangiocarcinoma, but the numbers of patients with other primaries were too small to allow comparison. The increased urinary neopterin in patients with colorectal carcinoma liver metastasis found in the present study confirms our earlier report¹⁴. Little is known about neopterin in patients with cholangiocarcinoma. In the one study published so far, increased urinary neopterin was observed in 8 of 9 patients with biliary tract carcinoma¹⁵, and the present data are in agreement with this report.

Other independent prognostic factors in the present study included Bengtsson stage of liver metastases, presence of extrahepatic tumor, site of the primary, and peripheral blood leukocyte count. The staging system of liver metastases was originally established by Bengtsson *et al.* in patients with hepatic metastases of colorectal carcinoma¹¹. Three distinct categories may be distinguished based on the extent of hepatic involvement by the metastatic tumor. The Bengtsson classification of liver metastases is similar to the staging of primary liver tumors, and to allow comparisons among patients with primary and secondary liver tumors, the Bengtsson classification was used in the present study for primary liver tumors as well. Significant differences were observed in univariate as well as multivariate analysis for all 3 stages of liver metastases. The present data indicate that this system might be applicable also to liver

tumors other than metastases of colorectal carcinoma. However, about a half of the patients in the present study had colorectal carcinomas and the prognostic significance of the Bengtsson classification should be assessed in a separate study in patients with non-colorectal primaries.

The presence of extrahepatic tumor was also an independent prognostic indicator, in agreement with earlier reports on patients with liver metastases of colorectal carcinoma^{16,17} or breast carcinoma^{4,18}. It is evident from the present data that the site of the primary is another independent prognostic indicator. The liver metastases of chemosensitive primary tumors (breast, ovarian and colorectal carcinoma) were associated with a better prognosis. However, patients with non-colorectal primaries were underrepresented in the present study, and the prognosis of liver metastases of individual primary tumors should be assessed in a larger population. It is possible that multiple prognostic groups based on primary tumor site may be identified in patients with liver tumors, but in the present study the limited number of patients with non-colorectal primaries allowed only the distinction into two groups.

Besides neopterin, the only laboratory parameter shown to be an independent prognostic indicator was peripheral blood leukocyte count. This is in agreement with previous reports. For example, peripheral blood leukocyte or neutrophil counts were shown to be of prognostic significance in patients with advanced colorectal carcinoma (mostly with liver metastases)^{19,20}. The results of the present study indicate that a prognostic system of liver tumors in which factors based on primary, extent of hepatic involvement and presence of extrahepatic tumor along with parameters indicative of host response (peripheral blood leukocyte count and neopterin) may help to stratify patients for therapeutic decisions. Future studies in a larger cohort with a larger number of patients with non-colorectal primaries should address the feasibility of such a prognostic system.

A significant correlation has been observed between urinary neopterin and the age of the patients. This observation is supported by our earlier study demonstrating increased concentrations and prognostic significance of urinary neopterin in elderly subjects¹³. The mechanism behind the association of increased neopterin concentrations with aging is still not fully clarified²¹. It may be related to the age-dependent increase in the incidence of some common chronic disorders associated with immune activation (including increased neopterin production), i.e., atherosclerosis¹², which may be unrecognized in individual patients at the time of evaluation. In addition, there is evidence of immune dysregulation at multiple levels in older persons linked to immune activation²². This dysregulation of the immune system is reflected, among other parameters, by increased production of neopterin. The present data demonstrate that the relationship between neopterin and age is found not only in apparently healthy subjects but also in patients with cancer^{4,11}.

A weak but statistically significant correlation has been observed between urinary neopterin and hemoglobin, mean erythrocyte volume, and peripheral blood leukocyte or platelet count. Decreased hemoglobin concentrations in anemia of chronic disease in cancer patients result from the alterations of iron metabolism associated with acute phase response and direct inhibition of hematopoietic progenitors by cytokines responsible for systemic inflammatory and immune response, i.e., interferon gamma or tumor necrosis factor alpha²³. A negative correlation between serum neopterin concentrations and hemoglobin has been previously observed in patients with hematological and gynecological malignancies^{24,25}, and the present data extend the association between systemic immune response and anemia to patients with pri-

mary and secondary liver tumors. The correlations between urinary neopterin and peripheral blood leukocyte or platelet count reflect an association between different parameters of the systemic inflammatory and immune response. Systemic inflammatory activity is associated with thrombocytosis, and pro-inflammatory cytokines, i.e., interleukin-6, are involved in thrombopoiesis²⁶.

In conclusion, urinary neopterin is increased in patients with liver tumors. Neopterin is an independent prognostic indicator in patients with liver tumors along with Bengtsson stage, presence of extrahepatic disease, primary site and peripheral blood leukocyte count. A weak but statistically significant correlation was found between urinary neopterin and hemoglobin, peripheral blood leukocyte or platelet count.

References

- Pierga JY, Robain M, Jouve M, Asselain B, Dieras V, Beuzeboc P, Palangie T, Dorval T, Extra JM, Scholl S, Pouillart P: Response to chemotherapy is a major parameter-influencing long-term survival of metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol*, 12: 231-237, 2001.
- Melichar B, Voboril Z, Cerman J, Melicharova K, Nozicka J, Mergancová J, Voboril R, Jandik P: Hepatic arterial infusion chemotherapy in gastric cancer: A report of four cases and analysis of the literature. *Tumori*, 90: 428-434, 2004.
- Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesch M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A: FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*, 22: 229-237, 2004.
- Zinser JW, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Smith TL, Frascchini G: Clinical course of breast cancer patients with liver metastases. *J Clin Oncol*, 5: 773-782, 1987.
- Reibnegger G, Fuchs D, Fuiith LC, Hausen A, Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H: Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease. *Cancer Detect Prev*, 15: 483-490, 1991.
- Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER: Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem*, 27: 81-141, 1989.
- Tsuda Y, Fukuda A, Kobayashi H, Itou D, Yoshimoto S, Iwata K, Hanafusa T: Serum neopterin as a marker for screening of hepatocellular carcinoma. *Pteridines*, 15: 161-169, 2004.
- Kawasaki H, Watanabe H, Yamada S, Watanabe K, Suyama A: Prognostic significance of urinary neopterin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Tohoku J Exp Med*, 155: 311-318, 1988.
- Yaman H, Cakir E, Ozcan O, Yesilova Z, Ozcan A, Akgul EO, Erbil MK, Bagci S, Bilgi C, Dagalp K: Elevated urine neopterin levels in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem*, 38: 187-190, 2005.
- Homann C, Benfield TL, Graudal NA, Garred P: Neopterin and interleukin-8-prognosis in alcohol-induced cirrhosis. *Liver*, 20: 442-449, 2000.
- Bengtsson G, Carlsson G, Hafstrom L, Jonsson PE: Natural history of patients with untreated liver metastases from colorectal cancer. *Am J Surg*, 141: 586-589, 1981.
- Cermanova M, Melichar B, Solichova D, Blaha M, Blaha V, Blazek M, Masin V, Cerman J, Zadak Z: Urinary neopterin and microalbuminuria in patients treated with low-density lipoprotein apheresis. *Pteridines*, 16: 174-183, 2005.
- Solichova D, Melichar B, Blaha V, Klejna M, Vavrova J, Palicka V, Zadak Z: Biochemical profile and survival in nonagenarians. *Clin Biochem*, 34: 563-569, 2001.
- Melichar B, Jandik P, Solichova D, Bures J, Lukes J, Mergancova J, Voboril Z: Urinary neopterin excretion in colorectal cancer. *Onkologie*, 17: 434-436, 1994.
- Conrad F, Bodner E, Fuchs D, Grubauer G, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H: Determination of neopterin - a marker of cellular immunity - in gastrointestinal and pancreatic carcinoma. In: *Biochemical and clinical aspects of pteridines*, Pfeleiderer W, Wachter H, Curtius C (Eds), pp 357-366, Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1984.
- Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Charnley RM, Scheele J: Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet*, 343: 1405-1410, 1994.
- Rougier P, Milan C, Lazorthes F, Fournatier G, Partensky C, Baumel H, Faivre J: Prospective study of prognostic factors in patients with unresected hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg*, 82: 1397-1400, 1995.
- Hoe AL, Royle GT, Taylor I: Breast liver metastases - incidence, diagnosis and outcome. *J Roy Soc Med*, 84: 714-716, 1991.
- Kemeny N, Braun DW: Prognostic factors in advanced colorectal carcinoma. Importance of lactic dehydrogenase level, performance status, and white blood cell count. *Am J Med*, 74: 786-794, 1983.
- Melichar B, Kohlova T, Vesely P: Survival after oxaliplatin therapy of irinotecan-pretreated advanced colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology*, 52: 1707-1714, 2005.
- Schennach H, Murr C, Gächter E, Mayersbach P, Schönitzer D, Fuchs D: Factors influencing serum neopterin concentrations in a population of blood donors. *Clin Chem*, 48: 643-645, 2002.
- Fahey JL, Schnelle JF, Boscardin J, Thomas JK, Gorre ME, Aziz N, Sadeghi H, Nishanian P: Distinct categories of immunologic changes in frail elderly. *Mech Ageing Dev*, 115: 1-20, 2000.
- Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Dierich M, Wachter H: Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. *Eur J Haematol*, 46: 65-70, 1991.
- Denz H, Fuchs D, Huber H, Nachbauer D, Reibnegger G, Thaler J, Werner ER, Wachter H: Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders. *Eur J Haematol*, 44: 186-189, 1990.
- Wachter H, Artner-Dworzak E, Fuchs D, Fuiith LC, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Dierich MP: Association between neopterin and iron metabolism in cancer patients. *Tumor Diagn Ther*, 11: 229-232, 1990.
- Kaser A, Brandacher H, Steuer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, Theurl I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins MB, Mier JW, Tilg H: Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*, 98: 2720-2725, 2001.

7.4. Příloha 4

Urinary neopterin in patients with ovarian cancer

Bohuslav Melichar, Lubor Urbanek, Lenka Krcmová, Hana Kalabova, Iveta

Svobodova, Emanuela Dragounova, Pavel Vesely, Radomír Hyspler, Dagmar Solichova

Pteridines, 17, 2006, str. 145-153

Pteridines
Vol. 17, 2006, pp. 145 - 153

Urinary Neopterin in Patients with Ovarian Cancer

Bohuslav Melichar^{1,2}, Lubor Urbanek³, Lenka Krcmová³, Hana Kalabova¹, Iveta Svobodova³,
Emanuela Dragounova⁴, Pavel Vesely¹, Radomír Hyspler³, Dagmar Solichova³

Departments of ¹Oncology & Radiotherapy, ²Medicine, ³Gerontology & Metabolic Care, and ⁴Gynecology & Obstetrics, Charles University Medical School & Teaching Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic

Abstract

Urinary neopterin, an indicator of systemic immune activation, is increased in most patients with epithelial ovarian carcinoma (EOC) and is an independent prognostic indicator. The data on prognostic significance of neopterin in EOC have been collected before the advent of paclitaxel that has changed the management and natural history of the disease. In the present study, we have evaluated the prognostic significance of urinary neopterin in 49 patients with primary and secondary ovarian neoplasms treated in the late 1990s and in 2000s. Urinary neopterin was measured by high-performance liquid chromatography. Compared to controls, urinary neopterin was significantly increased in patients with both primary ovarian cancer and ovarian metastases of other tumors (341 ± 343 , and 328 ± 277 vs. 133 ± 40 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine; $p < 0.001$). Serious toxicity of chemotherapy was observed in 8 out of 12 (67%) patients with urinary neopterin equal or above 338 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (mean of all patients) compared to 2 of 19 (11%) of patients with urinary neopterin below 338 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (Fisher exact test, $p = 0.001$). No significant changes were observed in urinary neopterin concentrations during the treatment with paclitaxel/platinum. A significant correlation was observed between urinary neopterin and percentage of xylose absorbed ($r_s = -0.58$, $p = 0.03$), and positive correlations were observed between urinary neopterin and lactulose/mannitol ($r_s = 0.63$, $p = 0.02$), lactulose/xylose ($r_s = 0.79$, $p = 0.0007$) and sucrose/xylose ($r_s = 0.60$, $p = 0.02$) ratios. Survival was significantly longer in patients with urinary neopterin below 338 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine in the whole group of 49 patients with ovarian cancer, in 36 patients with primary ovarian cancer as well as in 13 patients in ovarian metastases of other primary tumors. A significant difference in survival was also observed when 37 pretreated patients or 24 pretreated EOC patients were evaluated ($p = 0.05$). In conclusion, neopterin remains a significant prognostic indicator in patients with recurrent ovarian cancer in the era of newer chemotherapeutic agents. Increased urinary neopterin was associated with chemotherapy toxicity.

Key words: epithelial ovarian carcinoma, metastasis, neopterin, ovary, prognosis

Introduction

Epithelial ovarian carcinoma (EOC) represents the leading cause of mortality for gynecological cancer (1). The high mortality rate of EOC reflects the difficulty in early diagnosis. Despite aggressive surgery and chemotherapy, most patients with advanced disease will ultimately relapse and die. On the other hand, the survival of EOC patients has improved substantially over the recent decades. Combination of platinum derivatives (cisplatin or carboplatin) with paclitaxel currently represents the standard front line regimen for patients with advanced disease after demonstration of

superior survival in randomized clinical trials (2, 3), and new therapeutic options have emerged in patients with recurrent disease.

Neopterin is an unconjugated pteridine synthesized from guanosine triphosphate (4). Human monocytes-derived macrophages produce significant quantities of neopterin when stimulated with interferon- γ (5), and measurement of neopterin concentrations is used for the assessment of macrophage activation. Similarly to tumors of other primary locations, increased urinary and serum neopterin concentrations have been reported in patients with gynecological cancers, including EOC, cervical carcinoma, endometrial carcinoma, uterine

Correspondence to: Bohuslav Melichar M.D., Ph.D., Klinika onkologie a radioterapie, Lekarska fakulta Univerzity Karlovy a Fakultni nemocnice, Budova 23, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic.
Tel +420-49-5834574; fax +420-49-5832081; e-mail: melichar@fnhk.cz

sarcomas, and vulvar carcinoma, but, in general, not in women with benign neoplasms or precancerous disorders (6). The ovaries are also site of metastatic spread from tumors of other sites, mostly gastrointestinal and breast carcinomas (7). The prevalence of increased urinary neopterin concentrations is high in EOC (Table 1), but substantially lower percentages of patients with breast (8), colorectal (9), or gastric (10) carcinomas and urinary neopterin concentrations above normal have been reported (Table 2).

As is the case in many tumors of other primary locations, it has been demonstrated that increased urinary neopterin is a negative prognostic factor in patients with EOC (11, 12). However, the studies on prognostic significance were performed before the advent of paclitaxel. The natural history of EOC has changed in recent decades as a consequence of increased efficacy of first line treatment as well as of availability of other therapeutic options in patients with recurrent disease. Because of increased patient survival, metastases in hitherto rare locations, e.g. brain, have become increasingly common (13). Most patients ultimately present with recurrent disease, but less is known about the prognostic significance of urinary neopterin in this group of patients (14). The effect of paclitaxel/platinum chemotherapy on urinary neopterin was also examined in selected patients. We also addressed the question whether measurement of urinary neopterin could be helpful in distinguishing primary and secondary ovarian neoplasms. Correlation between urinary neopterin and laboratory parameters of intestinal permeability was also studied.

Material and Methods

Patients

The present study was a retrospective analysis of urinary neopterin measurements collected in 49 patients, aged 57 ± 13 (range 26 - 81) years with ovarian cancer treated at the Charles University Medical School Teaching Hospital. Thirty-six patients had primary ovarian cancer, among them 32 patients had epithelial ovarian carcinoma (EOC) and 4 patients had other primary ovarian tumors (3 patients with granulosa cell tumor and 1 patient with ovarian stromal sarcoma), and 13 patients had metastatic ovarian cancer: colorectal carcinoma 8 patients, gallbladder carcinoma 2 patients, gastric carcinoma, breast carcinoma, and mucinous peritoneal cystadenocarcinoma (pseudomyxoma peritonei) one patient each. In addition to ovarian primary, 9 EOC patients had a history of other primary cancers (breast carcinoma 7 patients, pancreatic carcinoma and gastrointestinal stromal tumor one

patient each). Twelve patients were chemotherapy-naive and 37 patients had been previously treated with chemotherapy. Sixteen apparently healthy women, aged 52 ± 9 (range 37 - 75) years, were included as controls.

Urinary neopterin determination

Morning urine specimens were collected and stored at -20°C until analysis. Urinary neopterin was measured by high-performance liquid chromatography. Briefly, after centrifugation (5 minutes, 1300 g) and diluting 100 μl of urine specimens with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of disodium-EDTA per liter, samples were injected onto a column, and neopterin was determined using high performance liquid chromatography systems LC1084A (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) with HP 79850 A integrator (Hewlett-Packard) or Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan) as described (15). Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission) and quantified by external standard method. Creatinine was determined by Jaffé reaction after dilution of the sample 1:50 (v/v) on a Hitachi 716 analyser (Tokyo, Japan) using a commercial kit (Boehringer, Mannheim, Germany) according the manufacturer's instructions, and neopterin concentrations were expressed as neopterin/creatinine ratio ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine).

Measurement of intestinal permeability

In 14 patients evaluated before the start of therapy, intestinal permeability was studied by measuring urinary sucrose, lactulose, D-xylose and mannitol after oral challenge (16). Briefly, after an overnight fast, a pretest urine sample was collected to detect any endogenous mannitol and the patients ingested 100 ml of the test solution containing 2 g of mannitol, 2 g of xylose, 10 g of lactulose, and 25 g of sucrose in water. The patients then continued fasting for 2 hours, and urine was collected for 5 hours. Lactulose, xylose, sucrose and mannitol were determined by capillary gas chromatography, and urinary excretion was expressed as percentage of the ingested dose as well as the ratio of lactulose/mannitol, sucrose/mannitol, lactulose/xylose and sucrose/xylose.

Statistical analysis

Urinary neopterin concentrations of patients and controls were compared by Mann-Whitney U test, neopterin before and during therapy was compared by Wilcoxon signed rank test, and correlations were investigated by Spearman's rank correlation. The proportions of patients with or without complications were compared by Fisher exact test. The survival was

measured from the time of sample collection to death or last follow-up. No patients were lost to follow-up, and the last visit of surviving patients was during 2006. The survival of patients was analyzed by the Kaplan-Meier method, and survival of different groups of patients was compared by log-rank test. The decision on statistical significance was based on $p = 0.05$ significance level. The analyses were performed using NCSS 2001 software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA).

Results

Compared to controls, urinary neopterin was significantly increased in patients with ovarian cancer (mean \pm standard deviation: 338 ± 324 , range 41 - 1980, vs. 133 ± 40 , range 80 - 229 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine, $p < 0.0001$; Figure 1). No statistically significant differ-

well as in ovarian metastases of other primaries ($p < 0.002$). Urinary neopterin concentrations above 213 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (mean + 2 standard deviations of controls) were observed in 22 (61%) of patients with primary ovarian cancer and 6 (46%) of patients with ovarian metastases, and the difference in frequency of increased neopterin concentrations was not statistically significant. Among patients with primary ovarian cancer, no statistically significant difference was noted between 32 patients with EOC and 4 patients with other primary ovarian tumors (307 ± 203 , range 41 - 930, vs. 613 ± 913 , range 119 - 1980 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine; Figure 2), and in EOC patients between patients with ($n = 9$) or without ($n = 23$) other primary tumors (336 ± 144 , range 175 - 604, vs. 296 ± 224 , range 41 - 930 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine).

In 31 patients, urinary neopterin was evaluated before the start of the first or subsequent line of chemotherapy (paclitaxel/platinum combination 22

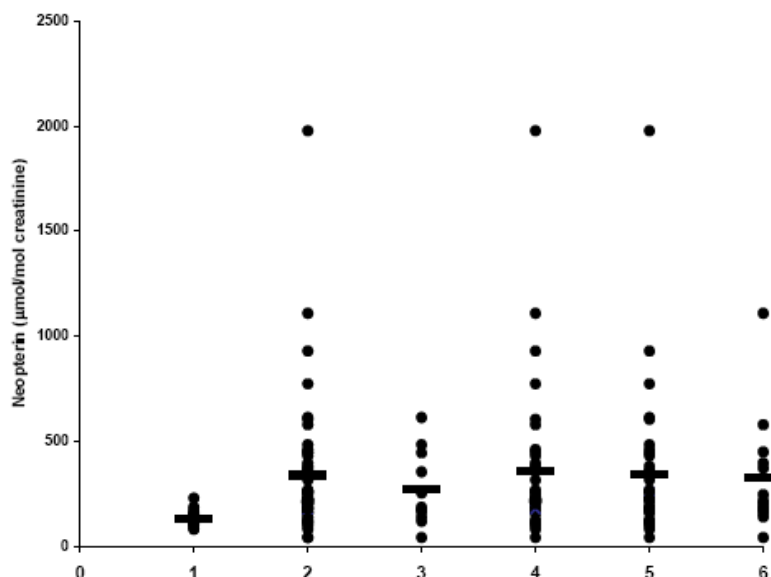


Figure 1. Dot plot of urinary neopterin measurements in controls (1), all patients with ovarian cancer (2), chemotherapy-naive patients (3), pretreated patients (4), patients with primary ovarian cancer (5) and patients with ovarian metastases of other primary tumors (6); horizontal lines indicate mean values.

ence was observed between 12 chemotherapy-naive patients and 37 pretreated patients (270 ± 171 , range 41 - 614 vs. 360 ± 359 , range 41 - 1980 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine). Urinary neopterin concentrations were similar in 36 patients with primary ovarian cancer compared to 13 patients with ovarian metastases of other tumors (341 ± 343 , range 41 - 1980, vs. 328 ± 277 , range 41 - 1110 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine), and compared to controls, urinary neopterin was significantly increased both in patients with primary ovarian cancer ($p < 0.0002$) as

patients, other regimens 9 patients). Among these 31 patients, 10 patients experienced serious (grade 3 or greater) toxicity during the first 6 weeks of therapy (leukopenia or neutropenia 4 patients, nausea or vomiting 3 patients, and early death 3 patients). Mean pretreatment urinary neopterin was significantly higher in patients who experienced serious toxicity compared to other patients (494 ± 246 , range 259 - 1110, vs. 235 ± 193 , range 41 - 930 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine, $p < 0.001$). Serious toxicity was observed in 8 out of 12 (67%)

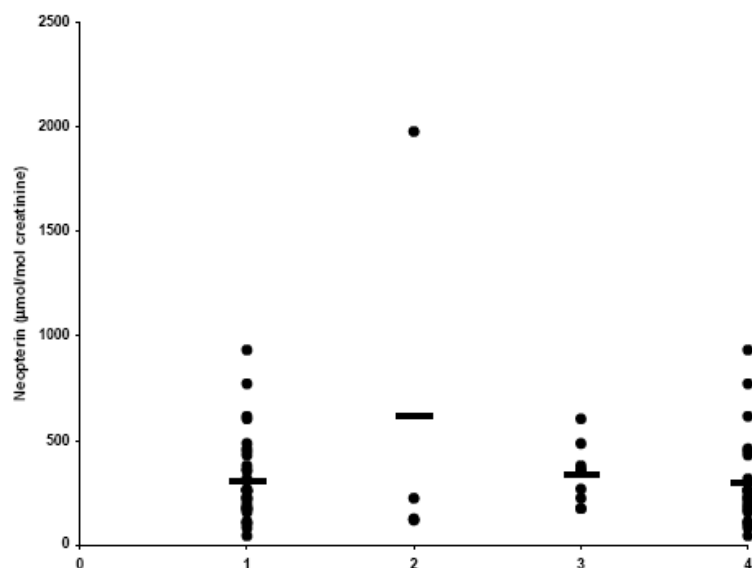


Figure 2. Dot plot of urinary neopterin measurements in patients with EOC (1), other primary ovarian tumors (2), patients with EOC and a second malignancy (3) and patients with EOC and no history of other malignancy (4); horizontal lines indicate mean values.

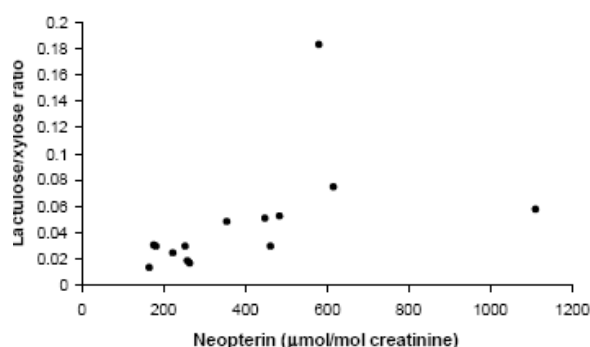


Figure 3. Correlation between urinary neopterin and lactulose/xylose ratio ($r_s = 0.79$, $p < 0.001$).

patients with urinary neopterin equal or above 338 µmol/mol creatinine (mean of all patients) compared to 2 of 19 (11%) of patients with urinary neopterin below 338 µmol/mol creatinine (Fisher exact test, $p = 0.001$). Twenty patients were evaluated before and during the therapy with paclitaxel/platinum combination chemotherapy. Compared to pretreatment neopterin (268 ± 197 , range 41 - 930 µmol/mol creatinine), no significant changes were observed in urinary neopterin concentrations one week after the first dose (330 ± 260 , range 97 - 1127 µmol/mol creatinine), at the end of first or second cycle (314 ± 302 , range 106 - 1393 µmol/mol creatinine), or at two subsequent visits $57 \pm$

22 days and 86 ± 35 days after the start of therapy (200 ± 164 , range 48 - 665, and 187 ± 89 , range 55 - 311 µmol/mol creatinine).

In 14 patients in whom intestinal permeability and urinary neopterin were determined simultaneously, significant negative correlation was observed between urinary neopterin and percentage of xylose absorbed ($r_s = -0.58$, $p = 0.03$), and positive correlations were observed between urinary neopterin and lactulose/mannitol ratio ($r_s = 0.63$, $p = 0.02$), lactulose/xylose ratio ($r_s = 0.79$, $p < 0.001$; Figure 3) and sucrose/xylose ratio ($r_s = 0.60$, $p = 0.02$). The correlation between neopterin and sucrose/mannitol ratio was of borderline significance ($r_s = 0.52$, $p = 0.06$).

Survival was significantly longer in patients with urinary neopterin below 338 µmol/mol creatinine in the whole group of 49 patients with ovarian cancer (median survival 31 vs. 11 months, $p = 0.003$), in 36 patients with primary ovarian cancer (median 58 vs. 11 months, $p = 0.02$; Figure 4) as well as in 13 patients in ovarian metastases of other primary tumors (median 27 vs. 8 months, $p = 0.05$, Figure 5). A significant difference in survival was also observed when only 37 pretreated patients (median 31 vs. 11 months, $p = 0.01$) or 24 pretreated EOC patients (median 58 vs. 20 months, $p = 0.05$) were evaluated. The trend of longer survival of untreated patients with urinary neopterin below 338 µmol/mol creatinine was of borderline significance (median 54 vs. 29 months, $p = 0.09$). In contrast, the difference in survival between primary and

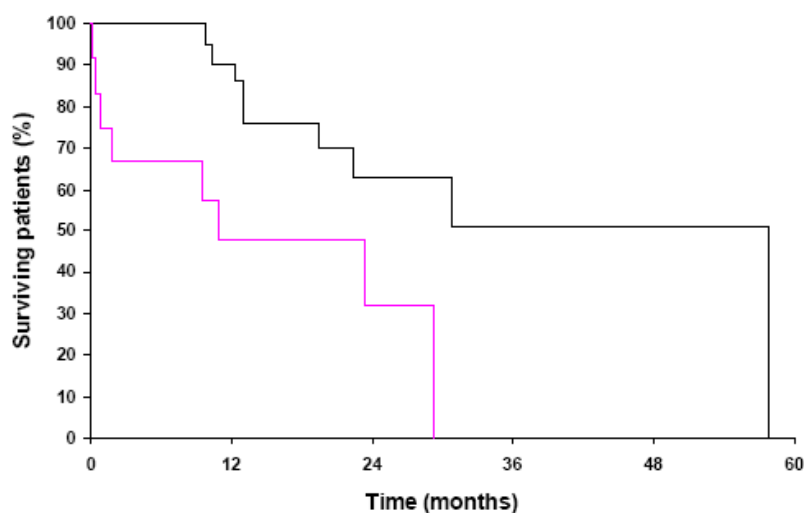


Figure 4. Survival of patients with primary ovarian cancer and urinary neopterin below 338 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (black line) and equal or above 338 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (light line; $p = 0.02$; log-rank test).

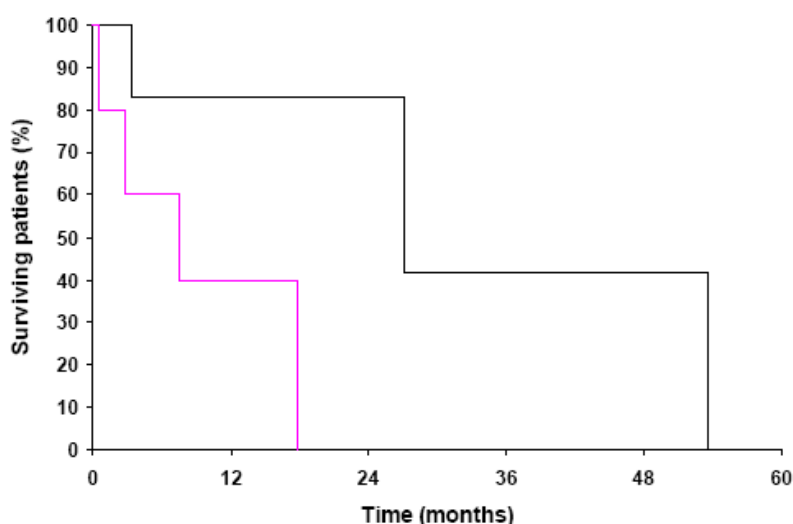


Figure 5. Survival of patients with secondary ovarian cancer and urinary neopterin below 338 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (black line) and equal or above 338 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (light line; $p = 0.05$; log-rank test).

metastatic ovarian tumors was not statistically significant (median 29 vs. 18 months, $p = 0.34$).

Discussion

The observation of increased urinary neopterin in patients with ovarian cancer in the present study is in agreement with previous reports. Urinary or serum neopterin has been investigated in patients with gynecological malignancies in a number of studies (6), and

neopterin was found to be increased in a substantial percentage of patients with ovarian, cervical, endometrial and vulvar carcinomas, and in uterine sarcomas. Neopterin concentrations were, in general, reported to be within normal limits in patients with benign tumors or precancerous disorders (17). Increased neopterin concentrations were limited to patients with active disease, and normal neopterin levels were reported in patients without evidence of disease activity (18-22).

Most of these studies included, partly or exclusively, patients with ovarian cancer, predominantly EOC

Table 1. Neopterin concentrations in patients with ovarian cancer in different series (EOC = epithelial ovarian carcinoma)

reference	diagnosis	number of patients	samples studied	% of patients with elevated neopterin
(24)	ovarian cancer	8	urine	88
(17)	ovarian cancer	15	urine	93
(25)	ovarian cancer	16	urine	88
(18)	ovarian cancer	10	urine	70
(21)	ovarian cancer	39	urine	57
(20)	EOC	11	serum	27
(11)	EOC	68	urine	50
(23)	EOC	47	serum	66
(12)	ovarian cancer (mostly EOC)	29	serum	38
present series	primary ovarian cancer (mostly EOC)	36	urine	61
present series	tumors metastatic to the ovary	13	urine	46

(Table 1). In EOC, higher neopterin was associated with advanced stage (12, 14). Other studies have shown that increased neopterin is associated with inferior survival (11, 12, 14) and increased risk of progression (23). Increased urinary neopterin was associated with the presence of disease at second look surgery (14), and urinary neopterin concentrations at the time of second-look surgery were predictive of survival. Increased neopterin concentrations were associated with poor prognosis in patients with no or minimal residual disease at second look surgery, but not in patients with macroscopic tumors (22). An association has been detected between the course of the disease and neopterin levels. Neopterin concentrations decreased after successful therapy, but increased dur-

ing disease progression and were elevated before death (14, 17, 24, 25).

In addition to what has already been reported on urinary neopterin in ovarian cancer, we have found that urinary neopterin is also increased in ovarian metastases of other primary tumors. The percentage of patients with increased urinary neopterin reported in EOC seems to be substantially higher than in many tumors of other locations (Table 2). We therefore originally hypothesized that urinary neopterin could be helpful in distinguishing primary and secondary ovarian tumors. However, the means of urinary neopterin concentrations in primary and secondary ovarian tumors were similar, and the percentages of patients with increased neopterin concentrations were not sig-

Table 2. Frequency of increased urinary neopterin in tumors that metastasize to the ovary

reference	primary	number of patients	% of patients with elevated neopterin
(9)	colorectal	72	24
(10)	stomach	14	29
(10)	gallbladder	9	56
(10)	pancreas	13	46
(8)	breast	78	17

nificantly different. Ovarian metastases are not uncommon, especially in patients with gastrointestinal carcinomas (7), but the prognosis of patients with metastatic ovarian cancer seems to be worse than in primary ovarian tumors (26, 27). In the present cohort, a relatively high proportion of EOC patients had a history of other primary (mostly breast carcinoma), but urinary neopterin was not different between EOC patients with or without a second primary neoplasm. The difference in survival between primary and metastatic ovarian tumors in the present study was not significant, probably because of the limited size of the cohort, but prognostic significance of increased urinary neopterin concentrations could be demonstrated even in a relatively small group of patients with ovarian metastases of other primary tumors. Present data also demonstrated that urinary neopterin is a significant prognostic factor in pretreated patients (mostly with recurrent disease). Previous studies on prognostic significance of neopterin in EOC were performed mostly during 1980s in chemotherapy-naive patients, before the advent of taxanes, topotecan, or gemcitabine, and present data indicate that neopterin remains a significant prognostic indicator in patients with recurrent disease treated with newer generation of therapeutic agents.

An increase in neopterin production has been documented after systemic administration of different cytokines (6). Both paclitaxel and cisplatin have been shown to activate macrophages *in vitro* (28, 29). Recently, we have reported an increase in urinary neopterin in breast cancer patients treated with the combination of paclitaxel and doxorubicin (8). However, in the present study we did not observe an increase in urinary neopterin after paclitaxel/platinum chemotherapy. Urinary neopterin was increased in the majority of patients. Reduction of the tumor burden resulted in lower neopterin in patients with increased

baseline neopterin concentrations, as has been reported earlier (25), and this decrease might offset any increase induced by activation of macrophages by paclitaxel or platinum. On the other hand, increased urinary neopterin was associated with substantially higher risk of the toxicity of chemotherapy. This observation could be explained by the alterations of the metabolism of cytotoxic drugs that accompany systemic inflammatory response (30). In an earlier study, we have observed higher pretreatment neopterin concentrations in colorectal carcinoma patients treated with irinotecan who subsequently experienced toxicity (9), and the data from the present study corroborate these results.

In earlier studies, correlations were observed in ovarian cancer patients between neopterin and other indicators of inflammatory or immune activation, e.g. erythrocyte sedimentation rate (14), concentrations of soluble interleukin-2 receptor (11), or variants of soluble CD44 molecule (31). In the present study, a correlation was observed between urinary neopterin and alterations of intestinal permeability. An association between systemic immune activation, reflected in increased neopterin concentrations, and disturbances of laboratory parameters of intestinal permeability has been reported in human immunodeficiency virus infection (32), and the present study extends this phenomenon to cancer patients. Laboratory parameters of intestinal permeability (e.g. lactulose/mannitol ratio) are increased in chemotherapy-naive cancer patients (33, 34), and increase further during therapy (35). The increase of intestinal permeability could be caused by malnutrition (36). Low serum albumin, an important laboratory marker of malnutrition, results from systemic inflammatory response, and, similarly to increased neopterin, low serum albumin was shown to represent an indicator of poor prognosis in EOC (37,

38).

We conclude that, in agreement with earlier studies, increased urinary neopterin is found in patients with ovarian cancer, both primary ovarian cancer and ovarian metastases of other tumors. Increased urinary neopterin was associated with treatment toxicity and was predictive of poor prognosis, but no significant change of neopterin concentrations was observed during the therapy with paclitaxel/platinum combination. A correlation has been observed between urinary neopterin and parameters of intestinal permeability. Neopterin remains a significant prognostic indicator in patients with recurrent ovarian cancer in the era of newer chemotherapeutic agents.

Acknowledgement

Supported by the grant of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NC 8156-3.

References

- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer Statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8 - 29.
- McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996; 334: 1 - 6.
- Piccart MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized Intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 699 - 708.
- Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989; 27: 81 - 141.
- Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, et al. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 1984; 160: 310 - 316.
- Melichar B, Solichová D, Freedman RS. Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 240 - 252.
- Yada-Hashimoto N, Yamamoto T, Kamiura S, et al. Metastatic ovarian tumors: a review of 64 cases. *Gyn Oncol* 2003; 89: 314 - 317.
- Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Cermanova M, Urminska H, Ryska A. Systemic immune activation, anemia and thrombocytosis in breast cancer patients treated by doxorubicin and paclitaxel. *Pteridines* 2006; 17: in press.
- Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Malirova E, Cermanova M, Zadak Z. Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 2006; 21: 190 - 198.
- Melichar B, Solichova D, Svobodova I, Urbanek L, Melicharova K. Urinary neopterin in patients with upper gastrointestinal, biliary and pancreatic carcinomas. *Pteridines* 2006; 17: 20 - 24.
- Marth C, Weger E, Muller-Holzner E, et al. The prognostic value of nuclear roundness and neopterin in ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1863 - 1868.
- Park IS, Lee YS, Kim JC, Hwang SG. Serum neopterin levels in ovarian tumors. *Int J Gynaecol Obstet* 1995; 51: 229 - 234.
- Melichar B, Urminská H, Kohlová T, Nová M, Cesák T. Brain metastases of epithelial ovarian carcinoma responding to cisplatin and gemcitabine combination chemotherapy: a case report and review of the literature. *Gyn Oncol* 2004; 94: 367 - 376.
- Reibnegger G, Hetzel H, Fuchs D, et al. Clinical significance of neopterin for prognosis and follow-up in ovarian cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 4977 - 4981.
- Cermanová M, Melichar B, Solichová D, et al. Urinary neopterin and microalbuminuria in patients treated by low-density lipoprotein apheresis. *Pteridines* 2005; 16: 174 - 183.
- Cibickova L, Cibicek N, Zdansky P, Kohout P. The impairment of gastroduodenal mucosal barrier by coffee. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2004; 47: 273 - 276.
- Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Hetzel H, Reibnegger G, Wachter H. Measurement of urinary neopterin in normal pregnant and non-pregnant women and in women with benign and malignant genital tract neoplasms. *Arch Gynecol* 1983; 233: 121 - 130.
- Bartel U, Rabe H, Schulz-Pinkus M. Erste Erfahrungen mit Neopterinbestimmungen im Urin von Frauen mit Genital- und Mammatumoren. *Zentrabl Gynakol* 1987; 109: 1226 - 1232.
- Melichar B, Zeimet A, Artner-Dworzak E, et al. Association between increased urinary zinc and neopterin concentrations in women with gynaecological cancer. *TumorDiagn Ther* 1993; 14: 110 - 112.
- Avall Lundqvist E, Nordstrom L, Sjoval K, Eneroth P. Evaluation of seven different tumour markers for the establishment of tumour marker

- panels in gynecologic malignancies. *Eur J Gynaecol Oncol* 1989; 10: 395 - 405.
- 21 Szarka G, Pulay T, Csomor S, Tran-Phoung-Mai, Schumann B. The significance of neopterin determination as a tumour marker in ovarian cancer. *Acta Chir Hung* 1988; 29: 359 - 364.
- 22 Fuith LC, Dapunt O, Hetzel H, Reibnegger G, Wachter H. Second-look operation in women with ovarian cancer: I. Concentrations of neopterin in urine and CA125 in serum at second-look laparotomy. Their relationship with prognosis. *TumorDiagn Ther* 1990; 11: 147 - 151.
- 23 Gadducci A, Ferdeghini M, Malagnino G, et al. Elevated serum levels of neopterin and soluble interleukin-2 receptor in patients with ovarian cancer. *Gyn Oncol* 1994; 52: 386 - 391.
- 24 Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Hetzel H, Konig K, Wachter H. Urinary neopterin excretion in patients with genital cancer. *Clin Biochem* 1982; 15: 38 - 40.
- 25 Hetzel H, Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Significance of urinary neopterin in gynecological oncology: Follow-up of patients with ovarian cancer. *Cancer Detect Prev* 1983; 6: 263 - 266.
- 26 Miller BE, Pittman B, Wan JY, Fleming M. Colon cancer with metastasis to the ovary at time of initial diagnosis. *Gyn Oncol* 1997; 66: 368 - 371.
- 27 Kim HK, Heo DS, Bang YJ, Kim NK. Prognostic factors of Krukenberg's tumor. *Gyn Oncol* 2001; 82: 105 - 109.
- 28 Mullins DW, Burger CJ, Elgert KD. Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol* 1999; 162: 6811 - 6818.
- 29 Ranjan P, Sodhi A, Sristava A. Cisplatin and interferon-gamma treated murine macrophages induce apoptosis in tumor cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 1997; 8: 797 - 806.
- 30 Rivory LP, Slaviero KA, Clarke SJ. Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response. *Br J Cancer* 2002; 87: 277 - 280.
- 31 Zeimet AG, Windschwendter M, Uhl-Steidl M, et al. High serum levels of soluble CD44 variant isoform v5 are associated with favourable clinical outcome in ovarian cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1646 - 1651.
- 32 Rollins NC, Filteau SM, Coutoudis A, Tomkins AM. Feeding mode, intestinal permeability, and neopterin excretion: a longitudinal study in infants of HIV-infected South African women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 28: 132 - 139.
- 33 Parrilli G, Iaffaioli RV, Martorano M, et al. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 3689 - 3691.
- 34 Sundstrom GM, Wahlin A, Nordin-Anderson I, Suhr OB. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 1998; 61: 250 - 254.
- 35 Melichar B, Dvorak J, Hyspler R, Zadak Z. Intestinal permeability in the assessment of intestinal toxicity of cytotoxic agents. *Chemotherapy* 2005; 51: 336 - 338.
- 36 van der Hulst RRWJ, von Meyenfeldt MF, van Kreel BK, et al. Gut permeability, intestinal morphology, and nutritional depletion. *Nutrition* 1998; 14: 1 - 6.
- 37 Parker D, Bradley C, Bogle SM, et al. Serum albumin and CA125 are powerful predictors of survival in epithelial ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 888 - 893.
- 38 Clark TG, Stewart ME, Altman DG, Gabra H, Smyth JF. A prognostic model for ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 944 - 952.

7.5. Příloha 5

Urinary neopterin in patients with upper gastrointestinal, biliary and pancreatic carcinomas

Bohuslav Melichar, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Lubor Urbánek, Karolina Melicharová

Pteridines, 17, 2006, str. 20-24

Pteridines
Vol. 17, 2006, pp. 20 - 24

Urinary Neopterin in Patients with upper Gastrointestinal, Biliary and Pancreatic Carcinomas

Bohuslav Melichar^{1,2}, Dagmar Solichová³, Iveta Svobodová³, Lubor Urbánek³, Karolina Melicharová³

Departments of ¹Oncology & Radiotherapy, ²Medicine, and ³Gerontology & Metabolic Care, Charles University Medical School Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Abstract

Increased urinary neopterin has been associated with advanced disease and poor prognosis in patients with colorectal carcinoma, but less is known about urinary neopterin in other gastrointestinal tumors. We have investigated urinary neopterin in 53 patients with carcinomas of the upper gastrointestinal tract, pancreas and biliary tract. Compared to controls, urinary neopterin was increased in patients with gastric carcinoma, pancreatic carcinoma, cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma. Urinary neopterin was a significant prognostic indicator of survival in univariate as well as multivariate analyses. No significant change in urinary neopterin concentrations was observed during the short follow-up, but increased urinary neopterin concentration at the end of follow-up was associated with poor prognosis. In conclusion, significantly increased urinary neopterin concentrations were observed in the present cohort of patients. Urinary neopterin is an independent prognostic indicator in patients with carcinomas of the upper gastrointestinal tract, biliary tree and pancreas.

Key words: gallbladder carcinoma, gastric carcinoma, cholangiocarcinoma, neopterin, pancreatic carcinoma

Introduction

Malignant tumors are known to elicit host response mediated by both adaptive and innate immune systems. Among other laboratory parameters, advanced tumors are associated with increased concentrations of neopterin in the urine or in serum (1, 2). Neopterin is produced by macrophages activated by interferon- γ (IFN- γ), and elevated neopterin concentrations have been observed in patients with different primary tumors, including gastrointestinal carcinomas. Urinary or serum neopterin concentrations have been studied in patients with colorectal carcinoma (3-5), and increased urinary neopterin has been associated with advanced disease (3) or poor prognosis (5). Much less is known about neopterin concentrations in patients with gastrointestinal tumors other than colorectal carcinoma (6).

Gastric carcinoma, pancreatic carcinoma and biliary tract carcinomas (gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma) occur in Europe with significantly lower frequency compared with colorectal carcinoma

(7). Compared to colorectal carcinoma, the prognosis of these tumors is poor, and most patients die of the disease within one or two years of diagnosis. In the present study, we have evaluated the urinary neopterin in patients with esophageal, gastric, pancreatic and biliary carcinomas.

Material and Methods

A retrospective analysis was performed of urinary neopterin measurements collected between 1997 and 2000 as a part of research project, approved by the institutional ethics committee, evaluating immune system activation in patients with liver tumors. Morning urine samples were collected from 53 patients, 30 males and 23 females, aged 57 ± 13 (range 26 - 79) years, with histologically verified carcinomas of the esophagus, stomach, pancreas, gallbladder or bile ducts, treated at the Department of Oncology and Radiotherapy, Charles University Medical School Teaching Hospital, and 33 healthy controls, 16 males

Correspondence to: Bohuslav Melichar M.D., Ph.D., Klinika onkologie a radioterapie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice, Budova 23, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
phone: +420-49-5834574; fax: +420-49-5832081; e-mail: melichar@fnhk.cz

Table 1. Urinary neopterin concentrations ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine) in patients with cancer and in healthy controls

Primary	n	Mean \pm S.D.	Range	Patients with neopterin ≥ 170 n (%)	Patients with neopterin ≥ 214 n (%)	p (vs. controls)
Gallbladder carcinoma	9	443 \pm 626	83 - 2080	5 (56)	5 (56)	0.002
Cholangiocarcinoma	16	168 \pm 83	70 - 361	5 (31)	4 (25)	0.004
Pancreatic carcinoma	13	204 \pm 116	42 - 481	8 (62)	6 (46)	0.003
Gastric carcinoma	14	201 \pm 181	47 - 767	6 (43)	4 (29)	0.02
Esophageal carcinoma	1	721	-	1 (100)	1 (100)	-
All patients	53	243 \pm 296	42 - 2080	25 (47)	20 (38)	0.00003
Controls	33	110 \pm 52	34 - 293	3 (9)	2 (6)	-

and 17 females, aged 49 ± 13 (range 28 - 88) years. Thirty-four patients were chemotherapy-naive, 19 patients had previously received therapy. Twenty-nine patients had metastatic disease (including liver metastases) at the time of investigation.

Urinary neopterin was measured by high-performance liquid chromatography. Creatinine was determined by Jaffé reaction, and the results were expressed as neopterin/creatinine ratio ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine) as described earlier (8). Peripheral blood cell count was performed as described (9). Hemoglobin was measured by a photometric method using sodium lauryl sulfate, leukocytes were detected by flow cytometry and platelets by impedance method using a Sysmex XE-2100 blood analyzer (Sysmex, Kobe, Japan).

The survival of patients was analyzed by the Kaplan-Meier method, and the comparisons of survival of patients with urinary neopterin $<$ or ≥ 170 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine and other survival comparisons

were performed by log-rank test. The cutoff value of 170 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine was selected based on our previous study (10). The survival was measured from the date of neopterin determination. Urinary neopterin concentrations of patients and controls were compared by Mann-Whitney U test, neopterin at the start and at the end of follow-up was compared by Wilcoxon signed rank test, and correlations between urinary neopterin and hematological parameters were investigated by Spearman's rank correlation. Multivariate analysis was performed using the Cox regression analysis with the results expressed as hazard ratio (HR). The decision on statistical significance was based on $p < 0.05$ significance level. The analyses were performed using NCSS 2001 software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA).

Table 2. Univariate analysis of prognostic indicators

Parameter	Cutoff for survival analysis	Median survival (months)	P (log-rank test)
Urinary neopterin ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine)	< 170 (n=28) vs. ≥ 170 (n=25)	12 vs. 5	0.008
Leukocytes ($10^9/l$)	< 8 (n=21) vs. ≥ 8 (n=32)	11 vs. 6	0.06
Hemoglobin (g/l)	< 125 (n=33) vs. ≥ 125 (n=20)	6 vs. 13	0.03
Mean erythrocyte volume (fl)	< 84 (n=13) vs. ≥ 84 (n=40)	4 vs. 8	0.10
Platelets ($10^9/l$)	< 270 (n=23) vs. > 270 (n=30)	10 vs. 7	0.13
Previous therapy	yes (n=19) vs. no (n=34)	7 vs. 7	0.68
Distant metastases	no (n=24) vs. yes (n=29)	11 vs. 6	0.05
Primary	non-biliary (n=28) vs. biliary (n=25)	7 vs. 11	0.03

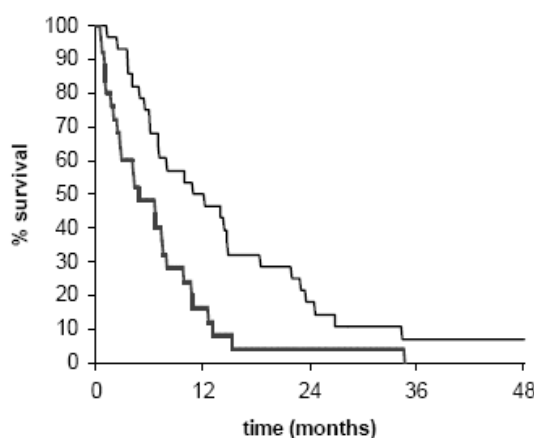


Figure 1. Survival of patients with urinary neopterin $< 170 \mu\text{mol/mol}$ creatinine (bold line) and $\geq 170 \mu\text{mol/mol}$ creatinine (dashed line)

Results

Urinary neopterin was significantly increased compared to controls in the whole patient group as well as in patients with gallbladder carcinoma, cholangiocarcinoma, pancreatic carcinoma or gastric carcinoma (Tab. 1). A significant percentage of patients had urinary neopterin equal or above $170 \mu\text{mol/mol}$ creatinine and equal or above $214 \mu\text{mol/mol}$ creatinine (mean + 2 standard deviations of controls). No statistically significant difference was observed in urinary neopterin levels among patients with different primary tumors, in patients with or without metastases ($192 \pm 145 \mu\text{mol/mol}$ creatinine vs. $305 \pm 406 \mu\text{mol/mol}$ creatinine) as well as in chemotherapy-naive patients and patients previously treated with chemotherapy ($194 \pm 118 \mu\text{mol/mol}$ creatinine vs. $330 \pm 463 \mu\text{mol/mol}$ creatinine). A significant correlation was observed between urinary neopterin and the age of the patients ($r_s = 0.44$, $p = 0.001$) and peripheral blood leukocyte count ($r_s = 0.27$, $p = 0.05$), but not with hemoglobin, mean erythrocyte volume and peripheral blood platelet count.

Median survival of all patients was 7 months (7 months in patients with gastric carcinoma, 8 months in pancreatic carcinoma and 11 months in patients with biliary tract carcinoma). In univariate analysis, urinary neopterin below $170 \mu\text{mol/mol}$ creatinine, hemoglobin concentration, biliary primary and presence of distant metastases (including liver metastases) were significant indicators of survival, and peripheral blood leukocyte count was of borderline significance (Table 2). In multivariate analysis, only urinary neopterin below $170 \mu\text{mol/mol}$ creatinine (HR 0.39, $p = 0.002$) and absence of distant metastases (HR 0.49, $p = 0.02$) were significant indicators of survival.

In 26 patients, urinary neopterin was determined on more than one occasion. The mean (\pm standard deviation) number of neopterin measurements was 5 ± 3 (range 2 - 16), and mean time between the earliest and latest measurement was 3.5 ± 3.2 (range 0.1 - 13) months. No significant change in urinary neopterin was observed between the earliest ($234 \pm 285 \mu\text{mol/mol}$ creatinine) and latest ($214 \pm 154 \mu\text{mol/mol}$ creatinine) measurements. In patients with urinary neopterin at the time of the latest measurement equal or above $170 \mu\text{mol/mol}$ creatinine significantly shorter survival was observed (median 4 vs. 12 months, $p = 0.05$), but in some patients specimens were collected during therapy, in others rather shortly before death.

Discussion

In the present study significantly increased urinary neopterin concentrations were observed, compared to controls, in the whole group of patients as well as in patients with gallbladder carcinoma, cholangiocarcinoma, pancreatic carcinoma, or gastric carcinoma. This observation was not unexpected as elevated urinary or serum neopterin concentrations have been reported in patients with wide range of tumors (2). Similarly to other cancers, increased neopterin in the present study was significant indicator of poor prognosis on univariate analysis both at the start and at the end of follow-up, as well as on the multivariate analysis. Both chemotherapy-naive patients as well as patients undergoing chemotherapy were included in the present study (with the sample collected before the next chemotherapy cycle). In another study (Melichar *et al.* manuscript in preparation), we have demonstrated that the chemotherapy regimens used in gastrointestinal cancer (usually based on 5-fluorouracil) do not lead to a significant change in urinary neopterin, we therefore included in the present analysis also the patients who have already been treated with chemotherapy.

Neopterin is an unconjugated pteridine synthesized from guanosine triphosphate (GTP). GTP is converted to 7,8-dihydroneopterin by the enzyme GTP cyclohydrolase I, and this reaction represents the first step in a pathway leading to the formation of tetrahydrobiopterin (1). GTP cyclohydrolase I is the rate-limiting enzyme in this pathway, and its activity is induced by IFN- γ (11), that is produced by T-lymphocytes and natural killer (NK) cells (12). Human macrophages possess significant GTP cyclohydrolase I activity when stimulated by IFN- γ , while the activities of other enzymes of this pathway are low (13), leading to the accumulation of 7,8-dihydroneopterin-triphosphate which undergoes autooxidation to neopterin.

Among gastrointestinal tumors, neopterin concen-

trations have been studied most extensively in patients with colorectal carcinoma. In patients with colorectal carcinoma neopterin concentrations were associated with advanced stage (3), poor prognosis (5), and correlated with the decrease of serum tryptophan and decreased quality of life (14). Increased serum or urinary neopterin concentrations have also been reported in patients with hepatocellular carcinoma (15, 16). Kawasaki *et al.* (16) observed increased urinary neopterin in 18 patients with hepatocellular carcinoma. A significant correlation was observed between urinary neopterin and tumor size, and survival was significantly shorter in patients with higher urinary neopterin.

Much less is known about the presence and prognostic impact of increased neopterin concentrations in patients with other gastrointestinal tumors. In pilot studies, high urinary neopterin concentrations have been observed in substantial number of patients with gastric carcinoma and most patients with pancreatic carcinoma (6). Manes *et al.* (17) reported markedly increased serum neopterin in patients with pancreatic carcinoma. Increased serum neopterin concentrations were also reported in patients with pancreatic carcinoma by Birk *et al.* (18). Contrary to other reports in patients with malignant tumors as well as to the present report, in the study reported by Birk *et al.* (18) higher serum neopterin has been associated with better prognosis. In another study in patients with gastric and colorectal carcinomas, the urinary neopterin concentrations in patients with gastric carcinoma were similar to patients with colorectal carcinoma (19). Even less is known about neopterin in patients with biliary tract carcinoma (gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma). In one report published so far, increased urinary neopterin has been observed in 8 out of 9 patients examined (6), and present data are in agreement with this report, although the number of patients with increased urinary neopterin was lower in the present series.

Limited number of patients with each primary was evaluated in the present study, and the data were pooled for survival analysis for all patients. In clinical studies, patients with gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma are almost invariably handled together as a single group and, because of a relatively low frequency of these tumors, biliary tract carcinomas are often pooled together with other gastrointestinal carcinomas. Because of the relatively low incidence, carcinomas of the biliary tract and pancreas have been studied together even in prospective clinical trials (20). This approach may be justified as prognosis and chemosensitivity of these tumors is similar. Moreover, in some cases it may be difficult to distinguish cholangiocarcinoma from pancreatic carcinoma, and the diagnosis of cholangiocarcinoma relies on the exclu-

sion of a primary tumor elsewhere in the gastrointestinal tract (21), notably in the pancreas or stomach. Inclusion of patients with upper gastrointestinal of pancreaticobiliary carcinomas in one study may be further justified by the fact that the site of the primary may be determined only after extensive studies, and an information about prognosis could be helpful at the start of patient evaluation. However, future studies on a larger cohort of patients should address the prognostic significance of increased urinary neopterin in patients with individual primary tumors in this group.

Advanced cancer is often accompanied by anemia that may be further aggravated by antitumor therapy. In the majority of cancer patients, the anemia may be categorized as anemia of chronic disease, characterized by low serum iron, low serum iron binding capacity and high ferritin (22). The decline of hemoglobin concentrations in anemia of chronic disease results from the alterations of iron metabolism associated with acute phase response and direct inhibition of hematopoietic progenitors by cytokines responsible for systemic inflammatory and immune response, e.g. IFN- γ or tumor necrosis factor- α (22), and decreased hemoglobin levels are associated with increased neopterin concentrations. A negative correlation between serum neopterin concentrations and hemoglobin has been observed in patients with hematological and gynecological malignancies (23, 24). In contrast to observations made in patients with other primary tumors, no correlations were observed between hemoglobin or mean erythrocyte volume, an indicator of anemia of chronic disease, and urinary neopterin. This lack of correlation may be explained by the possibility that anemia in these patients may be caused or aggravated by factors other than systemic inflammatory or immune response, e.g. chronic gastrointestinal blood loss or, in previously treated patients, by chemotherapy. The correlation between urinary neopterin and peripheral blood leukocyte counts reflects an association between different parameters of systemic inflammatory and immune response. The significant correlation observed between urinary neopterin and the age of the patients is in agreement with our earlier study demonstrating increased concentrations and prognostic significance of urinary neopterin in the elderly (9).

In conclusion, increased urinary neopterin was observed in patients with gastric carcinoma, pancreatic carcinoma, cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma. Urinary neopterin is an independent prognostic indicator in patients with carcinomas of the upper gastrointestinal tract, biliary tree and pancreas.

Acknowledgement

Supported by Research Project MZO 00179906.

References

- 1 Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989; 27: 81 - 141.
- 2 Reibnegger G, Fuchs D, Fuiith LC, et al. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease. *Cancer Detect Prev* 1991; 15: 483 - 490.
- 3 Melichar B, Jandik P, Solichova D, et al. Urinary neopterin excretion in colorectal cancer. *Onkologie* 1994; 17: 434 - 436.
- 4 Allen-Mersh TG, Glover C, Fordy C, Henderson DC, Davies M. Relation between depression and circulating immune products in patients with advanced colorectal cancer. *J Roy Soc Med* 1998; 9: 408 - 413.
- 5 Weiss G, Kronberger P, Conrad F, Bodner E, Wachter H, Reibnegger G. Neopterin and prognosis in patients with adenocarcinoma of the colon. *Cancer Res* 1993; 53: 260 - 265.
- 6 Conrad F, Bodner E, Fuchs D, et al. Determination of neopterin - a marker of cellular immunity - in gastrointestinal and pancreatic carcinoma. In: Pfeleiderer W, Wachter H, Curtius C, eds. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. Berlin-New York: Walter de Gruyter 1984; 357 - 366.
- 7 Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. Cancer mortality in Europe, 1990-1994, and an overview of trends from 1955 to 1994. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1477 - 1516.
- 8 Cermanová M, Melichar B, Solichová D, Bláha M, Bláha V, Blazek M, Mašín V, Cerman J, Zadák Z. Urinary neopterin and microalbuminuria in patients treated by low-density lipoprotein apheresis. *Pteridines* 2005; 16: 174 - 183.
- 9 Solichova D, Melichar B, Blaha V, et al. Biochemical profile and survival in nonagenarians. *Clin Biochem* 2001; 34: 563 - 569.
- 10 Melichar B, Solichova D, Svobodova I, Melicharova K. Neopterin in renal cell carcinoma: inhalational administration of interleukin-2 is not accompanied by a rise of urinary neopterin. *Luminescence* 2005; 20: 311 - 314.
- 11 Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, et al. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon- γ . *J Exp Med* 1984; 160: 310 - 316.
- 12 Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP, Wachter H. Neopterin as a marker for activated cell mediated immunity: application in HIV infection. *Immunol Today* 1988; 9: 150 - 155.
- 13 Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, et al. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T24 cell. *J Biol Chem* 1990; 265: 3189 - 3192.
- 14 Huang A, Fuchs D, Widner B, Glover C, Henderson DC, Allen-Mersh TG. Serum tryptophan decrease correlates with immune activation and impaired quality of life in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 1691 - 1696.
- 15 Tsuda Y, Fukuda A, Kobayashi H, et al. Serum neopterin as a marker for screening of hepatocellular carcinoma. *Pteridines* 2004; 15: 161 - 169.
- 16 Kawasaki H, Watanabe H, Yamada S, Watanabe K, Suyama A. Prognostic significance of urinary neopterin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Tohoku J Exp Med* 1988; 155: 311 - 318.
- 17 Manes G, Spada OA, Rabitti PG, et al. Neopterin serum levels in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 1999; 25: 31 - 37.
- 18 Birk D, Gansauge F, Gansauge S, Schwarz A, Beger HG. Levels of serum neopterin are increased in pancreatic cancer patients and correlate with the prognosis. *Eur J Med Res* 1999; 4: 156 - 160.
- 19 Peters KM, Bornhofen B, Grundmann R, et al. Neopterin als Marker einer unspezifischen Immunstimulation mittels Propionibacterium avidum KP-40 bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren. *Med Klin* 1990; 85: 421 - 424.
- 20 Glimelius B, Hoffman K, Sjoden PO, et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 593 - 600.
- 21 Khan SA, Davidson BR, Goldin R, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 2002; 51: VII - VI9.
- 22 Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, et al. Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. *Eur J Haematol* 1991; 46: 65 - 70.
- 23 Denz H, Fuchs D, Huber H, et al. Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders. *Eur J Haematol* 1990; 44: 186 - 189.
- 24 Wachter H, Artner-Dworzack E, Fuchs D, et al. Association between neopterin and iron metabolism in cancer patients. *Tumor Diagn Ther* 1990; 11: 229 - 232.

7.6. Příloha 6

Serial urinary neopterin measurements reflect the disease course in patients with epithelial ovarian carcinoma treated with paclitaxel/platinum chemotherapy

Bohuslav Melichar, Hana Kalabova, Lubor Urbanek, Eva Malirova, Dagmar Solichova

Pteridines, 18, 2007, str. 1-7

Pteridines
Vol. 18, 2007, pp. 1 - 7

Serial Urinary Neopterin Measurements Reflect the Disease Course in Patients with Epithelial Ovarian Carcinoma Treated with Paclitaxel/Platinum Chemotherapy

Bohuslav Melichar^{1,2}, Hana Kalabova¹, Lubor Urbanek³, Eva Malirova⁴, Dagmar Solichova³

Departments of ¹Oncology & Radiotherapy, ²Medicine, ³Gerontology & Metabolic Care and ⁴Nuclear Medicine, Charles University Medical School & Teaching Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic.

Abstract

Increased concentrations of urinary neopterin, an indicator of systemic immune activation, have been reported in patients with cancer, including epithelial ovarian carcinoma (EOC). We have assessed urinary neopterin before the treatment and then daily during the therapy with paclitaxel/platinum combination in 5 EOC patients. A correlation was observed between the clinical course and serial urinary neopterin concentrations. We conclude that the determination of serial urinary neopterin concentrations may be useful for monitoring of EOC patients during chemotherapy.

Key words: epithelial ovarian carcinoma; neopterin; paclitaxel; platinum

Introduction

Urinary and serum concentrations of neopterin, an indicator of systemic immune activation, are increased in patients with advanced tumors, including epithelial ovarian carcinoma (EOC) (1). In patients with EOC, increased neopterin is an independent prognostic factor associated with inferior survival (2-4). The prognosis of patients with EOC has improved markedly over the last decades, and the combination of platinum derivatives (cisplatin or carboplatin) with paclitaxel is currently the standard front line regimen for patients with advanced EOC (5, 6).

We have assessed urinary neopterin before the treatment and then daily during the therapy with paclitaxel/platinum combination in 5 EOC patients. We have observed a correlation between the clinical course and serial urinary neopterin concentrations that is illustrated by the case descriptions outlined below.

Method

Urine sample was collected immediately before the start of therapy (day 0), patients were issued collection vessels for first morning urine specimens and advised to keep the samples refrigerated and protected from

daylight. Specimens were collected at scheduled visits and stored at -20°C until analysis. After centrifugation (5 minutes, 1300 g) and diluting 100 µl of urine specimens with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of disodium-EDTA per liter, samples were injected onto a column, and neopterin was determined using high performance liquid chromatography systems Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan) as described (7). Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission) and quantified by external standard method. Creatinine was determined by Jaffé reaction after dilution of the sample 1:50 on a Hitachi 716 analyser (Tokyo, Japan) using a commercial kit (Boehringer, Mannheim, Germany) according the manufacturer's instructions, and neopterin concentrations were expressed as neopterin/creatinine ratio (µmol/mol creatinine).

Serum CA125 was determined by immunoradiometric assay using a commercial kit (Immunotech, Marseille, France) according the manufacturer's instructions.

Results

Baseline urinary neopterin concentrations were above the normal range in most (4 out of 5) patients

Correspondence to: Prof. MUDr. Bohuslav Melichar Ph.D., Klinika onkologie a radioterapie, Lekarska fakulta Univerzity Karlovy a Fakultni nemocnice, Budova 23, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic.
Tel +420-49-5834574; fax +420-49-5832081; e-mail: melichar@fnhk.cz

studied. Subsequent course of values obtained in daily neopterin measurements differed in individual patients and reflected the clinical course.

Patient 1 was a 64-year-old woman with history of bilateral breast carcinoma and recurrent EOC. She presented with second recurrence of EOC that manifested as ascites. Tumor cells were identified during cytological examination of the ascites. Because of interval from the last paclitaxel/platinum therapy of more than 6 months, the patient was treated with the combination of paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb, Sermoneta, Italy; 175 mg/m²) and carboplatin (Cycloplatin, Pliva-Lachema, Brno, Czech Republic; area under the curve 6) every 3 weeks that resulted in complete disappearance of ascites and normalization of serum CA125. Urinary neopterin was measured daily during the initial two cycles of therapy. Marked peaks of urinary neopterin were observed in the first week after administration of each dose of chemotherapy, but initially increased urinary neopterin concentrations gradually declined to normal range (Figure 1).

Patient 2 was a 52-year-old woman with recurrent EOC and breast carcinoma. EOC recurrent after first line paclitaxel/carboplatin chemotherapy progressed on therapy with docetaxel and cisplatin, gemcitabine and cisplatin, and topotecan. As a treatment of last resort, the patient was offered therapy with the combination of cetuximab (Erbix, Merck, Darmstadt, Germany; 400 mg/m² loading dose, then 250 mg/m² weekly), paclitaxel (Taxol; 90 mg/m² weekly), oxaliplatin (Eloxatin, Sanofi-Aventis, Quetigny, France; 50 mg/m² weekly), and continuous 5-fluorouracil (Ebewe, Unterach, Austria; 160 mg/m²/day). The therapy was initially well tolerated, but during the second week of therapy the patient reported nausea and vomiting that coincided with a marked peak of urinary neopterin concentrations. The administration of continuous 5-fluorouracil infusion was interrupted on day 11 and administration of paclitaxel and oxaliplatin was suspended after 3 weekly doses (on days 0, 7 and 14). The general condition of the patient declined further during subsequent administration of cetuximab in monotherapy on days 21, 28 and 35. The course of urinary neopterin concentrations was characterized by marked fluctuation and a gradual increase during the observation period. The rise of urinary neopterin reflected the deterioration of the condition of the patient who was complaining of weakness, nausea and, in the last week of observation, pain associated with the tumor growth. The patient died 13 days after the last measurement (Figure 2).

Patient 3 was an 81-year-old woman who came to the hospital with clinical signs of intestinal obstruction. Peritoneal carcinomatosis of ovarian origin was discovered during exploratory laparotomy. Surgical

palliation of intestinal obstruction was not possible, and as a therapy of last resort the patient was treated with the combination of paclitaxel (Taxol; 90 mg/m²) and carboplatin (Cycloplatin; area under the curve 2) every week. Only two doses of chemotherapy were administered (on days 0 and 7). The administration of therapy was complicated by diarrhea (more than 10 bowel movements/days) that started on day 5. The diarrhea was first considered to be the result of re-establishment of bowel transit after previous obstruction, and second dose of therapy was administered. The diarrhea continued and was accompanied by a rise of urinary neopterin. Despite supportive therapy, the general status of the patient did not improve, and she died less than 24 hours after the last measurement. A gradual rise in urinary neopterin concentrations was observed until the death of the patient (Figure 3).

Patient 4 was a 69-year-old woman with history of breast carcinoma and second recurrence of EOC. She was re-treated with the combination of paclitaxel (Taxol; 175 mg/m²) and carboplatin (Cycloplatin; area under the curve 6). On day 5 the patient complained about fever and weakness, and therapy with oral ofloxacin (Ofloxin, Zentiva, Praha, Czech Republic) was started. Two days later she came for a scheduled visit complaining about the deterioration of general status, anuria and anorexia. A marked rise of serum creatinine was detected (from 90 to 382 μmol/l). The patient was admitted, and her condition transiently improved after infusion therapy. However, on day 9 sepsis with hypotension and multiple organ failure was evident, and the patient died despite intensive therapy on day 12. A marked increase in urinary neopterin was observed after the administration of therapy, preceding the manifestation of the fatal complication (Figure 4).

Patient 5 was a 48-year-old woman with second recurrence of EOC that manifested as ascites that was positive for tumor cells on cytology. Because of interval from the last paclitaxel/platinum therapy of more than 6 months, the patient was treated with the combination of paclitaxel (Taxol; 175 mg/m²) and carboplatin (Cycloplatin; area under the curve 6) every 3 weeks that resulted in regression of ascites. The administration of the second dose had to be postponed because of prolonged neutropenia until after the last measurement. Filgrastim (Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA; 480 μg subcutaneously) was administered on days 10 - 12, resulting in a rise of urinary neopterin concentrations. Besides this peak, fluctuations of neopterin concentrations with peaks of few days' duration were observed during the first cycle (Figure 5).

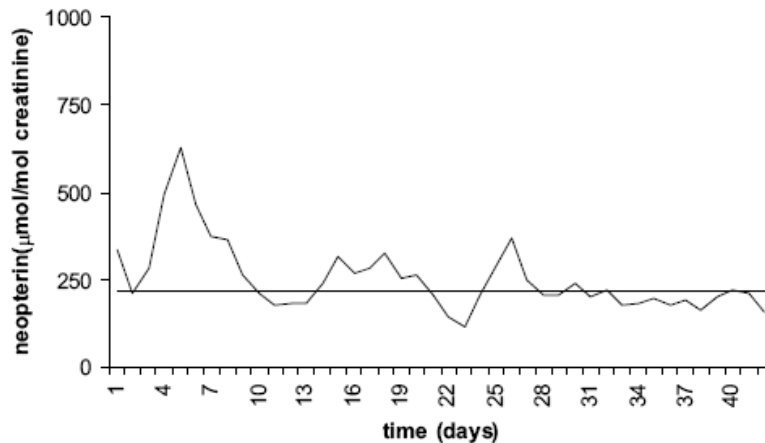


Figure 1. A 64-year-old woman with history of bilateral breast carcinoma and recurrent EOC presented with second recurrence of EOC that manifested as ascites. The patient was treated with the combination of paclitaxel (175 mg/m²) and carboplatin (area under the curve 6) every 3 weeks. Urinary neopterin was measured daily during the initial two cycles of therapy. Marked peaks of urinary neopterin were observed in the first week after administration of each dose of chemotherapy on days 0 and 22, but initially increased urinary neopterin concentrations gradually declined to normal range (from 333 to 156 µmol/mol creatinine). Serum CA125 concentrations declined during the same period from 2323 to 104 U/ml, and decreased to normal range during subsequent cycles of therapy. The urinary neopterin concentration of 213 µmol/mol creatinine defined as upper limit of normal in an earlier study is indicated by a line (4).

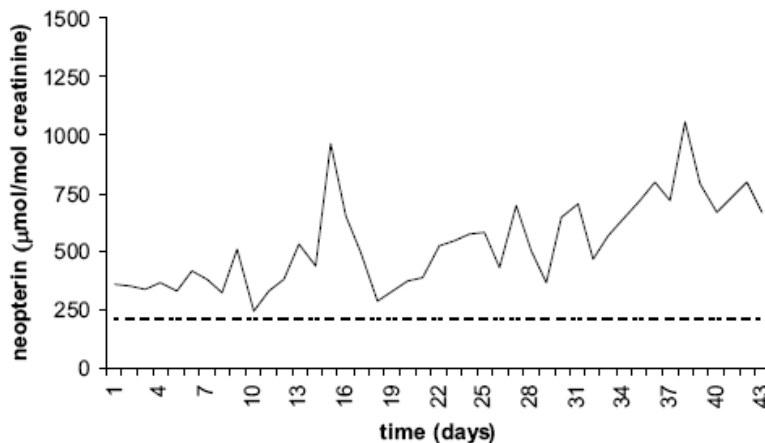


Figure 2. A 52-year-old woman with recurrent EOC and breast carcinoma presented with recurrent EOC that progressed on therapy with docetaxel and cisplatin, gemcitabine and cisplatin, and topotecan. She was treated with the combination of cetuximab (400 mg/m² loading dose, then 250 mg/m² weekly), paclitaxel (90 mg/m² weekly), oxaliplatin (50 mg/m² weekly), and continuous 5-fluorouracil (160 mg/m²/day). The therapy was tolerated well during the first weeks, but during the second week of therapy the patient reported nausea and vomiting that coincided with a marked peak of urinary neopterin concentrations. The administration of continuous 5-fluorouracil was interrupted on day 11 and administration of paclitaxel and oxaliplatin was suspended after 3 weekly doses (on days 0, 7 and 14). The general condition of the patient declined further during subsequent administration of cetuximab in monotherapy on days 21, 28 and 35. The course of urinary neopterin concentrations was characterized by marked fluctuation and a gradual increase during the observation period. The rise of urinary neopterin reflected the deterioration of the condition of the patient who was complaining of weakness, nausea and, in the last week of observation, pain associated with the tumor growth. The patient died 13 days after the last measurement. Serum CA125 was markedly increased (20 000 U/ml and above) throughout the course of therapy. The upper limit of normal urinary neopterin concentrations is indicated by dashed line.

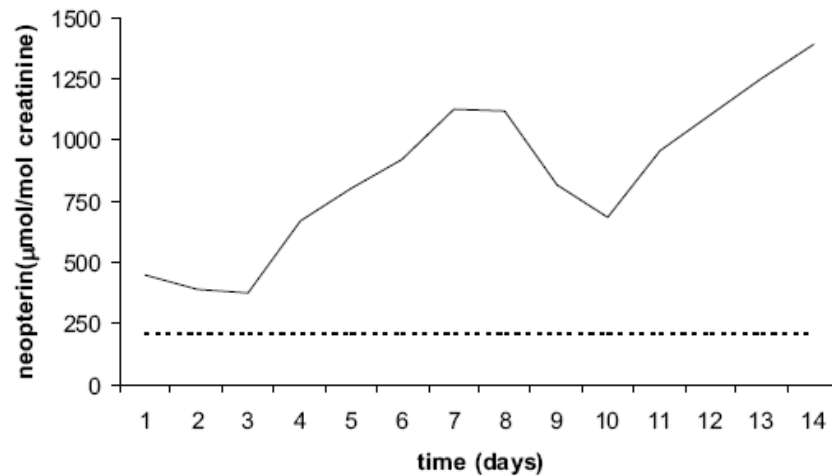


Figure 3. An 81-year-old woman with peritoneal carcinomatosis of ovarian origin that manifested as intestinal obstruction was treated with the combination of paclitaxel (90 mg/m²) and carboplatin (area under the curve 2) every week. Two doses of chemotherapy were administered on days 0 and 7. The administration of therapy was complicated by diarrhea (more than 10 bowel movements/days) that started on day 5. The diarrhea was first considered to be the result of re-establishment of bowel transit after previous obstruction, and second dose of therapy was administered, but the diarrhea continued and was accompanied by a rise of urinary neopterin. Despite supportive therapy, the general status of the patient did not improve, and she died less than 24 hours after the last measurement. A gradual rise in urinary neopterin concentrations was observed until the death of the patient. Serum CA125 decreased during the observation from 1158 to 800 U/ml. The upper limit of normal urinary neopterin concentrations is indicated by dashed line.

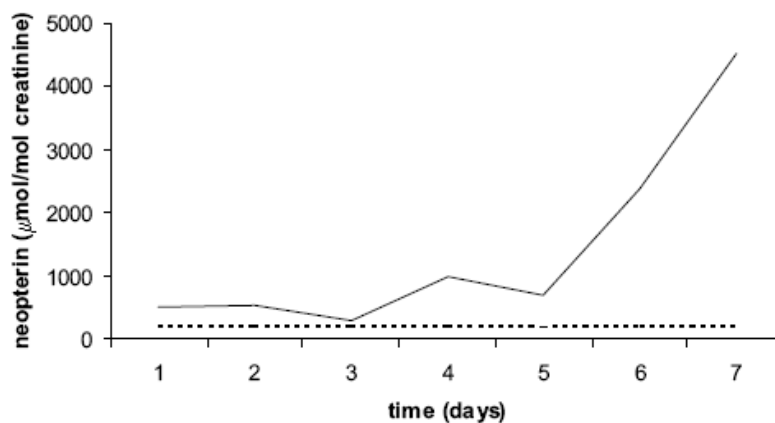


Figure 4. A 69-year-old woman with history of breast carcinoma and second recurrence of EOC was treated with the combination of paclitaxel (175 mg/m²) and carboplatin (area under the curve 6). On day 5 the patient complained about fever and weakness, and therapy with oral ofloxacin was started. Two days later she came for a schedule visit complaining about the deterioration of general status, anuria and anorexia. A marked rise of serum creatinine was detected (from 90 to 382 µmol/l). The patient was admitted and transiently improved after infusion therapy. However, on day 9 sepsis with hypotension and multiple organ failure was evident, and the patient died despite intensive therapy on day 12. A marked increase in urinary neopterin was observed after the administration of therapy, preceding the manifestation of the fatal complication. The upper limit of normal urinary neopterin concentrations is indicated by dashed line.

Discussion

Differences in the course of serial urinary neopterin

concentrations in the present study reflected differences in the disease course during chemotherapy with paclitaxel/platinum combination. EOC is currently the

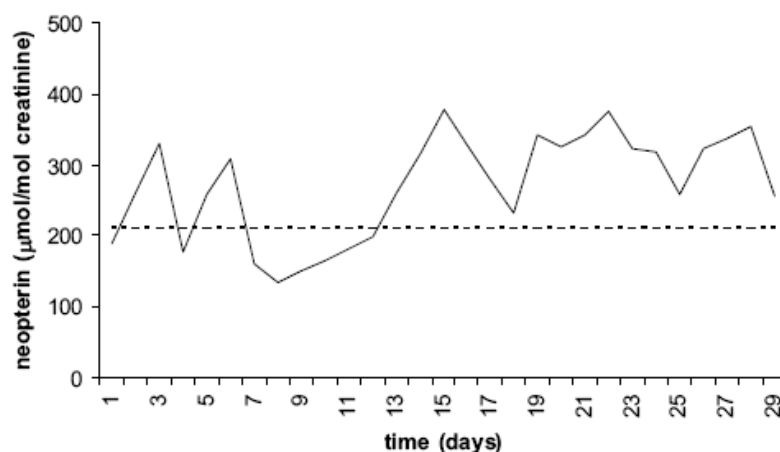


Figure 5. A 48-year-old woman with second recurrence of EOC was treated with the combination of paclitaxel (175 mg/m^2) and carboplatin (area under the curve 6) every 3 weeks that resulted in regression of ascites. The initial urinary neopterin concentration was within the normal range. The administration of the second dose had to be postponed because of prolonged neutropenia until after the last measurement. Filgrastim ($480 \mu\text{g}$ subcutaneously) was administered on days 10 - 12, resulting in a rise of urinary neopterin concentrations. Besides this peak, fluctuations of neopterin concentrations with peaks of few days' duration were observed during the first cycle. Serum CA125 was only mildly increased (128 U/ml) and decreased during the treatment (69 U/ml). The upper limit of normal urinary neopterin concentrations is indicated by dashed line.

leading cause of mortality for gynecological cancer (8). The high mortality rate of EOC reflects the difficulty in early diagnosis, and despite aggressive surgery and chemotherapy, most patients with advanced disease will ultimately relapse and die. On the other hand, the survival of patients with EOC has improved substantially over the recent decades. Combination of platinum derivatives (cisplatin or carboplatin) with paclitaxel currently represents the standard front line regimen for patients with advanced disease after demonstration of superior survival in randomized clinical trials (5, 6).

Neopterin is an unconjugated pteridine produced from guanosine triphosphate (GTP). GTP is converted to 7,8-dihydroneopterin triphosphate (which subsequently undergoes autooxidation to neopterin) by the enzyme GTP cyclohydrolase I, in a reaction that is the rate-limiting step in the pathway leading to the formation of tetrahydrobiopterin (9). The activity of GTP cyclohydrolase I is induced by interferon- γ (IFN- γ) (10), a cytokine produced by T-lymphocytes and natural killer cells. Human macrophages possess significant GTP cyclohydrolase I activity when stimulated by IFN- γ , while the activities of other enzymes of this pathway are low (11), leading to the accumulation of neopterin. Thus, measurement of neopterin concentrations may be used to assess macrophage activation and systemic immune activation. In earlier studies of serial urinary neopterin measurements in EOC, it has been reported that neopterin concentrations decrease after

successful therapy and increase during disease progression. Increased neopterin concentrations were also observed before death (3, 12-14). However, the intervals between measurements in these studies were longer (several days or several weeks). Results of daily measurements of urinary neopterin during therapy have been reported in a single patient with non-Hodgkin's lymphoma (15). In this report, marked fluctuations of daily neopterin concentrations with a trend of a decrease during therapy were observed. The fluctuations of daily neopterin measurements in the present report were less pronounced. This difference may reflect the difference between biology of non-Hodgkin's lymphoma, a neoplasm originating from the cells of the immune system, and EOC, a tumor that involves cells of the immune system only through secondary mechanisms. The daily monitoring of urinary neopterin concentrations used in the present study allowed an insight into the dynamics of interactions between the host and neoplasm during chemotherapy. The course and the outcome of the therapy differed in the patients presented here, therefore, a formal statistical analysis of the sequential data would be difficult and could even be misleading. In general, neopterin concentrations reflected the disease course, and progressive disease or complications of therapy were accompanied by a marked increase in urinary neopterin. A marked rise of urinary neopterin was associated with imminent death. In one patient, increase of urinary neopterin of an order of magnitude

preceded a fatal sepsis that was clinically evident only days later.

An increase of neopterin production has been documented after systemic administration of different cytokines (1) as well as in breast cancer patients treated with the combination of paclitaxel and doxorubicin (16). Moreover, both paclitaxel and cisplatin have been shown to activate macrophages *in vitro* (17, 18). In the present study we observed an increase of urinary neopterin concentrations after paclitaxel/platinum administration in some patients. In other patients, a distinct peak associated with administration of therapy was absent. Baseline urinary neopterin was increased above the normal range in all but one patient studied. Reduction of the tumor burden may result in lower neopterin as has been reported earlier (14), and this decrease might compromise any increase induced by activation of monocytes/macrophages by paclitaxel or platinum. The absence of a pronounced rise of urinary neopterin concentration could also indicate a paralysis of the immune response in patients with advanced cancer, or a rise resulting from macrophage activation induced by paclitaxel or platinum could be masked by increased neopterin concentrations caused by intercurrent conditions, e.g. sepsis.

An important advantage of utilization of neopterin for monitoring of systemic immune activation is that neopterin can be measured in urine. Consequently, samples may be collected repeatedly without the need for venepuncture, increasing the comfort for the patient. In addition, when refrigerated, neopterin is stable in urine for two weeks (19), and neopterin measurement can be used for outpatient monitoring without the need for repeated office visit. Determination of urinary neopterin in samples collected between the office visits allows objective assessment of any episode that is reported by the patient. Not unlike a flight recorder, the data from serial neopterin measurements could be useful in safety monitoring, and analysis of serial neopterin measurements could become an important tool in the monitoring of patients receiving anticancer drugs in prospective clinical trials. A retrospective analysis of daily neopterin concentrations may provide valuable corroboration of anamnestic data. In hospitalized patients, daily neopterin measurements could alert the physician to complications of therapy. Monitoring of urinary neopterin concentrations has already been proven useful in other clinical situation, e.g. in early detection of transplant rejection (9). Moreover, increased urinary neopterin may be associated with higher risk of the toxicity of chemotherapy (4, 20). This association may be explained by the alterations of the metabolism of cytotoxic drugs that accompany systemic inflammatory response (21), and in patients with

increased urinary neopterin concentration closer clinical monitoring of the patients may be warranted.

In conclusion, determination of serial urinary neopterin concentrations may be used for monitoring of EOC patients during paclitaxel/platinum chemotherapy and, possibly, other regimens of chemotherapy.

Acknowledgement

Supported by the grant of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR 8156-3.

References

- Melichar B, Solichová D, Freedman RS. Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 240 - 252.
- Park IS, Lee YS, Kim JC, Hwang SG. Serum neopterin levels in ovarian tumors. *Int J Gynaecol Obstet* 1995; 51: 229 - 234.
- Reibnegger G, Hetzel H, Fuchs D, et al. Clinical significance of neopterin for prognosis and follow-up in ovarian cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 4977 - 4981.
- Melichar B, Urbanek L, Krcmova L, et al. Urinary neopterin in patients with ovarian cancer. *Pteridines* 2006; 17: 145 - 153.
- McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996; 334: 1 - 6.
- Piccant MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 699 - 708.
- Cermanova M, Melichar B, Solichova D, et al. Urinary neopterin and microalbuminuria in patients treated by low-density lipoprotein apheresis. *Pteridines* 2005; 16: 174 - 183.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. *Cancer Statistics, 2004*. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8 - 29.
- Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989; 27: 81 - 141.
- Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, et al. Immune response-associated production of neopterin.

- Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 1984; 160: 310 - 316.
- 11 Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, et al. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T24 cell. *J Biol Chem* 1990; 265: 3189 - 3192.
 - 12 Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Hetzel H, Koenig K, Wachter H. Urinary neopterin excretion in patients with genital cancer. *Clin Biochem* 1982; 15: 38 - 40.
 - 13 Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Hetzel H, Reibnegger G, Wachter H. Measurement of urinary neopterin in normal pregnant and non-pregnant women and in women with benign and malignant genital tract neoplasms. *Arch Gynecol* 1983; 233: 121 - 130.
 - 14 Hetzel H, Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Significance of urinary neopterin in gynecological oncology: Follow-up of patients with ovarian cancer. *Cancer Detect Prev* 1983; 6: 263 - 266.
 - 15 Tomandl J, Palyza V, Tallova J, Drbal J. Time course of urinary neopterin in a non-Hodgkin's lymphoma patient during chemotherapy and radiotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23: 157 - 161.
 - 16 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Cermanova M, Urminska H, Ryska A. Systemic immune activation, anemia and thrombocytosis in breast cancer patients treated by doxorubicin and paclitaxel. *Pteridines* 2006; 17: 107 - 114.
 - 17 Mullins DW, Burger CJ, Elgert KD. Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol* 1999; 162: 6811 - 6818.
 - 18 Ranjan P, Sodhi A, Sristava A. Cisplatin and interferon-g treated murine macrophages induce apoptosis in tumor cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 1997; 8: 797 - 806.
 - 19 Wachter H, Fuchs D, Hausen A, et al. Neopterin. *Biochemistry - Methods - Clinical Application*. Walter de Gruyter: Berlin, 1992: 294.
 - 20 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Malirova E, Cermanova M, Zadak Z. Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 2006; 21: 190 - 198.
 - 21 Rivory LP, Slaviero KA, Clarke SJ. Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response. *Br J Cancer* 2002; 87: 277 - 280.

7.7. Příloha 7

Urinary neopterin in patients treated with gefitinib

Hana Kalabova, Josef Dvorak, Radomír Hyspler, Alena Ticha, Lenka Krcmova, Lubor Urbanek, Dagmar Solichova, Bohuslav Melichar

Pteridines, 18, 2007, str. 95-100

Pteridines
Vol. 18, 2007, pp. 95 - 100

Urinary Neopterin in Patients Treated with Gefitinib

Hana Kalabova¹, Josef Dvorak¹, Radomír Hyspler², Alena Ticha², Lenka Krcmova², Lubor Urbanek²,
Dagmar Solichova², Bohuslav Melichar¹

Departments of ¹Oncology & Radiotherapy, and ²Gerontology & Metabolic Care, Charles University Medical School & Teaching Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic.

Abstract

Inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGFR), including low molecular weight inhibitor erlotinib and gefitinib, have been demonstrated to be active antitumor agents in patients with non-small cell lung carcinoma and head and neck carcinomas. Increased concentrations of urinary neopterin, an indicator of systemic immune activation, have also been reported in patients with lung carcinoma and head and neck carcinomas. EGFR blockade has been reported to induce immune activation. We have measured, using high performance liquid chromatography, urinary neopterin in patients with non-small cell lung carcinoma and head and neck carcinomas treated with gefitinib. Intestinal permeability was also investigated at baseline by measuring, using capillary gas chromatography, urinary xylose, mannitol and lactulose after oral challenge. Compared to controls, urinary neopterin was significantly increased in patients with non-small cell lung carcinoma. No significant change in urinary neopterin was observed during the therapy with gefitinib. A significant correlation was observed between urinary neopterin and xylose absorption ($r_s = -0.58$, $p < 0.05$), lactulose/mannitol ($r_s = 0.75$, $p < 0.01$), and lactulose/xylose ($r_s = 0.62$, $p < 0.05$) ratios. In conclusion, EGFR blockade had no effect on systemic immune activation, evaluated with urinary neopterin. A significant correlation has been observed between urinary neopterin and parameters of intestinal permeability and absorption.

Key words: gefitinib; head and neck cancer; intestinal permeability; lung cancer; neopterin

Introduction

Epidermal growth factor receptor (EGFR) plays an important role in tumor progression, and strategies aimed at inhibition of EGFR signaling have recently been introduced into the therapy of solid tumors. Anti-EGFR agents include monoclonal antibodies and low-molecular inhibitors, e.g. gefitinib. Encouraging data have been originally reported for gefitinib in the therapy of non-small cell lung carcinoma (1, 2) and head and neck carcinomas (3). The therapy with EGFR inhibitors is generally well tolerated, but, similarly to other biological agents, EGFR inhibitors are associated with a peculiar toxicity profile, notably skin rash. The toxic effects of EGFR blockade reflect the multiple physiological roles of the receptor and its endogenous ligands. However, the information about the effect of EGFR blockade on systemic immune activation is limited. An enhanced immune response has been reported to result from EGFR blockade (4, 5).

Urinary and serum concentrations of neopterin, an

indicator of systemic immune activation, are increased in patients with advanced tumors, including lung cancer and head and neck carcinomas (6-8). Increased neopterin is a prognostic factor associated with inferior survival. Moreover, changes in neopterin concentrations have been observed in body fluids of cancer patients treated with cytokines or cytotoxic agents (9, 10).

Measurement of intestinal permeability is used to study the disorders of the barrier function of the gut mucosa in benign disorders, including inflammatory bowel disease and gluten enteropathy. The disorders of this barrier function may be defined by altered permeability to different substances, including non-metabolizable sugars. Intestinal permeability was also tested in patients treated by cytotoxic agents, and aberrations similar to those found in patients with benign intestinal disorders have been described (11).

In the present study, we have assessed urinary neopterin during the therapy with gefitinib in patients with lung cancer and head and neck carcinomas. We

Correspondence to: Prof. MUDr. Bohuslav Melichar Ph.D., Klinika onkologie a radioterapie, Lekarska fakulta Univerzity Karlovy a Fakultni nemocnice, Budova 23, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic.
Tel +420-49-5834574; fax +420-49-5832081; e-mail: melichar@fnhk.cz

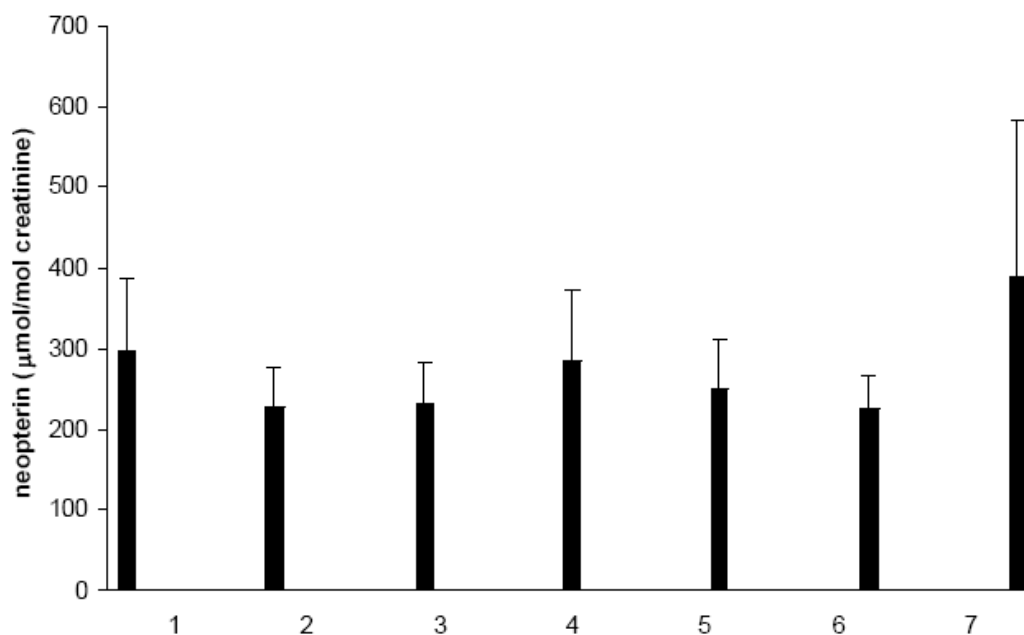


Figure 1. Urinary neopterin during the course of gefitinib therapy, urinary neopterin was determined immediately before the start of gefitinib therapy (visit 1) and at 6 subsequent visits at intervals (median) of 15, 34, 59, 80, 99 and 138 days. Shown are the means, with the error bars indicating standard error of the mean.

have observed no effect of gefitinib administration on urinary neopterin concentrations. In addition, intestinal permeability and xylose absorption were investigated in the patients at baseline, and a correlation has been observed between urinary neopterin and parameters of intestinal permeability and absorption.

Patients and Methods

Sixteen patients, aged (mean \pm standard deviation) 56 ± 9 , range 39 - 71 years enrolled in an expanded access program of gefitinib (Iressa, AstraZeneca, Macclesfield, United Kingdom) were studied. Ten patients, 8 males and 2 females, had non-small cell lung carcinoma and 6 patients, all males, had head and neck carcinoma. Nineteen healthy subjects, aged 52 ± 15 , range 25 - 88 years, 10 males and 9 females served as control group. All subjects studied were Caucasians. All patients have received prior chemotherapy and/or radiotherapy. Gefitinib was administered daily at the dose of 250 mg (in patients with non-small cell lung carcinoma) or 500 mg (in patients with head and neck carcinomas).

Urine sample were collected at scheduled visits, and stored at -20°C until analysis. After centrifugation (5 minutes, 1300 g) and diluting 100 μl of urine specimens with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of

disodium-EDTA per liter, samples were injected onto a column, and neopterin was determined using high performance liquid chromatography systems LC1084A with HP 79850 A integrator (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) as described (12). Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission) and quantified by external standard method. Creatinine was determined by Jaffe reaction after dilution of the sample 1:50 on a Hitachi 716 analyser (Tokyo, Japan) using a commercial kit (Boehringer, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions, and neopterin concentrations were expressed as neopterin to creatinine ratio ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine).

Intestinal permeability was investigated by determining urinary lactulose, xylose and mannitol after oral challenge as described earlier (13). Briefly, after an overnight fast, a pretest urine sample was collected to detect any endogenous mannitol, and the patients ingested 100 ml of the test solution containing 2 g of mannitol, 2 g of xylose, 10 g of lactulose, and 11 g of glucose in water. The patients then continued fasting for 2 hours, and urine was collected for 5 hours. Lactulose, xylose and mannitol were determined by capillary gas chromatography as described (13), and urinary excretion was expressed as percentage of the ingested dose as well as the ratios of lactulose/mannitol and lactulose/xylose.

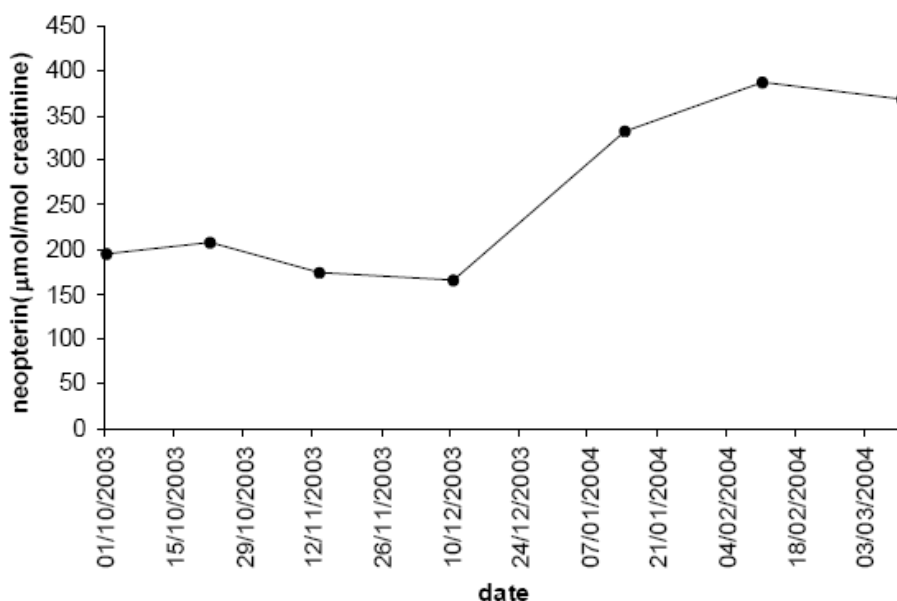


Figure 2. The course of urinary neopterin during gefitinib therapy in a patient with head and neck carcinoma. A 50-year-old male with squamous cell carcinoma of the head and neck recurrent after surgery, radiotherapy and chemotherapy with paclitaxel/carboplatin was treated with gefitinib 500 mg/day. The therapy was started in October 2003. A severe acneiform rash was noted in December 2003 that was later accompanied by purulent skin infection and an increase of urinary neopterin. Tumor progression was evident later in the course of the disease (in May 2004).

Urinary neopterin concentrations of patients and controls were compared by Mann-Whitney U test, and neopterin before and during the treatment was compared by Wilcoxon signed rank test. Correlations were examined by the Spearman's rank correlation coefficient. The decision on statistical significance was based on $p = 0.05$ level. The analyses were performed using NCSS 2001 software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA).

Results

Compared to controls, initial neopterin concentrations were significantly increased in 10 patients with non-small cell lung carcinoma (mean \pm standard deviation: 348 ± 348 , range: 81 - 1265 vs. 151 ± 82 , 55-364 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine; $p < 0.05$), but not in 6 patients with head and neck carcinomas (171 ± 111 , 71-383 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine).

Urinary neopterin was evaluated during the course of gefitinib therapy in 16 patients. In 13 patients, samples were obtained immediately before the start of therapy as well as during subsequent visits, while in 3 patients monitoring of urinary neopterin was initiated after the start of treatment. In 13 patients evaluated before the start of therapy, a median number of 6 (range: 2-11) additional measurements were available.

No significant changes were observed in urinary neopterin concentrations during the course of gefitinib therapy when evaluated at 6 subsequent visits at intervals (median) of 15, 34, 59, 80, 99 and 138 days (Figure 1). Similarly, no significant difference was observed when the pretreatment neopterin and a mean of subsequent neopterin concentrations in each patient were compared (297 ± 319 , 71-1265 vs. 250 ± 186 , 65-763 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine). In most patients, only mild fluctuations were observed during the course of gefitinib therapy. Occasionally, increased urinary neopterin accompanied skin complications or disease progression (Figure 2).

Intestinal permeability was examined in all 13 patients studied before therapy and in 10 controls. Compared to controls, patients had significantly increased absorption of xylose (26.3 ± 14.3 , 6.2-58.6 vs. 13.8 ± 5.2 , 7.8-25.5 %), lactulose 0.80 ± 0.87 , 0.16-3.62 vs. 0.32 ± 0.15 , 0.14-0.53 %), and lactulose/mannitol ratio (0.05 ± 0.04 , range 0.02-0.14 vs. 0.02 ± 0.01 , 0.01-0.04), while mannitol absorption (18.9 ± 10.5 , range 3.9-38.6 vs. 18.2 ± 4.1 , 12.6-26.3 %) and lactulose/xylose ratio (0.03 ± 0.04 , range 0.01-0.15 vs. 0.02 ± 0.01 , 0.01-0.04) were not significantly different in patients and controls. A significant correlation was observed in the patients between urinary neopterin and xylose absorption ($r_s = -0.58$, $p < 0.05$), lactulose/man-

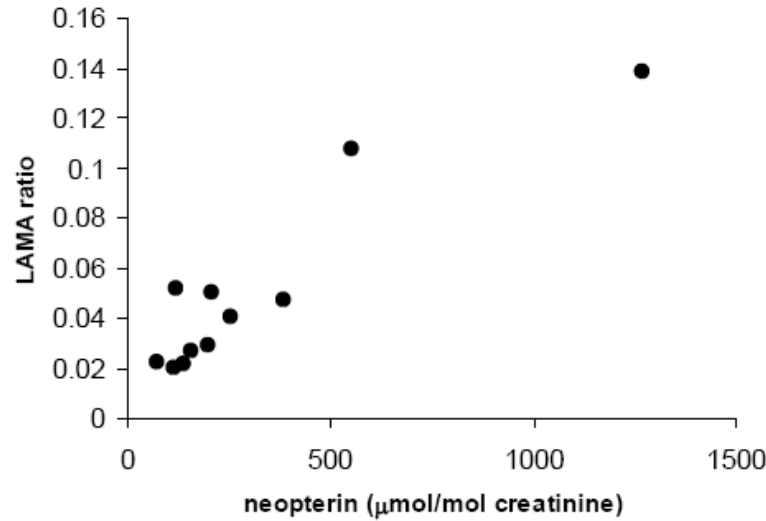


Figure 3. Correlation between urinary neopterin and lactulose/mannitol ratio. Shown is the correlation between urinary neopterin and lactulose/mannitol (LAMA) ratio in patients evaluated before the start of gefitinib therapy ($r_s = 0.75$, $p = 0.008$, $n = 11$). Lactulose/mannitol ratio was not evaluable in 2 patients because of high background mannitol excretion.

nitrol ($r_s = 0.75$, $p < 0.01$; Figure 3), and lactulose/xylose ($r_s = 0.62$, $p < 0.05$) ratios.

Discussion

In the present study EGFR blockade had no effect on systemic immune activation. We originally hypothesized that EGFR blockade could induce systemic immune activation through different potential mechanisms. EGFR inhibition could interfere with the barrier function of skin and mucous membranes, leading to increased penetration of microorganisms and systemic immune response. Apoptosis of tumor cells may also induce inflammatory response. In an experimental study, EGFR blockade was associated with an enhanced inflammatory response (4). An increase in soluble P-selectin, RANTES and soluble interleukin-2 receptor was observed after administration of gefitinib, suggesting that gefitinib may activate cell-mediated immunity (5). On the other hand, no changes in systemic concentrations of vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor were observed after gefitinib therapy (14).

The hypothesis that gefitinib administration would result in systemic immune activation, was not reflected in an increase neopterin concentrations in the present study. This could be partly due to limited effectiveness of gefitinib as anticancer agent. In fact, original encouraging data with this drug (1, 2) were not confirmed by subsequent studies, and the drug is currently no longer available in the United States and

European Union (15). Gefitinib seems to be more effective in Asian populations, and immune activation induced by the treatment with this drug has been reported in Asian patients (5). An increase of neopterin production has been documented in cancer patients after systemic administration of different cytokines (9) or with the combination of paclitaxel and doxorubicin (10). On the other hand, reduction of the tumor burden may result in lower neopterin (16). Inhibition of tumor growth by gefitinib might result in lower neopterin in some patients with increased baseline neopterin concentrations, and this decrease might neutralize any increase induced by activation of monocytes/macrophages by EGFR blockade.

Urinary neopterin was used here to study systemic immune activation after EGFR blockade. Neopterin is produced from guanosine triphosphate by macrophages stimulated by interferon- γ , and measurement of neopterin concentrations may be used to assess macrophage activation and systemic immune activation (17). An important advantage of utilization of neopterin for monitoring of systemic immune activation is that neopterin can be measured in urine. Monitoring of urinary neopterin concentrations has already been proven useful in other clinical situation, notably in early detection of transplant rejection (17). Increased urinary neopterin may also be associated with higher risk of the toxicity of chemotherapy (18, 19).

In the present study, a significant correlation was observed between urinary neopterin and alterations of

both intestinal permeability (lactulose/mannitol ratio) and absorption (xylose absorption). This observation is similar to the results obtained in a recent study in patients with epithelial ovarian carcinoma (19). Similarly to earlier reports (20, 21), present data demonstrate that laboratory parameters of intestinal permeability are increased in cancer patient before the start of therapy. The term intestinal permeability reflects the barrier function of bowel mucosa separating the internal milieu from the outside environment both in an immunologic and a metabolic sense (22). It has been demonstrated in experimental studies that interferon- γ is responsible for increased intestinal permeability (23, 24), but clinical data demonstrating an association between systemic immune activation and increased intestinal permeability are limited (19, 25).

Lung cancer is one of the most frequent malignant neoplasms and also one of the most frequent causes of cancer death. Similarly to other tumors, increased neopterin production is associated with poor prognosis. Kronberger *et al.* (7) assessed the prognostic significance of urinary neopterin in 72 patients with lung cancer. No difference was observed in urinary neopterin according the stage, histology, grade or performance status. Urinary neopterin exhibited a statistically significant positive correlation with leukocytes and serum alkaline phosphatase, and an inverse correlation with hemoglobin concentration. Neopterin was a significant prognostic indicator both in univariate and multivariate analyses. Prommegger *et al.* (6) evaluated the prognostic significance of urinary neopterin in 110 patients with operable lung carcinoma. Increased urinary neopterin was observed in 20 % of the patients. For 103 patients with non-small cell lung carcinoma, urinary neopterin above 212 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine was associated with increased risk of early death. Urinary neopterin and T stage were independent prognostic parameters of survival in the multivariate analysis. Murr *et al.* (8) investigated urinary neopterin in 23 patients with untreated squamous-cell carcinoma of the oral cavity and in 12 patients with recurrent disease. Increased urinary neopterin was observed in 19 patients, including 9 patients (75 %) with recurrent disease. Urinary neopterin was predictive of survival both in the univariate and in the multivariate analysis.

In conclusion, EGFR blockade had no effect on systemic immune activation, evaluated with urinary neopterin, in Caucasian population. A significant correlation has been observed between urinary neopterin and parameters of intestinal permeability and absorption.

Acknowledgement

Supported by the Research Project of the Ministry of Health of the Czech Republic MZO 00179906.

References

- 1 Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, *et al.* Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2237-2246.
- 2 Park J, Park BB, Kim JY, *et al.* Gefitinib (ZD1839) monotherapy as salvage regimen for previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4383-4388.
- 3 Cohen EEW. Role of epidermal growth factor receptor pathway-targeted therapy in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2659-2665.
- 4 Mascia F, Mariani V, Girolomoni G, Pastore S. Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 303-312.
- 5 Kanazawa S, Yamaguchi K, Konoshita Y, Komiyama Y, Muramatsu M, Nomura S. Elevation of soluble interleukin-2 receptor in patients with non-small cell lung cancer treated with gefitinib. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 719-725.
- 6 Prommegger R, Widner B, Murr C, Unger A, Fuchs D, Salzer GM. Neopterin: a prognostic variable in operations for lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 1861-1864.
- 7 Kronberger P, Weiss G, Tschmelitsch J, *et al.* Predictive value of urinary neopterin in patients with lung cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 831-837.
- 8 Murr C, Berchtold J, Norer B, Waldhart E, Wachter H, Fuchs D. Neopterin as a prognostic parameter in patients with squamous-cell carcinomas of the oral cavity. *Int J Cancer* 1998; 79: 476-480.
- 9 Melichar B, Solichová D, Freedman RS. Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 240-252.
- 10 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Cermanova M, Urminska H, Ryska A. Systemic immune activation, anemia and thrombocytosis in breast cancer patients treated by doxorubicin and paclitaxel. *Pteridines* 2006; 17: 107-114.
- 11 Melichar B, Dvorak J, Hyspler R, Zadak Z.

- Intestinal permeability in the assessment of intestinal toxicity of cytotoxic agents. *Chemotherapy* 2005; 51: 336-338.
- 12 Cermanova M, Melichar B, Solichova D, et al. Urinary neopterin and microalbuminuria in patients treated by low-density lipoprotein apheresis. *Pteridines* 2005; 16: 174-183.
 - 13 Melichar B, Kohout P, Bratova M, Solichova D, Kralickova P, Zadak Z. Intestinal permeability in patients with chemotherapy-induced stomatitis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 314-318.
 - 14 Yoshimoto A, Kasahara K, Nishio M, et al. Changes in angiogenic growth factor levels after gefitinib treatment in non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 233-238.
 - 15 Blackhall F, Ranson M, Thatcher N. Where next for gefitinib in patients with lung cancer? *Lancet Oncol* 2006; 7: 499-507.
 - 16 Hetzel H, Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Significance of urinary neopterin in gynecological oncology: Follow-up of patients with ovarian cancer. *Cancer Detect Prev* 1983; 6: 263-266.
 - 17 Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989; 27: 81-141.
 - 18 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Malirova E, Cermanova M, Zadak Z. Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 2006; 21: 190-198.
 - 19 Melichar B, Urbanek L, Krcmova L, et al. Urinary neopterin in patients with ovarian cancer. *Pteridines* 2006; 17: 145-153.
 - 20 Parrilli G, Iaffaioli RV, Martorano M, et al. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 3689-3691.
 - 21 Sundstrom GM, Wahlin A, Nordin-Anderson I, Suhr OB. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 1998; 61: 250-254.
 - 22 DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 385-396.
 - 23 Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; 171: 6164-6172.
 - 24 Luyer MD, Buurman WA, Hadfoune M, et al. Exposure to bacterial DNA before hemorrhagic shock strongly aggravates systemic inflammation and gut barrier loss via an IFN-gamma-dependent route. *Ann Surg* 2007; 245: 795-802.
 - 25 Rollins NC, Filteau SM, Coutoudis A, Tomkins AM. Feeding mode, intestinal permeability, and neopterin excretion: a longitudinal study in infants of HIV-infected South African women. *J Acq Immun Def Synd* 2001; 28: 132-139.

7.8. Příloha 8

Serum alpha-tocopherol, retinol and neopterin during paclitaxel/ carboplatin chemotherapy

Bohuslav Melichar, Hana Kalábová, Lenka Krčmová, Lubor Urbánek, Radomír Hyšpler, Eva Malířová and Dagmar Solichová
Anticancer Research, 27, 2007, str. 4397-4402

Serum Alpha-tocopherol, Retinol and Neopterin during Paclitaxel/Carboplatin Chemotherapy

BOHUSLAV MELICHAR¹, HANA KALÁBOVÁ¹, LENKA KRČMOVÁ², LUBOR URBÁNEK²,
RADOMÍR HYŠPLER², EVA MALÍŘOVÁ³ and DAGMAR SOLICHOVÁ²

Departments of ¹Oncology and Radiotherapy, ²Gerontology and Metabolic Care, and ³Nuclear Medicine,
Charles University Medical School and Teaching Hospital, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Abstract. *Background: Disorders of antioxidant balance are considered to be involved in the toxicity associated with radiotherapy or chemotherapy. Patients and Methods: Serum alpha-tocopherol and retinol were determined, by high performance liquid chromatography, before and during therapy with a combination of paclitaxel and carboplatin in 28 patients with breast and ovarian cancer. Serum neopterin and cholesterol were measured using a radioimmunoassay and enzymatic colorimetric method, respectively. Results: Compared to pretreatment concentrations, a significant increase was observed in serum alpha-tocopherol and retinol concentrations during therapy that was associated with decreased serum neopterin concentrations. Serum alpha-tocopherol concentrations were significantly higher during therapy in patients who did not experience serious toxicity. Conclusion: An increase in alpha-tocopherol and retinol during therapy with combination paclitaxel/carboplatin may be explained by inhibition of systemic immune activation secondary to control of the tumor with effective chemotherapy. Lower alpha-tocopherol concentrations were associated with the toxicity of therapy.*

Administration of cytotoxic drugs is associated with oxidative stress (1, 2), and disorders of antioxidant balance may be involved in the toxicity associated with anticancer treatment. Vitamin E represents a major antioxidant in the serum (3). Retinol is a major circulating form of vitamin A that also has antioxidant activity (3).

Another molecule associated with antioxidant balance is neopterin, an unconjugated pteridine synthesized from

guanosine triphosphate (4). Human monocytes/macrophages produce significant quantities of neopterin when stimulated with interferon- γ , and neopterin is regarded as an indicator of systemic immune activation. Increased urinary and serum neopterin concentrations have been reported in patients with different primary tumors, including epithelial ovarian carcinoma (EOC) or metastatic breast carcinoma (4-6). An association has been detected between the course of the disease and neopterin levels. Neopterin concentrations decreased after successful therapy, but increased during disease progression. Elevated neopterin concentrations were limited to patients with active disease, and normal neopterin levels were reported in patients without evidence of disease activity (4). Increased urinary neopterin has also been associated with poor prognosis both in EOC (4, 5) and breast carcinoma (7).

The term vitamin E denotes several naturally occurring tocopherols and tocotrienols, but alpha-tocopherol is responsible for most vitamin E activity in animal tissues (3). Disorders of antioxidant balance involving vitamin E are thought to be involved in the toxicity associated with radiotherapy (8, 9), or chemotherapy (10), and a decrease in serum alpha-tocopherol has been observed during systemic chemotherapy (1, 2, 11, 12). Retinol plays an essential role in many physiological functions, including vision, growth, development, differentiation and the immune response (3).

The combination of platinum derivatives (cisplatin or carboplatin) with paclitaxel represents currently the standard front line regimen for patients with advanced EOC after demonstration of superior survival in randomized clinical trials (13, 14). This combination is also active in patients with metastatic breast carcinoma (15). The combination of paclitaxel and carboplatin has a relatively favorable toxicity profile. Although this combination is one of the most commonly used in medical oncology, little is known about its effect on antioxidant balance.

In the present study, the serum alpha-tocopherol, retinol, neopterin and cholesterol concentrations in breast and

Correspondence to: Bohuslav Melichar, MD, Ph.D., Professor of Medicine, Department of Oncology and Radiotherapy, Charles University Medical School and Teaching Hospital, Sokolská 581, Building 23, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic. Tel: +420 49 5834574, Fax: +420 49 5832081, e-mail: melichar@fnhk.cz

Key Words: Alpha-tocopherol, carboplatin, paclitaxel, retinol.

ovarian cancer patients treated with paclitaxel and platinum chemotherapy have been investigated. The principal aim was to investigate changes of serum retinol, alpha-tocopherol and neopterin during chemotherapy with combination paclitaxel/carboplatin. As the concentrations of alpha-tocopherol are dependent on serum lipid levels, serum cholesterol was determined to estimate the alpha-tocopherol/cholesterol ratio. A secondary aim of the study was to compare these parameters with the presence or absence of serious (grade 3 or higher) toxicity.

Patients and Methods

Twenty-eight women, mean age 56 ± 10 (range 34-74) years, treated with paclitaxel and carboplatin, were included in the present study. Nine patients had ovarian cancer (primary EOC 7 patients and Krukenberg tumors 2 patients), and 19 patients had breast carcinoma. Three of the patients with primary EOC also had a history of breast cancer. Four patients were chemotherapy-naïve and 24 patients had a history of previous chemotherapy. Sixteen patients were treated with a combination of paclitaxel (175 mg/m^2) and carboplatin (area under the curve 6) administered every 3 weeks. Twelve patients were treated with a weekly regimen of paclitaxel (90 mg/m^2) with carboplatin (area under the curve 2) with (8 patients) or without (4 patients) trastuzumab (4 mg/kg loading dose, then 2 mg/kg weekly). The study protocol was approved by the institutional ethical committee and the patients signed informed consent. No supplementary vitamins were prescribed, and the patients were advised to take a normal diet. The toxicity was assessed using Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0 (16). Serious toxicity was defined as of grade 3 or higher.

Serum alpha-tocopherol and retinol were determined before and during the therapy by high performance liquid chromatography as described previously (17). Blood samples were drawn from a peripheral vein after an overnight fast. The samples were transferred immediately to the laboratory, centrifuged ($1600 \times g$, 10 minutes, 16°C), and the serum was frozen at -20°C until analysis. In the liquid-liquid extraction procedure, 500 μl of serum was deproteinized by cool ethanol denatured with 5% methanol (500 μl , 5 minutes, 4°C). Subsequently, 2500 μl of n-hexane was added to this mixture and extracted for 5 minutes by a vortex apparatus. After centrifugation ($1600 \times g$, 10 minutes, 0°C), the aliquot (2000 μl) of the clean extract was separated and evaporated under nitrogen (60°C). The residue was dissolved in 400 μl methanol and analysed by reversed-phase high performance liquid chromatography using external standard calibration. The analyses were performed using the Perkin Elmer high performance liquid chromatography set (Norwalk, CT, USA) comprising a LC 200 pump, a LC 200 autosampler, LC Column Oven 101 thermostat and LC 235C Diode Array Detector attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. The separation of alpha-tocopherol and retinol was performed using a Chromolith Performance RP-18e, $100 \times 4.6 \text{ mm}$ monolithic columns (Merck, Darmstadt, Germany). As the mobile phase 100% methanol was used at a flow rate of 2.5 ml/min^{-1} and column pressure of 3.3 MPa. A block heater LC Oven 101 (Perkin Elmer) was utilized to keep the analytical column temperature at 25°C . The injection volume was 50 μl . The detection of alpha-tocopherol and retinol was carried out at 295 nm and at 325 nm, respectively.

Serum neopterin was determined with radioimmunoassay using a commercial kit (Brahms, Hennigsdorf, Germany) according to the instructions of the manufacturer. Serum cholesterol was determined by an enzymatic colorimetric test (with cholesterol esterase and cholesterol oxidase) using a modular analyzer with a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Roche, Mannheim, Germany).

The significance of differences during the therapy compared to pretreatment values was studied by Wilcoxon paired test, the differences of concentrations in patients with or without toxicity were evaluated by Mann-Whitney *U*-test, and correlations were analyzed with Spearman's rank correlation coefficient using NCSS 2001 software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA). The decision on statistical significance was based on $p < 0.05$ level.

Results

The serum samples were obtained before the start of therapy (baseline, visit 1), during the first cycle of chemotherapy (one week after the start of treatment, visit 2), at the end of the first or second cycle of chemotherapy (visit 3), and before subsequent chemotherapy cycles (visit 4). The median number of measurements during therapy was 3 (range 1-8). Compared to pretreatment concentrations (Table I), a significant increase was observed in alpha-tocopherol and retinol concentrations, and alpha-tocopherol/cholesterol ratios throughout the course of therapy. A slight increase in serum cholesterol was observed that did not reach statistical significance. In contrast, a trend of decreased serum neopterin was observed that reached significance at visit 3. Similar results were observed when means of all measurements subsequent to visit 2 were evaluated.

Ten patients experienced serious (grade 3 or higher) toxicity during the first 6 weeks of therapy (leukopenia or neutropenia 5 patients, diarrhea 2 patients, nausea 2 patients, anemia 1 patient). Serum alpha-tocopherol concentrations were significantly higher in patients who did not experience serious toxicity at visits 2 and 3 and serum retinol was significantly higher at visit 2 (Table II).

Baseline serum concentrations of cholesterol significantly correlated with retinol ($r_s = 0.54$; $p = 0.005$) and alpha-tocopherol ($r_s = 0.43$; $p = 0.02$). A correlation was observed between retinol and alpha-tocopherol ($r_s = 0.43$; $p = 0.02$), and baseline serum neopterin correlated inversely with cholesterol ($r_s = -0.47$; $p = 0.02$).

Discussion

The significant increase of serum alpha-tocopherol and retinol concentrations during paclitaxel/carboplatin combination chemotherapy observed in the present study may seem rather unexpected in the light of earlier reports of decreased alpha-tocopherol concentrations during systemic chemotherapy that were associated with oxidative stress induced by the therapy (1, 2, 11, 12). Moreover,

Table I. Serum retinol, alpha-tocopherol and neopterin levels before, during and after chemotherapy treatment

	Visit 1 (baseline)	Visit 2 (during the first cycle)	Visit 3 (at the end of first or second cycle)	Visit 4 (subsequent to visit 3)	Mean of all measurements subsequent to visit 2
Time from the start of therapy (days)	0	8±4	23±10	46±34	-
Retinol (µmol/l)	1.27±0.53 (0.12-2.24)	1.56±0.62*** (0.31-2.65)	1.67±0.66*** (0.64-3.44)	1.76±0.64** (0.65-3.63)	1.64±0.62*** (0.64-3.33)
Alpha-tocopherol (µmol/l)	23.6±5.2 (12.5-35.5)	26.4±6.4** (17.5-40.9)	27.5±6.1*** (17.7-40.9)	27.7±6.4** (18.3-41.5)	27.4±5.6** (19.7-40.2)
Neopterin (nmol/l)	8.4±4.3 (3.8-17.9)	8.6±4.4 (3.4-17.2)	7.2±4.1* (2.7-19.6)	7.0±4.4 (3.3-23.5)	7.0±3.6 (3.0-19.6)
Cholesterol (mmol/l)	5.29±0.96 (3.96-7.67)	5.35±1.05 (3.79-7.92)	5.70±1.03 (3.39-7.62)	5.79±1.06 (4.12-7.70)	5.74±0.94* (3.96-7.69)
Alpha-tocopherol/cholesterol (mmol/mol)	4.49±1.00 (3.05-7.17)	5.05±0.81** (3.69-6.61)	4.82±0.74** (3.05-6.61)	4.87±0.76* (3.57-6.11)	4.81±0.66** (3.46-6.29)

Shown are means±standard deviations (range). Wilcoxon paired test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ compared to baseline.

Table II. Serum analysis before therapy, during and after the first cycle of chemotherapy in patients with or without serious toxicity.

Parameter	No serious toxicity (n=18)	Serious toxicity (n=10)	p-value
Retinol-visit 1(µmol/l)	1.38±0.47 (0.59-2.24)	1.07±0.59 (0.12-2.08)	0.12
Retinol-visit 2 (µmol/l)	1.73±0.59 (0.63-2.65)	1.26±0.59 (0.31-2.20)	0.047
Retinol-visit 3 (µmol/l)	1.82±0.69 (1.11-3.44)	1.39±0.51 (0.64-2.02)	0.20
Alpha-tocopherol-visit 1 (µmol/l)	25.0±4.5 (17.4-35.5)	20.9±5.6 (12.5-29.0)	0.08
Alpha-tocopherol -visit 2 (µmol/l)	28.4±6.7 (17.5-40.9)	22.9±4.3 (18.3-30.2)	0.042
Alpha-tocopherol-visit 3 (µmol/l)	29.5±6.4 (17.7-40.9)	23.9±3.7 (18.2-29.5)	0.020
Neopterin-visit 1(nmol/l)	7.6±3.3 (3.8-15.0)	9.9±5.7 (4.2-17.9)	0.48
Neopterin-visit 2 (nmol/l)	7.2±3.3 (3.4-13.6)	10.8±5.1 (5.0-17.2)	0.10
Neopterin-visit 3 (nmol/l)	6.3±3.4 (2.7-16.6)	8.9±4.9 (3.8-19.6)	0.07
Cholesterol-visit 1 (mmol/l)	5.52±1.05 (3.96-7.67)	4.81±0.54 (4.11-5.61)	0.11
Cholesterol-visit 2 (mmol/l)	5.63±1.21 (3.79-7.92)	4.94±0.60 (4.00-6.07)	0.19
Cholesterol-visit 3 (mmol/l)	5.90±1.07 (3.39-7.62)	5.35±0.90 (4.11-6.93)	0.23
Alpha-tocopherol/cholesterol-visit 1 (mmol/mol)	4.66±0.93 (3.63-7.17)	4.15±1.12 (3.05-6.51)	0.13
Alpha-tocopherol/cholesterol-visit 2 (mmol/mol)	5.33±0.81 (3.95-6.61)	4.64±0.62 (3.69-5.39)	0.09
Alpha-tocopherol/cholesterol-visit 3 (mmol/mol)	5.00±0.74 (3.96-6.61)	4.52±0.68 (3.05-5.15)	0.23

Shown are means±standard deviations (range) and respective p-values (Mann-Whitney U-test). Visit 1, before therapy; visit 2, during the first cycle of chemotherapy; visit 3, at the end of the first or second cycle of chemotherapy.

administration of paclitaxel/carboplatin chemotherapy is associated with small bowel dysfunction, and disturbance of the small bowel is accompanied by low serum concentration of retinol (18, 19). Despite this, a moderate, but statistically significant increase in serum retinol was observed.

Only a minor increase of serum cholesterol was observed, while an increase of serum alpha-tocopherol was accompanied by an increased alpha-tocopherol/cholesterol ratio. Thus, the change of serum alpha-tocopherol was not due to changes in serum lipid levels. It has been demonstrated previously that serum concentrations of alpha-tocopherol and retinol were significantly decreased in

patients with advanced cancer (20, 21). It has also been shown that the decrease of serum alpha-tocopherol and retinol concentrations correlated with the systemic inflammatory response (20, 22). The synthesis of retinol binding protein was decreased by pro-inflammatory cytokines (23). Moreover, anti-inflammatory therapy (ibuprofen) in patients with advanced cancer led to an increase in serum carotenoids (21). The increase in serum alpha-tocopherol and retinol observed after administration of paclitaxel/carboplatin chemotherapy in this study was therefore probably linked to suppression of the systemic inflammatory response by the chemotherapy.

Although both paclitaxel and cisplatin have been demonstrated to activate macrophages *in vitro* (24, 25), and we have recently reported an increase of urinary neopterin in breast cancer patients treated with a combination of paclitaxel and doxorubicin (6), in the present study a decrease rather than an increase of serum neopterin was observed after administration of paclitaxel/ carboplatin chemotherapy. This was in agreement with earlier data showing that the reduction of tumor burden may result in lower neopterin concentrations (26). Baseline serum neopterin was above the normal range in most patients, and the decrease in serum neopterin may have reflected suppression of the systemic inflammatory response associated with effective anti-tumor therapy. An increase in serum alpha-tocopherol has also been reported recently after hyperthermia (27). Serum retinol is bound to retinol binding protein (3), and serum levels of retinol binding protein are markedly increased in patients with renal dysfunction (28). Thus, the mild elevation of retinol observed in the present study could also have resulted from an increase of retinol binding protein secondary to subclinical renal toxicity induced by the platinum derivatives.

While all the patients in the current study had assessment of alpha-tocopherol and retinol at baseline and during the first chemotherapy cycle, the number of subsequent measurements was different because of the differences in the duration of therapy in individual patients. Therefore, in addition to the evaluation of the results obtained at the end of the first or second cycle, an analysis was also performed of the means of sequential measurements as described by Matthews *et al.* (29), and alpha-tocopherol and retinol concentrations assessed at the end of the first or second cycle as well as the means of sequential measurement showed similar results.

In earlier studies, low vitamin E intake was associated with toxicity of chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia (30). The administration of vitamin E has been shown to alleviate some side effects of radiotherapy (8) or chemotherapy (10). Although serial monitoring of vitamin E levels may be a necessary prerequisite for any therapeutic use of this antioxidant vitamin, serum vitamin E is not being routinely measured in cancer patients. In most reports published to date, alpha-tocopherol has been investigated in epidemiological studies in relation to cancer risk. For example, lower vitamin E concentrations have been reported in patients with breast cancer (31). Lower alpha-tocopherol concentrations during the first 6 weeks of therapy in the present study were associated with significant toxicity. Low serum alpha-tocopherol could be a consequence of chemotherapy toxicity resulting in lower food intake. Lower serum alpha-tocopherol could also increase the risk of toxicity or reflect the presence of other factor(s)

associated with a higher risk of toxicity. In fact a trend of lower baseline alpha-tocopherol was observed in patients who subsequently experienced toxicity. However, these results should be regarded as preliminary, and only an interventional study of vitamin E supplementation in a larger cohort could clarify whether decreased serum alpha-tocopherol is a consequence or cause of chemotherapy toxicity.

We conclude that, contrary to expectations based on previous reports, serum alpha-tocopherol and retinol increased significantly during the therapy with combination paclitaxel/carboplatin, but lower alpha-tocopherol concentrations were observed during the therapy in patients who experienced serious toxicity. An increase in serum alpha-tocopherol and retinol after paclitaxel/carboplatin chemotherapy seems to be associated with the suppression of the systemic immune and inflammatory response secondary to tumor control induced by chemotherapy.

Acknowledgements

Supported by the grants from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR 8156-3 and NR9096-4.

References

- 1 Faber M, Coudray C, Hida H, Mousseau M and Favier A: Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biol Trace Elem Res* 47: 117-123, 1995.
- 2 Faure H, Coudray C, Mousseau M, Ducros V, Douki T, Bianchini F, Cadet J and Favier A: 5-Hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in adriamycin-treated patients. *Free Rad Biol Med* 20: 979-983, 1996.
- 3 Debier C and Larondelle Y: Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr* 93: 153-174, 2005.
- 4 Melichar B, Solichová D and Freedman RS: Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 16: 240-252, 2006.
- 5 Melichar B, Urbanek L, Kremova L, Kalabova H, Svobodova I, Dragounova E, Vesely P, Hyspler R and Solichova D: Urinary neopterin in patients with ovarian cancer. *Pteridines* 17: 145-153, 2006.
- 6 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Cermanova M, Urmínska H and Ryska A: Systemic immune activation, anemia and thrombocytosis in breast cancer patients treated by doxorubicin and paclitaxel. *Pteridines* 17: 107-114, 2006.
- 7 Murr C, Berant A, Widschwendter M, Heim K, Schrocksnadel H and Fuchs D: Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer. *Clin Chem* 45: 1998-2004, 1999.
- 8 Delanian S, Porcher R, Balla-Mekias S and Lefaix JL: Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 21: 2545-2550, 2003.

- 9 Erhola M, Nieminen MM and Ojala A: Human plasma antioxidant capacity during radiotherapy for lung cancer: a clinical study. *J Exp Clin Cancer Res* 17: 325-330, 1998.
- 10 Pace A, Savarese A, Picardo M, Maresca V, Pacetti U, Del Monte G, Biroccio A, Leonetti C, Jandolo B, Cognetti F and Bove L: Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. *J Clin Oncol* 21: 927-931, 2003.
- 11 Jonas RC, Puckett AB, Jones DP, Griffith DP, Szeszycki EE, Bergman GF, Furr CE, Tyre C, Carlson JL, Galloway JR, Blumberg JB and Ziegler TR: Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *Am J Clin Nutr* 72: 181-189, 2000.
- 12 High KP, Legault C, Sinclair JA, Cruz J, Hill K and Hurd DD: Low plasma concentrations of retinol and alpha-tocopherol in hematopoietic stem cell transplant recipients: the effect of mucositis and the risk of infection. *Am J Clin Nutr* 76: 1358-1366, 2002.
- 13 McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL and Davidson M: Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 334: 1-6, 1996.
- 14 Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E, Stuart G, Kaye S, Vergote I, Blom R, Grimshaw R, Atkinson RJ, Swenerton KD, Trope C, Nardi M, Kaern J, Tumulo S, Timmers P, Roy JA, Lhoas F, Lindvall B, Bacon M, Birt A, Andersen JE, Zee B, Paul J, Baron B and Pecorelli S: Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 92: 699-708, 2000.
- 15 Fountzilas G, Kalofonos HP, Dafni U, Papadimitriou C, Bafaloukos D, Papakostas P, Kalogera-Fountzila A, Gogas H, Aravantinos G, Mouloupoulos LA, Economopoulos T, Pectasides D, Maniadas N, Sifaka V, Briasoulis E, Christodoulou C, Tsavdaridis D, Makrantonakis P, Razis E, Kosmidis P, Skarlos D and Dimopoulos MA: Paclitaxel and epirubicin versus paclitaxel and carboplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced breast cancer: a phase III study conducted by the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Ann Oncol* 15: 1517-1526, 2004.
- 16 Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0. [http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc_v30.html]
- 17 Urbanek L, Solichova D, Melichar B, Dvorak J, Svobodova I and Solich P: Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. *Anal Chim Acta* 573-574: 267-272, 2006.
- 18 Slater GH, Ren CJ, Siegel N, Williams T, Barr D, Wolfe B, Dolan K and Fielding GA: Serum fat-soluble vitamin deficiency and abnormal calcium metabolism after malabsorptive bariatric surgery. *J Gastrointest Surg* 8: 48-55, 2004.
- 19 Johnson EJ, Krasinski SD, Howard LJ, Alger SA, Dutta SK and Russell RM: Evaluation of vitamin A absorption by using oil-soluble and water-miscible vitamin A preparations in normal adults and in patients with gastrointestinal disease. *Am J Clin Nutr* 55: 857-864, 1992.
- 20 McMillan DC, Talwar D, Sattar N, Underwood M, O'Reilly DSJ and McArdle C: The relationship between reduced vitamin antioxidant concentrations and the systemic inflammatory response in patients with common solid tumours. *Clin Nutr* 21: 161-164, 2002.
- 21 McMillan DC, Sattar N, Talwar D, O'Reilly J and McArdle CS: Changes in micronutrient concentrations following anti-inflammatory treatment in patients with gastrointestinal cancer. *Nutrition* 16: 425-428, 2000.
- 22 Mayland C, Allen KR, Degg TJ and Bennet M: Micronutrient concentrations in patients with malignant disease: effect of the inflammatory response. *Ann Clin Biochem* 41: 138-141, 2004.
- 23 Banks RE, Forbes MA, Storr M, Higginson J, Thompson D, Raynes J, Illingworth JM, Perren TJ, Selby PJ and Whicher JT: The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exp Immunol* 102: 217-223, 1995.
- 24 Mullins DW, Burger CJ and Elgert KD: Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol* 162: 6811-6818, 1999.
- 25 Ranjan P, Sodhi A and Sristava A: Cisplatin and interferon- γ treated murine macrophages induce apoptosis in tumor cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 8: 797-806, 1997.
- 26 Hetzel H, Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G and Wachter H: Significance of urinary neopterin in gynecological oncology: follow-up of patients with ovarian cancer. *Cancer Detect Prev* 6: 263-266, 1983.
- 27 Fukui K, Ostapenko VV, Abe K, Nishide T, Miyano M, Mune M, Yukawa S and Nishide I: Changes in plasma alpha and gamma tocopherol levels before and after long-term local hyperthermia in cancer patients. *Free Rad Res* 40: 893-899, 2006.
- 28 Kabanda A, Jadoul M, Pochet JM, Lauwerys R, Van Ypersele De Strihou C and Bernard A: Determinants of the serum concentrations of low molecular weight proteins in patients on maintenance hemodialysis. *Kidney Int* 45: 1689-1696, 1994.
- 29 Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ and Royston P: Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J* 300: 230-235, 1990.
- 30 Kennedy DD, Tucker KL, Ladas ED, Reingold SR, Blumberg J and Kelly M: Low antioxidant vitamin intakes are associated with increases in adverse effects of chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Nutr* 79: 1029-1036, 2004.
- 31 Ray G and Husain SA: Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. *Clin Biochem* 34: 71-76, 2001.

Received July 5, 2007

Revised October 4, 2007

Accepted October 10, 2007

7.9. Příloha 9

Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate column

I. Citová, L. Havlíková, L. Urbánek, D. Solichová, L. Nováková, P. Solich
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 2007, str. 675-681

Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns

I. Citová · L. Havlíková · L. Urbánek · D. Solichová ·
L. Nováková · P. Solich

Received: 14 January 2007 / Revised: 26 February 2007 / Accepted: 1 March 2007 / Published online: 28 March 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Retinol and α -tocopherol are biologically active compounds often monitored in blood samples because of their evident importance in human metabolism. In this study a novel ultra-performance liquid chromatographic (UPLC) method used for determination of both vitamins in human serum has been compared with conventional HPLC with particulate and monolithic C_{18} columns. In UPLC a sub-two-micron particle-hybrid C_{18} stationary phase was used for separation, in contrast with a five-micron-particle packed column and a monolithic column with a highly porous structure. Methanol, at flow rates of 0.48, 1.5, and 2.5 mL min⁻¹, respectively, was used as mobile phase for isocratic elution of the compounds in the three methods. Detection was performed at 325 nm and 290 nm, the absorption maxima of retinol and α -tocopherol, respectively. Analysis time, sensitivity, mobile-phase consumption, validation data, and cost were critically compared for these different chromatographic systems. Although cost and mobile-phase consumption seem to make UPLC the method of choice, use of the monolithic column resulted in almost the same separation and performance with a slightly shorter analysis time. These methods are alter-

natives and, in routine laboratory practice, more economical means of analysis of large numbers of biological samples than use of a traditional particulate column.

Keywords UPLC · Retinol · α -Tocopherol · Human serum · Monolithic column

Introduction

In recent decades much research has been performed on vitamins A and E, because of their biological activity and their possible use for prevention and treatment of different diseases. Vitamin A includes the compounds retinol, retinal, and retinoic acid. Vitamin E, comprising α , β , γ , and δ -tocopherol and tocotrienol, is an important micronutrient with high antioxidant activity which protects plant and animal tissues against lipid peroxidation [1–3].

To study the biological properties of both vitamins and to search for significant links between their intake and effects on health, determination of these compounds in biological samples by suitable analytical methods is of high importance. Analysis of fat-soluble vitamins may be useful for monitoring their nutritional status, the effectiveness of vitamin therapy [4], or oxidative stress as one of the negative side-effects of anticancer drugs [5].

Many papers have recently been published on the quantification of retinol, tocopherols, and carotenoids in biological liquids, usually human serum and plasma, using, almost exclusively, reversed-phased high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV, fluorimetric, or electrochemical detection, which enable very good detection limits (ng mL⁻¹) [6–15, 18]. Although RP-HPLC on octadecyl-modified silica (ODS) columns seems the method

I. Citová · L. Havlíková · L. Urbánek · L. Nováková · P. Solich
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy,
Charles University in Prague,
Heyrovského 1203,
500 05 Hradec Králové, Czech Republic

L. Urbánek · D. Solichová (✉)
Department of Metabolic Care and Gerontology,
Faculty of Medicine and University Hospital in Hradec Králové,
Charles University in Prague,
Sokolská 581,
500 05 Hradec Králové, Czech Republic
e-mail: solich@lfhk.cuni.cz

of choice, use of normal-phase HPLC for analysis of retinol, β -carotene, and tocopherol in adipose tissue has also been described [16] and an original microemulsion electrokinetic chromatographic method has been used for separation of vitamins A, E, and D [17]. A modern approach to analysis of retinol and α -tocopherol in human serum, application of a monolithic column, leads to time and cost benefits [5].

Clinical interest in retinol and α -tocopherol has increased substantially since study of the cancer chemoprotective properties of these compounds began [1]. In clinical laboratories, time and cost-reducing methods are important tools for processing large numbers of samples. Application of novel approaches in liquid chromatography, for example use of monolithic stationary phases or high-resolution chromatographic systems utilizing sub-two-micron particles in routine practice might therefore be of economic interest, because of their potential to reduce analysis time, improve resolution, increase sensitivity, and reduce mobile-phase consumption. We have previously shown that use of a C_{18} monolithic column enabled reduction of analysis time for both vitamins by a factor of four compared with a particulate C_{18} column [5]. Because of the high porosity of the monolithic silica matrix it is possible to perform analyses with higher flow rates and significantly reduced back pressure compared with conventional particulate columns [19–21].

Ultra-performance liquid chromatography (UPLC), first introduced by the Waters Corporation two years ago, is a novel advance in rapid, sensitive, and high-resolution liquid chromatography. UPLC utilizes special columns with a bridged ethylsiloxane–silica hybrid (BEH) adsorbent, as 1.7- μ m particles, which ensure a wide pH operating range. The apparatus embraces minimized system volumes and greater throughput with detection of more peaks and faster analysis. The particles are also designed to be able to resist high back pressures (up to 100 MPa), in contrast with conventional liquid chromatography (maximum pressures approx. 35–40 MPa). All system components, including high-pressure fluidic modules (binary pump), efficient autosamplers characterized by fast injection cycles, low injection volumes, negligible carryover, temperature control, and high-speed detectors, are designed to achieve this new performance [22, 23].

Use of UPLC for assay of biological fluids has benefits in clinical, toxicological, and forensic analysis. Since 2005 several authors have reported determination of different compounds in urine and rat or human plasma by UPLC, almost exclusively with mass spectrometric detection [24–31]. In most of these papers conventional liquid chromatography has been compared with novel UPLC methods, which result in higher sensitivity (up to 3–10 times), shorter analysis times, and narrow peaks with excellent resolution and a minimization of matrix effects. To protect the system,

treatment of the biological material before UPLC analysis should ensure the sample is very clean. All the work cited reports use of either liquid–liquid (LLE) or solid-phase extraction (SPE). Filtration of samples and all aqueous buffers through 0.2- μ m filters is always recommended.

The objective of this work was to develop a novel method for determination of retinol and α -tocopherol in serum by use of ultra-performance liquid chromatography with UV detection. Another objective was comparison of analysis time, sensitivity, mobile phase consumption, validation data, and demands on instrument equipment and operation for three different chromatographic systems—UPLC and conventional HPLC with either a 5- μ m particulate or a monolithic column. Our prime concern was finding the most suitable analytical method for rapid, simple, sensitive, and reproducible analysis of both vitamins in biological samples of oncological patients being treated with aromatase inhibitors. As far as we are aware simultaneous UPLC analysis of retinol and α -tocopherol in human serum with UV detection has not been described previously.

Experimental

Instrumentation and chromatography

UPLC analysis was performed with a Waters Acquity ultra-performance liquid chromatograph (Waters, Prague, Czech Republic) equipped with a tuneable UV detector (TUV), sample manager module (autosampler), and column compartment/heater, both enabling temperature control. Data were collected and processed by Empower chromatographic software (Waters). An Acquity UPLC BEH C_{18} column (2.1 mm \times 100 mm, 1.7- μ m particles) was used for separation. Methanol (100%) was used as mobile phase; the flow rate was 0.48 mL min⁻¹. UV detection was accomplished at 325 nm for retinol and 295 nm for α -tocopherol; the sampling rate was 20 points per second. Injection was performed by the partial loop with needle-overfill mode. Injection volume was 5 μ L and both compounds were separated within 2 min.

Chemicals and reagents

Retinol and DL- α -tocopherol were obtained from Fluka (Sigma–Aldrich, Prague, Czech Republic). HPLC-grade methanol and *n*-hexane for preparation of standard solutions were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol denatured with 5% methanol for deproteination was obtained from Lachema (Brno, Czech Republic). Distilled methanol of p.a. purity for the HPLC mobile phase was supplied by Penta (Prague, Czech Republic). Helium 4.6 and nitrogen 6.0 were purchased from Linde (Prague, Czech Republic).

LC–MS grade methanol from Riedel–de Hën (Sigma–Aldrich) was used for UPLC analysis. Formic acid p.a. and acetic acid for trace analysis were obtained from Riedel–de Hën and Fluka, respectively. HPLC-grade water was prepared with Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q reverse-osmosis equipment and filtered by use of a Vacc-space 50 vacuum filter (Chromservis, Prague, Czech Republic), using 0.2- μm pore-diameter Nylon membrane filters (Albet, Barcelona, Spain).

Preparation of standards and samples

Stock solutions of retinol and α -tocopherol were prepared for both HPLC and UPLC analysis. Retinol solution (1 mmol L^{-1}) was prepared by dissolution in methanol. Tocopherol was first dissolved in *n*-hexane (1 mmol L^{-1}) then diluted with methanol to furnish 0.5 mmol L^{-1} solution. Retinol and tocopherol standard solutions were stored at $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ and $4 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. For the calibration, working solutions of both standards were diluted with methanol, in volumetric flasks, in the concentration ranges 0.25 – $10.00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for retinol and 0.5 – $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for α -tocopherol. Calibration was performed at six concentrations. The stock and working solutions were stable for 6 months.

Blood samples were drawn from the peripheral vein after overnight fast for 12 h. The samples were then centrifuged (1600 g , 10 min , $16 \text{ }^\circ\text{C}$) and serum was separated. In the liquid–liquid extraction (LLE) procedure $500 \text{ } \mu\text{L}$ serum was

deproteinated by addition of cool ethanol denatured with 5% methanol ($500 \text{ } \mu\text{L}$, 5 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$). *n*-Hexane (2.5 mL) was then added and the mixture was extracted for 5 min by vortex mixing. After centrifugation (1600 g , 10 min , $0 \text{ }^\circ\text{C}$), 2 mL of the clean extract was isolated and evaporated under nitrogen ($60 \text{ }^\circ\text{C}$). The residue was dissolved in $400 \text{ } \mu\text{L}$ methanol and analyzed using external standard calibration.

Validation

For method validation a system suitability test (SST) was performed and validation data were evaluated in accordance with ICH guidelines [32, 33]. For the SST standard solutions were injected ten times and theoretical plate number/height equivalent of theoretical plate (HETP), asymmetry factor, resolution, repeatability of retention times (t_R), and peak area (A) were calculated. Repeatability was expressed as relative standard deviation (%RSD). Method validation was accomplished by analysis of serum samples and entailed determination of precision (repeatability of t_R and A), accuracy (recovery), linearity, and detection and quantification limits (LOD, LOQ). Method precision was evaluated for ten samples prepared individually from one sample of lyophilized human serum at one concentration. Recovery was determined by spiking serum with standard additions of retinol and α -tocopherol. Linearity was measured at six concentrations in the ranges 0.25 – 10.00 and 0.5 – $10.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for retinol and 0.5 – 50.0 and 5.0 – $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for α -tocopherol. Each solution was

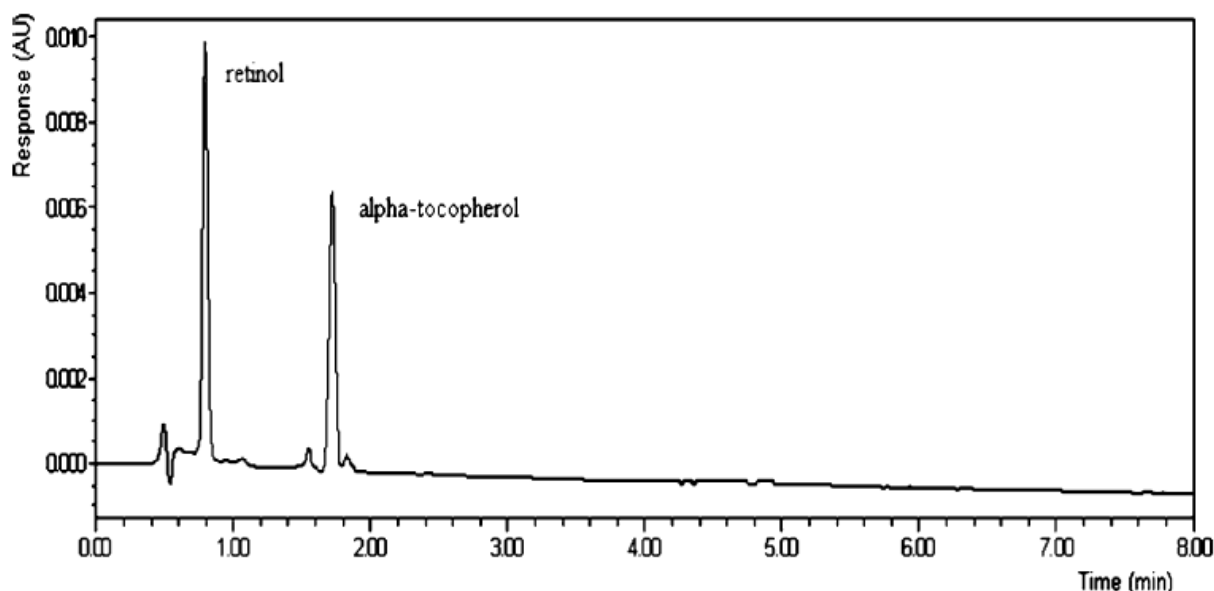


Fig. 1 Example of UV absorption chromatogram from UPLC analysis of retinol and α -tocopherol in patient serum. The concentrations of retinol and α -tocopherol were 0.87 and $11.39 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively.

Detection was performed at 325 nm (retinol) and 290 nm (α -tocopherol). Retention times: retinol, 0.83 min ; α -tocopherol, 1.77 min

injected three times. The limit of detection (LOD) was defined as the compound concentration for which the signal-to-noise ratio was greater than three. The limit of quantification (LOQ) was evaluated as the concentration for which the signal-to-noise ratio was ten.

Results and discussion

Chromatographic conditions

UPLC has been proved to be an effective technique for the analysis of retinol and α -tocopherol in serum samples. A typical chromatogram obtained by UPLC from a patient serum is presented in Fig. 1. Total analysis time was 2.0 min and the retention times of retinol and α -tocopherol were 0.83 min and 1.77 min, respectively. For correct detection, the detector wavelength was switched from 325 nm to 290 nm after 1.2 min. Peak widths were 0.20 min for retinol and 0.24 min for α -tocopherol. Other performance data for UPLC are discussed below in the critical comparison of UPLC analysis with use of particulate and monolithic columns for assay of the vitamins. Use of classical HPLC, with particulate and monolithic columns, for this purpose has been reported elsewhere [5].

The conditions used for each type of chromatography are compared in Table 1. Methanol was always used as mobile phase (MP) and all the stationary phases were based on octadecylsilica; there were, however, significant differences between other properties of the columns used, especially particle size, porosity (monolithic column), internal diameter,

and column length. As would be expected, analysis time was longest for the conventional HPLC particulate column. The monolithic column, because of its porous structure and much lower back-pressure, can operate with higher MP flow rates, resulting in fourfold faster analysis than on the particulate column. Better resolution, speed, and sensitivity were obtained by use of the UPLC column packed with 1.7- μ m particles, but at higher back-pressure, which the UPLC system can resist. Because of the high separation efficiency, small particle size, and narrow column internal diameter, UPLC uses very low mobile-phase flow rates and analysis times are short. In summary, use of monolithic and UPLC columns results in time saving of approximately 7 h for analysis of one-hundred samples. Chromatograms obtained from analysis of human serum samples by use of all three chromatographic systems studied are shown in Figs. 1, 2 and 3.

There is, however, almost no difference between analysis times on the monolithic and UPLC columns. When a 50-mm UPLC column was tested for separation of the standard mixture even shorter retention times were obtained with similar or lower flow rates; when these conditions were used for analysis of serum, however, resolution of target analytes from ballast compounds was poor. These problems might be because of the complexity and variability of the serum matrix, which is, even after extraction, still contaminated with interfering compounds. Mobile phase consumption in UPLC is approximately one fifth that in HPLC with a monolithic column, which is economically important to laboratories processing large numbers of samples. When the different internal diameters of the columns are taken into account (4.6 mm for the monolithic column), this effect

Table 1 Comparison of chromatographic conditions

	UPLC column	Particulate column	Monolithic column
Stationary phase	Bridged ethylsiloxane/silica, hybrid C ₁₈ particles	C ₁₈ reversed-phase	C ₁₈ monolithic reversed-phase
Column dimensions	100 mm×2.1 mm i.d., 1.7 μ m	150 mm×4.6 mm i.d., 5 μ m	100 mm×4.6 mm i.d.
Mobile phase	100% methanol	100% methanol	100% methanol
Mobile phase flow rate (mL min ⁻¹)	0.48	1.50	2.50
Retention time (min)	Retinol α -Tocopherol	0.8 2.0	0.8 5.3
Analysis time (min)	2.0	6.0	1.8
System pressure (psi) ^a	4800–4900	950–1000	470–500
Mobile phase consumption (mL) ^b	96	900	450
Column price (€)	743	394	626
Approximate column lifetime ^c	2200	700	1800
Costs (€) ^{b,d}	36	72	44
Time saving ^{b,e}	6 h 40 min	–	7 h

^a System pressure one first use of the column

^b Calculated for one hundred injections

^c Expressed as the number of analyses without any change of the initial properties.

^d Approximate calculation; comprises mobile phase consumption and column cost; does not include instrument price.

^e Comparison of monolithic and UPLC columns with the particulate column.

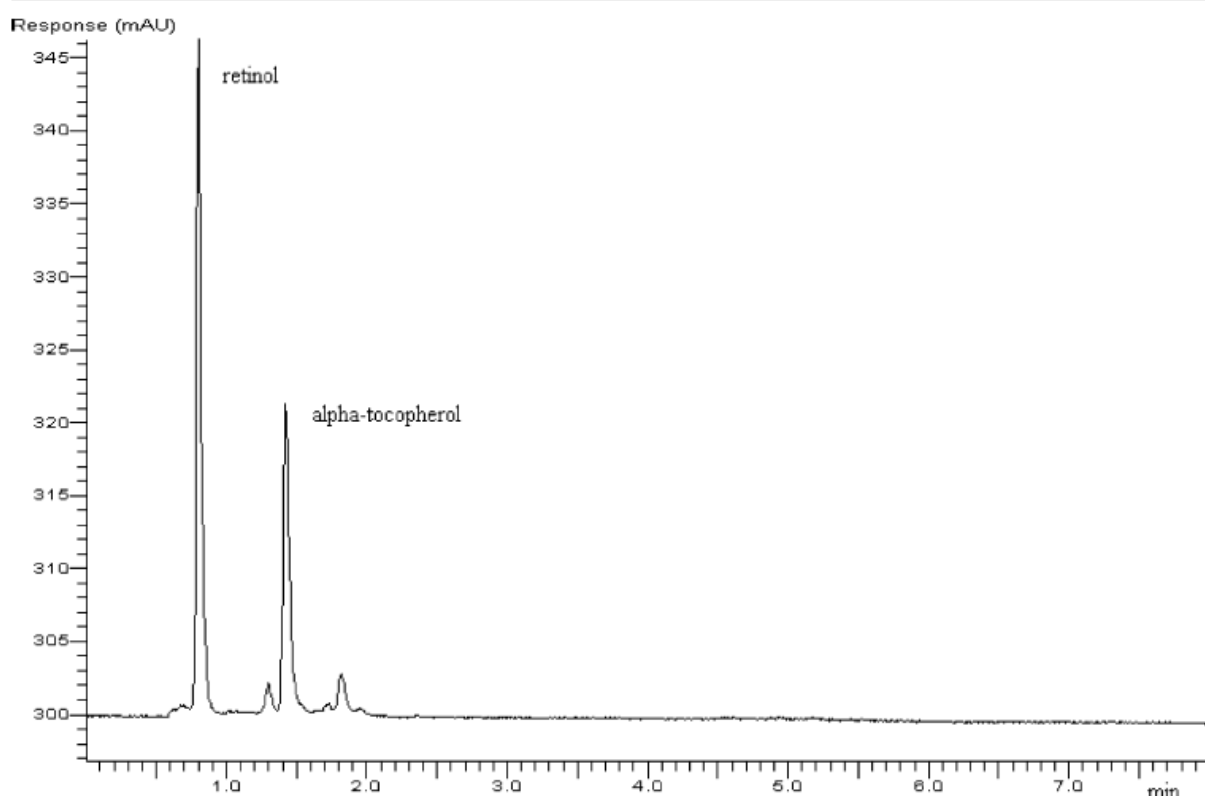


Fig. 2 UV absorption chromatogram from analysis of retinol and α -tocopherol in patient serum using the monolithic column. The concentrations of retinol and α -tocopherol were 1.89 and 18.76 μmol

L^{-1} , respectively. Detection performed at 325 nm (retinol) and 290 nm (α -tocopherol). Retention times: retinol, 0.8 min; α -tocopherol, 1.4 min

on solvent consumption can, nevertheless, be regarded as insignificant.

We calculated the approximate cost of analysis of one hundred samples, taking into consideration mobile-phase consumption and column price. For the latter we took account of both price and column lifetime. Our experience of analysis of many sets of samples is that approximately 700 analyses are possible on the Pecosphere particulate column whereas more than 1800 injections are possible on the Chromolith column without noticeable changes in separation efficiency, retention times, or back pressure. Because of the insufficiency of our own data relating to UPLC column lifetime, we calculated the cost of UPLC on the basis of information in the literature. An Acquity UPLC BEH C_{18} column used for analysis of protein-precipitated rat plasma maintained initial peak capacity and selectivity for over 2200 injections [34]. Although the most economical system seems to be UPLC, the markedly higher price should also be taken into consideration.

Another interesting comparison of monolithic and UPLC columns for analysis of drug metabolites in urine has been published [24]. UPLC was approximately three times as sensitive and enabled detection of more metabolites than

the monolithic column. Although consumption of mobile phase was a factor of four lower in UPLC, retention times were longer than on the monolithic column. It is apparent both from this work and from our results that monolithic stationary phases enable substantial time saving but at the cost of high mobile-phase consumption. Although such time saving is not always possible with UPLC, its benefits include use of much less mobile phase.

Validation

Validation data for analysis of retinol and α -tocopherol by use of the three chromatographic systems are compared in Table 2. Application of internal validation requirements reveals all the data are acceptable; there are, however, slight differences between some of the values.

Area and retention time repeatability for retinol are perfect for analysis by UPLC, not exceeding 0.5% RSD. The excellent injection precision is ensured by the partial loop with needle-overfill injection mode developed by Waters for the Acquity UPLC system. In this mode the needle and the valve are first overfilled with sample while the loop is in-line with the pump. When the loop is switched to off-line, the

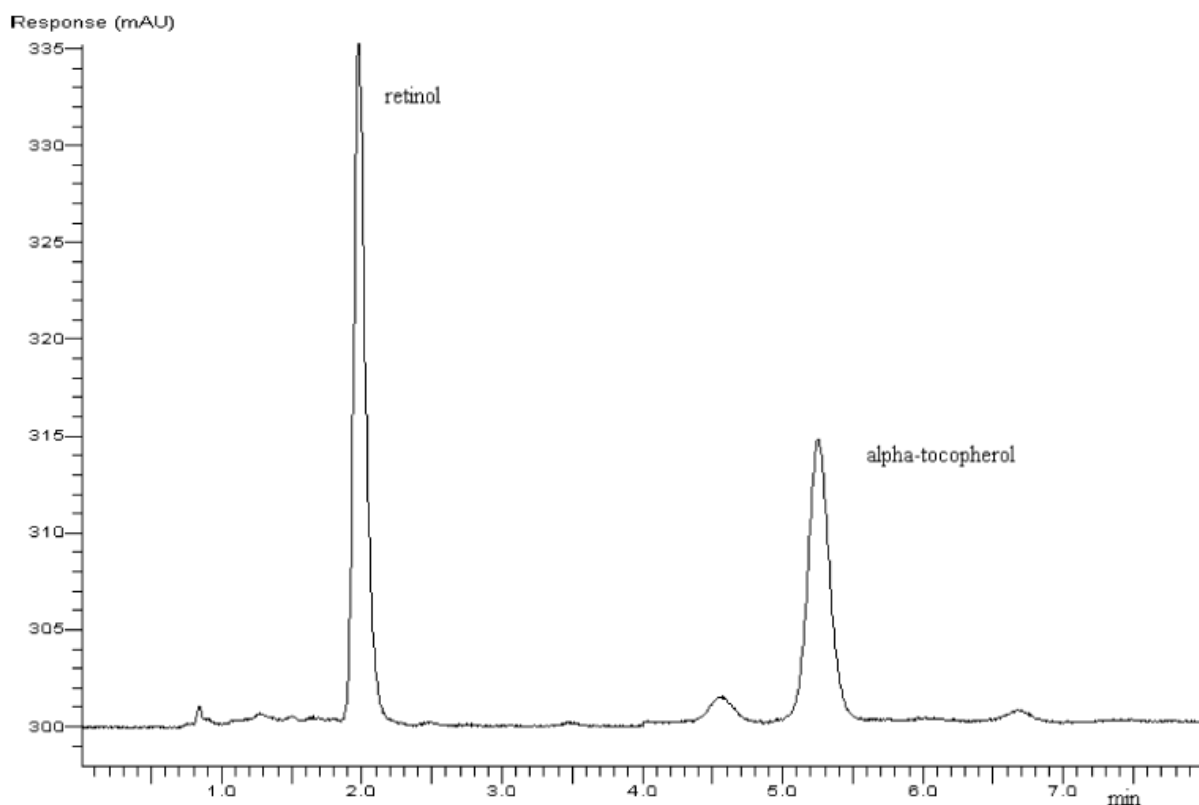


Fig. 3 UV absorption chromatogram from analysis of retinol and α -tocopherol in patient serum using the particulate column. The concentrations of retinol and α -tocopherol were 1.13 and 13.33 μmol

L^{-1} , respectively. Detection was performed at 325 nm (retinol) and 290 nm (α -tocopherol). Retention times: retinol, 2.0 min; α -tocopherol, 5.3 min

syringe fills the loop with the appropriate volume of sample. To complete the injection the valve is switched back to in-line direction. With full-loop injection, this type of sample injection is among the most precise injection techniques. The correlation coefficients show that response is a linear function of concentration in the calibration ranges selected.

Accuracy, determined for spiked human serum, is best for conventional HPLC and UPLC. Although method sensitivity is expected to be higher for UPLC than for the other two techniques, this was not apparent for retinol analysis.

Similar validation data were obtained for assay of α -tocopherol. The detection and quantification limits also

Table 2 Comparison of validation data for retinol and α -tocopherol

	Retinol			α -Tocopherol		
	UPLC	Particulate column	Monolithic column	UPLC	Particulate column	Monolithic column
Area repeatability (RSD%)	0.51	4.51	5.58	0.62	0.91	5.93
Retention time repeatability (RSD%)	0.11	0.08	0.10	0.21	0.29	0.37
Accuracy (RSD%) ^{a,b}	3.78	3.24	5.98	4.61	1.68	2.06
Calibration range ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^c	0.25–10.00	0.50–10.00	0.25–10.00	0.50–50.00	5.00–50.00	0.50–50.00
Correlation coefficient (R^2)	0.9997	0.9992	0.9999	0.9999	0.9996	0.9997
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.019	0.020	0.020	0.05	0.10	0.10
LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.06	0.07	0.07	0.15	0.30	0.30

^a Retinol–serum spiked with 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ retinol; spike volume 5 μL .

^b α -Tocopherol–serum spiked with 5.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ α -tocopherol; spike volume 5 μL .

^c Linearity was measured for six concentration levels.

showed that UPLC was the most sensitive method for analysis of α -tocopherol.

Conclusion

A novel UPLC method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum has been presented as a tool suitable for clinical monitoring of these compounds in serum. The developed and validated UPLC method was compared with two other chromatographic methods—conventional HPLC with a particulate column and HPLC with a monolithic column. Analysis time, sensitivity, mobile phase consumption, validation data, and demands on instrument equipment and operation were compared for all three methods.

UPLC, and HPLC with a monolithic column, are valuable methods for routine monitoring of oncological patients before and during treatment with aromatase inhibitors. The appropriate method should be low cost and highly sensitive, reproducibility should be acceptable, analysis time should be short, and the method should be simple to perform; all these requirements are met by both methods. Surprisingly, in our work UPLC analysis took slightly longer than analysis with the monolithic column; mobile phase consumption was almost a factor of five lower, however. UPLC, and HPLC with a monolithic column, are both ideal for busy laboratories analysing large numbers of samples.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge financial support from the Grant Agency of the Ministry of Education MSM 0021620822, MZO 001 79906, the Grant Agency IGA MZ NR/8048-3, and the Grant Agency of Charles University, Project No. 296/2005.

References

- Arnold T, Nau H, Ruehl R (2000) In: Song WO, Beecher GR, Eitenmiller RR (eds) *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*. Wiley, New York, p 3
- Stocker P, Lesgards JF, Vidal N, Chalier F, Prost M (2003) *BBA Gen Subjects* 1621:1–8
- Piironen VI (2000) In: Song WO, Beecher GR, Eitenmiller RR (eds) *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*. Wiley, New York, p 81
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Blázquez-García S, Pérez-Sacristán B (2006) *Clin Biochem* 39:180–182
- Urbánek L, Solichová D, Melichar B, Dvořák J, Svobodová I, Solich P (2006) *Anal Chim Acta* 573/574:267–272
- Sirimanne SR, Patterson DG Jr, Ma L, Justice JB Jr (1998) *J Chromatogr B* 716:129–137
- Talwar D, Ha TKK, Cooney J, Brownlee ChJ, O'Reilly DS (1998) *Clin Chim Acta* 270:85–100
- Alvarez JC, De Mazancourt P (2001) *J Chromatogr B* 755:129–135
- Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, de la Torre-Boronat MC, López-Sabater MC (2001) *J Chromatogr B* 758:315–322
- Rodríguez-Delgado MA, Díaz-Flores Estévez JF, Díaz-Flores Estévez F, Hernández Calzadilla C, Díaz Romero C (2002) *J Pharm Biomed Anal* 28:991–997
- Taibi G, Nicotra CMA (2002) *J Chromatogr B* 780:261–267
- Ortega H, Coperías JL, Castilla P, Gómez-Coronado D, Lasunción MA (2004) *J Chromatogr B* 803:249–255
- Chatzimichalakis PF, Samanidou VF, Papadoyannis IN (2004) *J Chromatogr B* 805:289–296
- Mata-Granados JM, de Castro MDL, Quesada JM (2004) *J Pharm Biomed Anal* 35:575–582
- Karpinska J, Mikołuc B, Motkowski R, Piotrowska-Jastrzebska J (2006) *J Pharm Biomed Anal* 42:232–236
- Casal S, Macedo B, Oliveira MBPP (2001) *J Chromatogr B* 763:1–8
- Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreno MM, Sánchez-Pérez A, Carabias-Martínez R (2006) *J Chromatogr A* 1125:270–273
- Rupérez FJ, Mach M, Barbas C (2004) *J Chromatogr B* 800:225–230
- Miyabe K, Guiochon G (2004) *J Sep Sci* 27:853–873
- <http://www.chromolith.com>, 20.12.2006
- Tanaka N, Motokawa M, Kobayashi H, Hosoya K, Ikegami T (2003) In: Švec F, Tennikova TB, Deyl Z (eds) *Monolithic materials preparation, properties and applications*, chap 8. Elsevier, Amsterdam, p 173
- <http://www.waters.com>, 6.1.2007
- Nováková L, Matysová L, Solich P (2006) *Talanta* 68:908–918
- Johnson KA, Plumb R (2005) *J Pharm Biomed Anal* 39:805–810
- Yu K, Little D, Plumb R, Smith B (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:544–552
- O'Connor D, Mortishire-Smith R (2006) *Anal Bioanal Chem* 385:114–121
- Apollonio LG, Pianca DJ, Whittall IR, Maher WA, Kyd JM (2006) *J Chromatogr B* 836:111–115
- Sun X, Li X, Cai S, Quin F, Lu X, Li F (2007) *J Chromatogr B* 846:323–328
- Li R, Dong L, Huang J (2005) *Anal Chim Acta* 546:167–173
- Kalovidouris M, Michalea S, Robola N, Koutsopoulou M, Panderi I (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:2939–2946
- Al-Dirbashi OY, Aboul-Encin HY, Jacob M, Al-Qahtani K, Rashed MS (2006) *Anal Bioanal Chem* 385:1439–1443
- International Conference on Harmonization (ICH) (1995) Q2A: text on validation of analytical procedures, vol 60. US FDA Federal Register, p 11260
- International Conference on Harmonization (ICH) (1997) Q2B: validation of analytical procedures: methodology, vol 62. US FDA Federal Register, p 27463
- LC/GC, Separation science redefined, May 2005, p 40

7.10. Příloha 10

Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell counts in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy

Bohuslav Melichar, Lubor Urbánek, Lenka Krčmová, Hana Kalábová, Karolína Melicharová, Eva Malířová, Helena Hornychová, Aleš Ryška, Radomír Hyšpler and Dagmar Solichová

Anticancer Research, 28, 2008, str. 2389-2396

Urinary Neopterin, Hemoglobin and Peripheral Blood Cell Counts in Breast Carcinoma Patients Treated with Dose-dense Chemotherapy

BOHUSLAV MELICHAR^{1,6}, LUBOR URBÁNEK^{2,5}, LENKA KRČMOVÁ^{2,5},
HANA KALÁBOVÁ¹, KAROLINA MELICHAROVÁ², EVA MALÍŘOVÁ³,
HELENA HORNYCHOVÁ⁴, ALEŠ RYŠKA⁴, RADOMÍR HYŠPLER² and DAGMAR SOLICHOVÁ²

Departments of ¹Oncology & Radiotherapy, ²Gerontology & Metabolic Care,
³Nuclear Medicine, and ⁴Pathology, Charles University Medical School & Teaching Hospital;
⁵Department of Analytical Chemistry, Charles University School of Pharmacy, Hradec Králové;
⁶Department of Oncology, Palacký University Medical School, Olomouc, Czech Republic

Abstract. *Background:* Among other actions, chemotherapy may induce an activation of systemic inflammatory and immune response. *Patients and Methods:* Urinary neopterin was evaluated, using high-performance liquid chromatography, before and during dose-dense combination chemotherapy with doxorubicin, cyclophosphamide and sequential paclitaxel (neoadjuvant or adjuvant) in 194 patients with breast carcinoma. Hemoglobin, peripheral blood cell count and, in a subgroup of patients, iron metabolism were also evaluated. *Results:* Urinary neopterin increased significantly during the chemotherapy. The increase in urinary neopterin was accompanied by a gradual decrease of hemoglobin. A marked increase in serum ferritin concentration was observed during the chemotherapy, along with fluctuations of iron concentrations. Among 161 patients treated with primary chemotherapy, the pathological response was evaluable in 150. Pathological complete response was observed in 37 cases (25%). In patients with pathological complete response, significantly lower serum ferritin concentrations were observed. *Conclusion:* Present data demonstrate the presence of systemic immune activation, reflected in increased urinary neopterin concentrations, in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy. Lower ferritin concentrations were predictive of pathological complete response.

Correspondence to: Bohuslav Melichar, MD, Ph.D., Professor and Head, Department of Oncology, Palacký University Medical School & Teaching Hospital, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic. Tel: +420588444288, Fax: +420588442522, e-mail: bohuslav.melichar@fnol.cz

Key Words: Breast carcinoma, chemotherapy, cyclophosphamide, doxorubicin, ferritin, iron, neopterin, paclitaxel.

Breast carcinoma is the most common malignant disease of women in the Western world (1). The progress accomplished in the treatment of breast cancer over the past decades is now reflected in improved survival. There is strong evidence that, in addition to early diagnosis, much of the improvement of the prognosis of women with breast cancer results from the use of systemic therapy, such as hormonal treatment and chemotherapy (2). The results of randomized clinical trials as well as the meta-analysis of these trials indicate that neoadjuvant and adjuvant strategies of chemotherapy administration give equivalent results in terms of overall survival (3-6). Currently, there is no single universally accepted regimen of adjuvant or neoadjuvant chemotherapy. There is a consensus that, unless contraindicated, adjuvant or neoadjuvant chemotherapy regimen in high-risk patients should include an anthracycline, and most currently used regimens of primary systemic chemotherapy comprise anthracycline-based combinations with or without taxanes. Based on earlier randomized clinical trials, the standard regimen used in our center for primary chemotherapy or adjuvant treatment of high-risk patients has combined the dose-dense administration of a combination of doxorubicin and cyclophosphamide (7), as well as sequential weekly paclitaxel administration (8).

Among other actions, chemotherapy may induce activation of systemic inflammatory and immune response (9, 10). The presence of systemic inflammatory or immune response may be assessed by measuring serum or plasma cytokine concentrations. A significant problem associated with this approach is represented by occasional marked fluctuations of systemic cytokine concentrations, even within a short time frame. Moreover, if the presence of systemic immune or inflammatory reaction is to be determined over a longer period, the investigations may be hampered by the need for repeated venepuncture and visits. Measurement of urinary

neopterin may represent an alternative method for the assessment of systemic immune and inflammatory response when repeated measurements over a prolonged period of time are required (11). Intensive chemotherapy is also frequently accompanied by anemia that could also be associated with systemic immune activation (12).

In the present study, we evaluated urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell count in breast carcinoma patients treated with dose-dense combination of doxorubicin, cyclophosphamide and sequential paclitaxel. Iron metabolism was also evaluated in a subgroup of patients.

Patients and Methods

Patients. One hundred and ninety-four patients, 193 females and 1 male, aged (mean±standard deviation) 51±10 (range 27-71) years, with stage II-IV (limited metastatic disease) histologically verified breast carcinoma were evaluated in the present study. The patients were treated with a dose-dense regimen combining doxorubicin and cyclophosphamide (7) with sequential weekly paclitaxel administration (8). The regimen consisted of 4 doses of doxorubicin (60 mg/m²) and cyclophosphamide (600 mg/m²) administered at 14-day intervals followed by 12 doses of paclitaxel (90 mg/m²) administered at weekly intervals. Granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim, 480 µg subcutaneously for 2-5 doses) was administered after each dose of doxorubicin and cyclophosphamide and, in cases of neutropenia, also during the weekly paclitaxel administration. In 161 patients, the chemotherapy was administered as the primary treatment, followed, in most cases, by surgery. Pathological response was evaluated based on criteria described by Chevallier *et al.* (13). In 33 patients, the treatment was administered as adjuvant after primary surgery.

Urine samples were obtained before the start of therapy and then at weekly intervals after the administration of each doxorubicin/cyclophosphamide cycle, before the next cycle, before each administration of paclitaxel and one week after the last paclitaxel administration. Samples of urine and peripheral blood were obtained before the administration of chemotherapy in the morning hours. A sample of peripheral blood for determination of the peripheral blood cell count was obtained at each of these visits as a part of routine clinical care. Peripheral blood cell count was performed immediately and morning urine specimens were collected and stored at -20°C until analysis.

Determination of urinary neopterin. Urinary neopterin was measured by high-performance liquid chromatography. Briefly, after centrifugation (5 min, 1300 ×g) and dilution of 100 µl of urine specimens with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of disodium-EDTA per liter, a 20 µl sample was injected onto an SGX C18 (5 µm, 3.3×150 mm; Tessek, Prague, Czech Republic), or Shodex Asahipak ODP-50 4D column (150×4.6 mm; Showa Denko, Kawasaki, Kanagawa, Japan). Neopterin was determined using a high-performance liquid chromatography system LC1084A (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) with an HP 79850 A integrator (Hewlett-Packard) and MPF-3 detector (Perkin-Elmer, Norwalk, USA), or Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Potassium phosphate buffer (15 mmol/l, pH 6.4) at a flow rate of 0.8 ml/min was used as mobile phase. Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission) and quantified by external standard method. Creatinine was determined by Jaffé reaction after

dilution of samples 1:50 (v/v) on a Hitachi 716 analyzer (Tokyo, Japan) with a commercial kit (Boehringer, Mannheim, Germany) according the manufacturer's instructions, and neopterin concentrations were expressed as a ratio neopterin/creatinine (µmol/mol creatinine) as described elsewhere (14).

Analysis of hemoglobin and peripheral blood cell counts. Peripheral blood cell count was performed as described elsewhere (15). Leukocytes were detected by flow cytometry and platelets by an impedance method using a Sysmex XE-2100 blood analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). A manual differential blood cell count was performed simultaneously. Hemoglobin was measured by a photometric method using sodium lauryl sulfate.

Measurement of serum iron, unsaturated iron-binding capacity and ferritin. Serum iron concentrations and unsaturated iron-binding capacity were determined using commercial kits (MODULAR, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Iron-binding capacity is the sum of the unsaturated iron-binding capacity and serum iron. Serum ferritin concentration was determined using an AxSYM analyzer (Abbott, Chicago, IL, USA). The assays were performed according the manufacturers' instructions.

Statistical analysis. The parameters investigated in different groups of patients were compared by Mann-Whitney *U*-test, before and during the treatment by Wilcoxon signed rank test, and correlations were investigated with Spearman's rank correlation. The decision on statistical significance was based on $p=0.05$. The analyses were performed using NCCS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA).

Results

Urinary neopterin during the dose-dense chemotherapy. Baseline parameters were significantly different in patients treated with primary (neoadjuvant) chemotherapy compared to patients treated after primary surgery in the adjuvant setting. Urinary neopterin was significantly ($p<0.05$) higher and hemoglobin was significantly lower in patients treated in the neoadjuvant setting, while peripheral blood platelet, leukocyte, polymorphonuclear cell, monocyte and lymphocyte counts were similar in both groups.

Urinary neopterin increased significantly during the chemotherapy both in the neoadjuvant (Table I) and the adjuvant (Table II) groups, but the increase was more pronounced in patients treated in the neoadjuvant setting. Compared to baseline (visit 0), urinary neopterin was significantly higher on all subsequent visits in patients treated with neoadjuvant chemotherapy (Figure 1). In contrast, compared to baseline, only the means of visits 1-8 and 9-20 were higher in the adjuvant group, with the difference reaching significance only at visit 13 (Figure 2).

Hemoglobin and peripheral blood cell count during dose-dense chemotherapy. The increase in urinary neopterin was accompanied by a gradual decrease in hemoglobin concentrations in both groups (Tables I and II; Figures 1 and

neopterin may represent an alternative method for the assessment of systemic immune and inflammatory response when repeated measurements over a prolonged period of time are required (11). Intensive chemotherapy is also frequently accompanied by anemia that could also be associated with systemic immune activation (12).

In the present study, we evaluated urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell count in breast carcinoma patients treated with dose-dense combination of doxorubicin, cyclophosphamide and sequential paclitaxel. Iron metabolism was also evaluated in a subgroup of patients.

Patients and Methods

Patients. One hundred and ninety-four patients, 193 females and 1 male, aged (mean±standard deviation) 51±10 (range 27-71) years, with stage II-IV (limited metastatic disease) histologically verified breast carcinoma were evaluated in the present study. The patients were treated with a dose-dense regimen combining doxorubicin and cyclophosphamide (7) with sequential weekly paclitaxel administration (8). The regimen consisted of 4 doses of doxorubicin (60 mg/m²) and cyclophosphamide (600 mg/m²) administered at 14-day intervals followed by 12 doses of paclitaxel (90 mg/m²) administered at weekly intervals. Granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim, 480 µg subcutaneously for 2-5 doses) was administered after each dose of doxorubicin and cyclophosphamide and, in cases of neutropenia, also during the weekly paclitaxel administration. In 161 patients, the chemotherapy was administered as the primary treatment, followed, in most cases, by surgery. Pathological response was evaluated based on criteria described by Chevallier *et al.* (13). In 33 patients, the treatment was administered as adjuvant after primary surgery.

Urine samples were obtained before the start of therapy and then at weekly intervals after the administration of each doxorubicin/cyclophosphamide cycle, before the next cycle, before each administration of paclitaxel and one week after the last paclitaxel administration. Samples of urine and peripheral blood were obtained before the administration of chemotherapy in the morning hours. A sample of peripheral blood for determination of the peripheral blood cell count was obtained at each of these visits as a part of routine clinical care. Peripheral blood cell count was performed immediately and morning urine specimens were collected and stored at -20°C until analysis.

Determination of urinary neopterin. Urinary neopterin was measured by high-performance liquid chromatography. Briefly, after centrifugation (5 min, 1300 ×g) and dilution of 100 µl of urine specimens with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of disodium-EDTA per liter, a 20 µl sample was injected onto an SGX C18 (5 µm, 3.3×150 mm; Tessek, Prague, Czech Republic), or Shodex Asahipak ODP-50 4D column (150×4.6 mm; Showa Denko, Kawasaki, Kanagawa, Japan). Neopterin was determined using a high-performance liquid chromatography system LC1084A (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) with an HP 79850 A integrator (Hewlett-Packard) and MPF-3 detector (Perkin-Elmer, Norwalk, USA), or Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Potassium phosphate buffer (15 mmol/l, pH 6.4) at a flow rate of 0.8 ml/min was used as mobile phase. Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission) and quantified by external standard method. Creatinine was determined by Jaffé reaction after

dilution of samples 1:50 (v/v) on a Hitachi 716 analyzer (Tokyo, Japan) with a commercial kit (Boehringer, Mannheim, Germany) according the manufacturer's instructions, and neopterin concentrations were expressed as a ratio neopterin/creatinine (µmol/mol creatinine) as described elsewhere (14).

Analysis of hemoglobin and peripheral blood cell counts. Peripheral blood cell count was performed as described elsewhere (15). Leukocytes were detected by flow cytometry and platelets by an impedance method using a Sysmex XE-2100 blood analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). A manual differential blood cell count was performed simultaneously. Hemoglobin was measured by a photometric method using sodium lauryl sulfate.

Measurement of serum iron, unsaturated iron-binding capacity and ferritin. Serum iron concentrations and unsaturated iron-binding capacity were determined using commercial kits (MODULAR, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Iron-binding capacity is the sum of the unsaturated iron-binding capacity and serum iron. Serum ferritin concentration was determined using an AxSYM analyzer (Abbott, Chicago, IL, USA). The assays were performed according the manufacturers' instructions.

Statistical analysis. The parameters investigated in different groups of patients were compared by Mann-Whitney *U*-test, before and during the treatment by Wilcoxon signed rank test, and correlations were investigated with Spearman's rank correlation. The decision on statistical significance was based on $p=0.05$. The analyses were performed using NCSS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA).

Results

Urinary neopterin during the dose-dense chemotherapy. Baseline parameters were significantly different in patients treated with primary (neoadjuvant) chemotherapy compared to patients treated after primary surgery in the adjuvant setting. Urinary neopterin was significantly ($p<0.05$) higher and hemoglobin was significantly lower in patients treated in the neoadjuvant setting, while peripheral blood platelet, leukocyte, polymorphonuclear cell, monocyte and lymphocyte counts were similar in both groups.

Urinary neopterin increased significantly during the chemotherapy both in the neoadjuvant (Table I) and the adjuvant (Table II) groups, but the increase was more pronounced in patients treated in the neoadjuvant setting. Compared to baseline (visit 0), urinary neopterin was significantly higher on all subsequent visits in patients treated with neoadjuvant chemotherapy (Figure 1). In contrast, compared to baseline, only the means of visits 1-8 and 9-20 were higher in the adjuvant group, with the difference reaching significance only at visit 13 (Figure 2).

Hemoglobin and peripheral blood cell count during dose-dense chemotherapy. The increase in urinary neopterin was accompanied by a gradual decrease in hemoglobin concentrations in both groups (Tables I and II; Figures 1 and

Table I. Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell count in patients treated with neoadjuvant chemotherapy (n=161).

Parameter	Visit 0 (Baseline)	Visits 1-8	Visits 9-20
Neopterin (µmol/mol creatinine)	157±8 (148; 23-1,116)	193±6 (186; 53-484) ¹	213±7 (199; 79-516) ^{1,5}
Hemoglobin (g/l)	141±1 (142; 96-170)	117±1 (118; 83-143) ¹	113±1 (112; 86-137) ^{1,4}
Platelets (10 ⁹ /l)	266±5 (260; 106-619)	205±4 (204; 93-360) ¹	262±4 (260; 101-418) ^{3,4}
Leukocytes (10 ⁹ /l)	6.7±0.1 (6.4; 3.0-12.3)	5.6±0.1 (5.3; 3.0-12.7) ¹	5.1±0.1 (4.7; 3.2-10.1) ^{1,6}
Neutrophils (per µl)	4,463±122 (4411; 1,115-9,314)	3,666±112 (3,320; 1,400-10,034) ¹	3,325±83 (3,070; 1,525-6,898) ^{1,7}
Monocytes (per µl)	398±17 (352; 0-1,146)	419±14 (397; 125-1,171) ³	336±10 (319; 123-828) ^{2,4}
Lymphocytes (per µl)	1,615±50 (1,476; 536-3,854)	1,287±30 (1,245; 511-2,746) ¹	1,265±30 (1,223; 583-2,575) ^{1,8}

The Table indicates pre-treatment (visit 0) and average values of respective parameters during the dose-dense doxorubicin/cyclophosphamide (mean, visits 1-8) as well as weekly paclitaxel (mean, visits 9-20) chemotherapy. Mean (±standard error of the mean), median and range are shown. ¹p<0.00001; ²p<0.001; and ³not significant compared to baseline (visit 0); ⁴p<0.00001; ⁵p<0.0001; ⁶p<0.001; ⁷p<0.05 and ⁸not significant compared to the mean of visits 1-8.

Table II. Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell count in patients treated with adjuvant chemotherapy (n=33).

Parameter	Visit 0	Visits 1-8	Visits 9-20
Neopterin (µmol/mol creatinine)	328±98 (163; 44-2,791)	218±12 (207; 120-373) ⁴	228±16 (202; 88-507) ^{4,7}
Hemoglobin (g/l)	135±2 (137; 100-158)	114±2 (114; 96-152) ¹	114±2 (114; 85-134) ^{1,7}
Platelets (10 ⁹ /l)	271±12 (260; 176-474)	198±9 (188; 92-314) ¹	265±11 (256; 154-403) ^{5,6}
Leukocytes (10 ⁹ /l)	6.1±0.3 (5.7; 3.1-12.2)	5.4±0.3 (5.2; 3.1-10.8) ⁴	5.1±0.2 (4.8; 3.3-10.4) ^{3,7}
Neutrophils (per µl)	4,040±280 (3,494; 1,915-7,802)	3,559±237 (3,246; 1,768-8,716) ⁵	3,440±212 (3,214; 1,985-8,102) ^{5,7}
Monocytes (per µl)	371±28 (365; 63-910)	409±25 (400; 154-848) ⁵	344±23 (346; 105-814) ^{5,7}
Lymphocytes (per µl)	1,555±124 (1,368; 514-3,779)	1,194±56 (1,247; 396-1,830) ³	1,159±72 (1,043; 411-2,028) ^{2,7}

The Table indicates pre-treatment (visit 0) and average values of respective parameters during the dose-dense doxorubicin/cyclophosphamide (mean visits 1-8) as well as weekly paclitaxel (mean visits 9-20) chemotherapy. Mean (±standard error of the mean), median and range are shown. ¹p<0.00001; ²p<0.001; ³p<0.01; ⁴p<0.05 and ⁵not significant compared to baseline (visit 0); ⁶p<0.00001; and ⁷not significant compared to the mean of visits 1-8.

of each cycle of doxorubicin/cyclophosphamide combination was followed by a significant rise in serum iron concentration that decreased to pretreatment levels at the visit between the cycles. Serum iron concentrations decreased significantly after the administration of the last cycle of doxorubicin and cyclophosphamide and during the paclitaxel administration (starting at visit 8).

The iron-binding capacity decreased significantly during the administration of dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide, but increased slightly during the paclitaxel administration, and a significant decrease of iron-binding capacity was evident from visit 1 through visit 18 (Figure 5).

Relation of the investigated parameters to the therapeutic response. Among 161 patients treated with primary chemotherapy, the pathological response was evaluable in 150 cases. Pathological complete response was observed in 37 cases (25%). Patients who subsequently had pathological complete response had significantly lower baseline hemoglobin concentrations (mean±standard error of the

mean: 139±11 vs. 142±10 g/l; p=0.02) and lower urinary neopterin at the end of therapy (visit 20; 172±12 vs. 232±12 µmol/mol creatinine; p=0.02), but no other consistent differences were observed between the patients with and those without pathological complete response in urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell counts during therapy.

Among 24 patients treated with neoadjuvant chemotherapy in whom iron metabolism was investigated, pathological complete response was observed in 12. In patients with pathological complete response, a significantly lower serum ferritin (Figure 6) and significantly higher iron-binding capacity were found (Figure 7).

Discussion

The present data demonstrate the presence of systemic immune and inflammatory response, reflected in an increase of urinary neopterin during dose-dense neoadjuvant chemotherapy. A rise in neopterin concentrations was less pronounced in patients treated with the same dose-dense

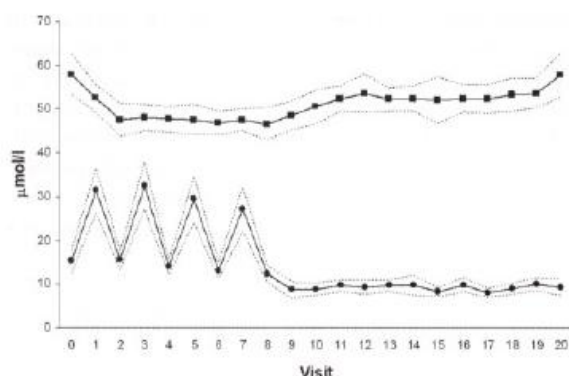


Figure 5. Serum iron and iron-binding capacity during the course of chemotherapy. Serum iron (circles) and iron-binding capacity (squares) were determined as described in Patients and Methods. Means with 95% confidence limits indicated by dashed lines are shown. Compared to baseline (visit 0), serum iron was significantly ($p<0.0002$) higher at visits 1, 3, 5 and 7, and lower ($p<0.05$) at visits 8 through 20. The iron-binding capacity was significantly ($p<0.05$) lower at visits 1 through 18.

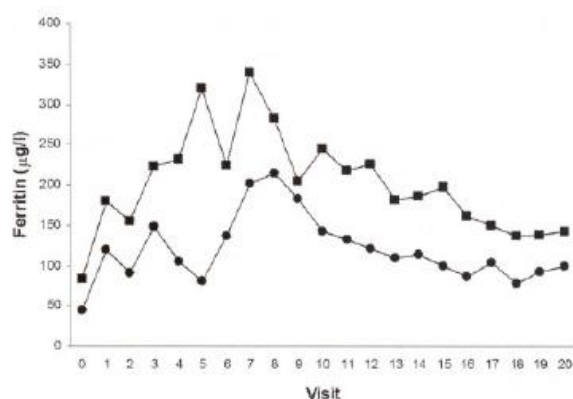


Figure 6. Serum ferritin in patients with or without pathological complete response. Serum was determined as described in Patients and Methods. Means of serum ferritin concentrations in patients with (circles) and without (squares) pathological complete response are shown. Serum ferritin was significantly ($p<0.05$) lower in patients with pathological complete response at visits 1 through 5, 10, 12 and 15.

regimen in the adjuvant setting because of significantly higher initial neopterin concentrations. An increase in serum or urinary neopterin concentrations in cancer patients has been amply documented (11, 16), but neopterin concentrations are increased only in a minority of patients with breast carcinoma (17). The observation of increased urinary neopterin after neoadjuvant chemotherapy is in agreement with the reports of increased serum concentrations of pro-inflammatory cytokines after the administration of taxanes (also in breast carcinoma in the neoadjuvant setting) (9, 10). Increased serum levels of pro-inflammatory cytokines have been associated with flu-like symptoms and fatigue accompanying paclitaxel administration (9). Higher serum concentrations of pro-inflammatory cytokines and neopterin have also been reported in breast cancer survivors suffering from fatigue (18). Systemic inflammatory and immune activation that accompanies combination chemotherapy of breast carcinoma may be responsible for some of the side-effects, notably flu-like syndrome and fatigue. In a previous study, an increase in urinary neopterin was associated with changes of other indicators of immune activation, *e.g.* CD3⁺CD69⁺ lymphocytes (19). Immunomodulatory effects of paclitaxel that included stimulation of the production of cytokines, *e.g.* interleukin-1, tumor necrosis factor- α or interleukin-12, have been described in experimental studies (20-22). These immunomodulatory effects could be responsible for the marked increase in neopterin observed during the weekly paclitaxel therapy in patients treated with neoadjuvant chemotherapy.

Neopterin is a pteridine produced from guanosine triphosphate (GTP) by activated macrophages in a reaction catalyzed by the enzyme GTP cyclohydrolase I. The activity

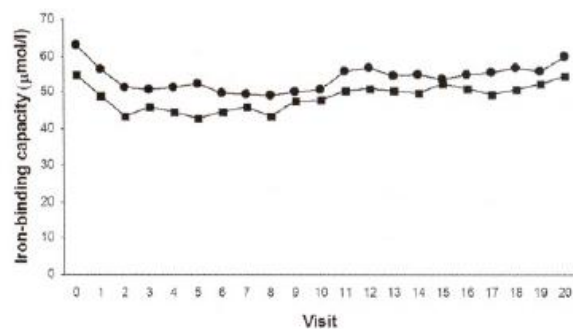


Figure 7. Serum iron-binding capacity in patients with or without pathological complete response. Serum iron-binding capacity was determined as described in Patients and Methods. Shown are the means of serum iron-binding capacity in patients with (circles) and without (squares) pathological complete response. Serum iron-binding capacity was significantly ($p<0.05$) higher in patients with pathological complete response at visits 1, 2, 4, 5, and 6.

of GTP cyclohydrolase I is induced by interferon- γ (IFN- γ) produced by T-lymphocytes and natural killer cells, and serum concentrations of this cytokine are reflective of systemic immune response. However, the production of IFN- γ is enhanced by pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 and interleukin-6. The pro-inflammatory cytokines are known to enhance or, to a lesser degree, induce neopterin production. Thus, systemic concentrations of neopterin reflect both systemic immune and inflammatory response (23). Neopterin may be measured not only in serum, but also in urine, and both serum and urinary neopterin concentrations have been validated as indicators of systemic immune and inflammatory response in disorders

ranging from cancer to viral infections, transplant rejection, and atherosclerosis. Urinary neopterin concentrations are relatively stable in cancer patients in the absence of complications (14). In an earlier study, increase in neopterin concentrations preceded complications, while a decrease in urinary neopterin was associated with tumor control (14).

The literature on neopterin as a marker of systemic immune activation in patients with breast cancer is limited. Urinary neopterin was reported to be elevated in less than 20% of patients with breast carcinoma (11, 17). Increased neopterin was associated with higher grade or advanced disease (11, 17), and neopterin was a significant prognostic factor in both univariate and multivariate analysis (17). In another study, slightly elevated serum neopterin concentrations were reported in breast cancer survivors with chronic fatigue (24). An increase of neopterin production has been documented after systemic administration of different cytokines (11) as well as in breast cancer patients treated with the combination of paclitaxel and doxorubicin (12). Present data extend the observation of increased neopterin concentrations associated with chemotherapy to another regimen. The administration of filgrastim may also have contributed to the observed increase of urinary neopterin concentrations.

Chemotherapy-induced anemia is a well documented side-effect in patients with breast cancer (25). The negative correlation between neopterin and hemoglobin may be explained by simultaneous action of cytokines, *e.g.* IFN- γ , on both erythropoiesis and neopterin production (26-28). In addition, pteridines, *e.g.* tetrahydrobiopterin, may affect erythropoiesis directly. 7,8-Dihydroneopterin reduces ferric to ferrous iron, facilitating the transfer of iron to depository forms (29). Along with some other cytotoxic drugs, paclitaxel has been shown to activate macrophages (22, 30). Systemic immune and inflammatory activation causes a decline in serum iron and iron-binding capacity, and a simultaneous increase in depository iron (ferritin), leading to a decrease in hemoglobin concentrations. The negative correlation between the neopterin and hemoglobin concentrations observed in the present study indicates that the systemic immune activation reflected in increased neopterin production may also be involved in the pathogenesis of chemotherapy-induced anemia. The administration of the combination of doxorubicin and cyclophosphamide was accompanied by a significant increase in serum iron concentrations 7 days after the administration of therapy, which returned to pretreatment levels before the next cycle. The mechanism behind the increase in serum iron concentration that has been observed after the administration of chemotherapy is poorly understood (31). The marked increase in serum ferritin levels may be explained as secondary to this transient increase of serum iron. The changes of serum iron concentrations, stimulation of ferritin synthesis and reduction of iron-binding

capacity were accompanied by a gradual decrease in hemoglobin concentrations. In an experimental study, doxorubicin was shown to induce iron accumulation in ferritin (32). Abnormalities in serum iron or ferritin concentrations have been demonstrated in patients with breast carcinoma before therapy (33, 34), but present data demonstrate that further marked alterations of iron metabolism occur during dose-dense chemotherapy and accompany chemotherapy-induced anemia.

The term "pathological complete response" denotes complete disappearance of tumor cells in the operative specimen obtained at definitive surgery after neoadjuvant chemotherapy (13). Although instances of pathological complete response are relatively rare (for most regimens, pathological complete response is achieved in only 10-20% of patients), pathological complete response is important as it represents the most significant prognostic parameter in women undergoing primary chemotherapy (35-38). Interestingly, pathological complete response in the present study was associated with lower ferritin concentrations during the therapy. This clinical observation is in line with experimental data demonstrating reduced sensitivity of tumor cells to oxidative damage associated with increased ferritin content (39). In an earlier study, higher ferritin concentrations were also found to be predictive of poor response to chemotherapy in patients with advanced breast carcinoma (34).

In conclusion, the present data demonstrate the presence of systemic immune activation, reflected in increased urinary neopterin concentrations, in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy, especially in those treated with neoadjuvant chemotherapy. The increase in neopterin levels was associated with a decrease of hemoglobin concentrations and increased serum ferritin. Lower ferritin concentrations were predictive of pathological complete response.

Acknowledgements

Supported by the grants of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR 8392-3 and NR9096-4.

References

- 1 Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R and Viale G: Breast cancer. *Lancet* 365: 1727-1741, 2005.
- 2 Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365: 1687-1717, 2005.
- 3 Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB, Fisher ER, Wickerham DL, Wolmark N, DeCillis A, Hoehn JL, Lees AW and Dimitrov NV: Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol* 15: 2483-2493, 1997.

- 4 Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV and Bear HD: Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 16: 2672-2685, 1998.
- 5 van der Hage JA, van de Velde CJH, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C and Duchateau L: Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol* 19: 4224-4237, 2001.
- 6 Mauri D, Pavlidis N and Ioannidis JPA: Neoadjuvant *versus* adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 97: 188-194, 2005.
- 7 Citron ML, Berry DA, Cirincione C, Hudis C, Winer EP, Gradishar WJ, Davidson NE, Martino S, Livingston R, Ingle JN, Perez EA, Carpenter J, Hurd D, Holland JF, Smith BL, Sartor CI, Leung EH, Abrams J, Schilsky RL, Muss HB and Norton L: Randomized trial, of dose-dense *versus* conventionally scheduled and sequential *versus* concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup trial C9741/Cancer and Leukemia Group B trial 9741. *J Clin Oncol* 21: 1431-1439, 2003.
- 8 Green MC, Buzdar AU, Smith T, Ibrahim NK, Valero V, Rosales MF, Cristofanilli M, Booser DJ, Puztai L, Rivera E, Theriault RL, Carter C, Frye D, Hunt KK, Symmans WF, Strom EA, Sahin AA, Sikov W and Hortobagyi GN: Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol* 23: 5983-5992, 2005.
- 9 Puztai L, Mendoza TR, Reuben JM, Martinez MM, Willey JS, Lara J, Syed A, Fritsche HA, Bruera E, Booser D, Valero V, Arun B, Ibrahim N, Edgardo R, Royce M, Cleeland CS and Hortobagyi GN: Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. *Cytokine* 25: 94-102, 2004.
- 10 Tsavaris N, Kosmas C, Vadiaka M, Kanelopoulos P and Boulamatsis D: Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer* 87: 21-27, 2002.
- 11 Melichar B, Solichová D and Freedman RS: Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 16: 240-252, 2006.
- 12 Melichar B, Solichová D, Melicharova K, Cermanova M, Urmínska H and Ryska A: Systemic immune activation, anemia and thrombocytosis in breast cancer patients treated by doxorubicin and paclitaxel. *Pteridines* 17: 107-114, 2006.
- 13 Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P and Hurloup P: Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in high histologic response rate. *Am J Clin Oncol* 16: 223-228, 1993.
- 14 Melichar B, Kalabova H, Urbanek L, Malirova E and Solichová D: Serial urinary neopterin measurements reflect the disease course in patients with epithelial ovarian carcinoma treated with paclitaxel/platinum. *Pteridines* 18: 1-7, 2007.
- 15 Solichová D, Melichar B, Blaha V, Klejna M, Vavrova J, Palicka V and Zadák Z: Biochemical profile and survival in nonagenarians. *Clin Biochem* 34: 563-569, 2001.
- 16 Reibnegger G, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Werner ER, Werner-Felmayer G and Wachter H: Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease. *Cancer Detect Prev* 15: 483-490, 1991.
- 17 Murr C, Berant A, Widschwendter M, Heim K, Schrocksnadel H and Fuchs D: Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer. *Clin Chem* 45: 1998-2004, 1999.
- 18 Bower JE, Ganz PA, Aziz N, Fahey JL and Cole SW: Fatigue and proinflammatory cytokine activity in breast cancer survivors. *Psychosom Med* 64: 604-611, 2002.
- 19 Melichar B, Tuskova M, Hornychova H, Vokurkova D, Solichova D, Vesely P, Mergancova J, Urmínska H and Ryska A: Systemic immune activation and peripheral blood lymphocytes during primary chemotherapy with the combination of doxorubicin and paclitaxel. *Pteridines* 18: 25-34, 2007.
- 20 Bogdan C and Ding A: Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in macrophages. *J Leukocyte Biol* 52: 119-121, 1992.
- 21 Allen JN, Moore SA and Wewers MD: Taxol enhances but does not induce interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha production. *J Lab Clin Med* 122: 374-381, 1993.
- 22 Mullins DW, Burger CJ and Elgert KD: Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol* 162: 6811-6818, 1999.
- 23 Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G and Werner ER: Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 27: 81-141, 1989.
- 24 Bower JE, Ganz PA, Aziz N, Fahey JL and Cole SW: T-cell homeostasis in breast cancer survivors with persistent fatigue. *J Natl Cancer Inst* 95: 1165-1168, 2003.
- 25 Groopman JE and Itri LM: Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst* 91: 1616-1634, 1999.
- 26 Denz H, Fuchs D, Huber H, Nachbaur D, Reibnegger G, Thaler J, Werner ER and Wachter H: Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders. *Eur J Haematol* 44: 186-189, 1990.
- 27 Wachter H, Artner-Dworzak E, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G and Dierich MP: Association between neopterin and iron metabolism in cancer patients. *Tumor Diagn Ther* 11: 229-232, 1990.
- 28 Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Dierich M and Wachter H: Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. *Eur J Haematol* 46: 65-70, 1991.
- 29 Hausen A, Fuchs D, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G and Wachter H: Reduction of ferric iron by 7, 8-dihydroneopterin. *Pteridines* 2: 83-85, 1990.
- 30 Muenchen HJ and Aggarwal SK: Activation of murine peritoneal macrophages after cisplatin and taxol combination. *Anticancer Drugs* 8: 784-789, 1997.
- 31 Miranda CJ, Makui H, Soares RJ, Bilodeau M, Mui J, Vali H, Bertrand R, Andrews NC and Santos MM: Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in iron metabolism induced by doxorubicin. *Blood* 102: 2574-2580, 2003.

- 32 Kwok JC and Richardson DR: Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol Pharmacol* 63: 849-861, 2003.
- 33 Ulbrich EJ, Lebrecht A, Schneider I, Ludwig E, Koelbl H and Hefler LA: Serum parameters of iron metabolism in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 23: 5107-5110, 2003.
- 34 Williams MR, Turkes A, Pearson D, Griffiths K and Blamey RW: Serum ferritin as a marker of therapeutic response in stage III and IV breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 16: 22-27, 1990.
- 35 Chollet P, Amat S, Cure H, de Latour M, Le Bouedec G, Mouret-Reynier MA, Ferriere JP, Achard JL, Dauplat J and Penault-Llorca F: Prognostic significance of a complete pathological response after induction chemotherapy in operable breast cancer. *Br J Cancer* 86: 1041-1046, 2002.
- 36 Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Mamounas EP, Fischer B, Brown AM, Robidoux A, Margolese R, Kahlenberg MS, Paik S, Soran A, Wickerham DL and Wolmark N: Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-27. *J Clin Oncol* 24: 2019-2027, 2006.
- 37 Machiavelli MR, Romero AO, Perez JE, Lacava JA, Dominguez ME, Rodriguez R, Barbieri MR, Acuna LAR, Acuna JMR, Langhi MJ, Amato S, Ortiz EH, Vllejo CT and Leone BA: Prognostic significance of pathological response of primary tumor and metastatic axillary lymph nodes after neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast carcinoma. *Cancer J Sci Am* 4: 125-131, 1998.
- 38 Thomas E, Holmes FA, Smith TL, Buzdar AU, Frye DK, Fraschini G, Singletary SE, Theriault RL, McNeese MD, Ames F, Walters R and Hortobagyi GN: The use of alternate, non-cross-resistant adjuvant chemotherapy on the basis of pathologic response to a neoadjuvant doxorubicin-based regimen in women with operable breast cancer: long-term results from a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 22: 2294-2302, 2004.
- 39 Cermak J, Balla J, Jacob HS, Balla G, Enright H, Nath K and Vercellotti GM: Tumor cell heme uptake induces ferritin synthesis resulting in altered oxidant sensitivity: possible role in chemotherapy efficacy. *Cancer Res* 53: 5308-5313, 1993.

Received March 4, 2008

Revised May 22, 2008

Accepted May 26, 2008

7.11. Příloha 11

Gastrointestinal permeability - a parameter of possible prognostic importance in metastatic colorectal carcinoma

Bohuslav Melichar, Radomír Hyspler, Hana Kalabova, Lubor Urbanek, Lenka

Krcmova, Dagmar Solichova

Pteridines, 19, 2008, str. 19-22

Pteridines

Vol. 19, 2008, pp. 19 - 22

Gastrointestinal Permeability - a Parameter of Possible Prognostic Importance in Metastatic Colorectal Carcinoma

Bohuslav Melichar^{1,4}, Radomír Hyspler², Hana Kalabova¹, Lubor Urbanek^{2,3}, Lenka Krcmova^{2,3}, Dagmar Solichova²

¹Department of Oncology & Radiotherapy, Charles University Medical School & Teaching Hospital, Sokolska 581, Building 23, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic, ²Department of Gerontology & Metabolic Care, Charles University Medical School & Teaching Hospital, Sokolská 581, Building 22, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic, ³Department of Analytical Chemistry, Charles University School of Pharmacy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic, ⁴Department of Oncology, Palacky University Medical School & Teaching Hospital, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic

Abstract

Recently, we have observed in patients with ovarian carcinoma an association between intestinal permeability and prognosis and a correlation between urinary neopterin and parameters of intestinal permeability. In order to examine prognostic significance of intestinal permeability in a different group of patients, we have retrospectively analyzed pretreatment parameters of gastrointestinal permeability and urinary neopterin in 21 consecutive patients with metastatic colorectal carcinoma treated with the combination of cetuximab, irinotecan, leucovorin and 5-fluorouracil. Neopterin was determined by high-performance liquid chromatography, and gastrointestinal permeability was assessed by measuring, using capillary gas chromatography, urinary sucrose, lactulose, xylose, mannitol and sucralose after oral challenge. Pretreatment sucrose/mannitol ratio equal or above 0.04 (median survival 10.6 vs. 18.4 months; $p = 0.03$), sucrose/xylose equal or above 0.02 (12.1 vs. 19 months; $p = 0.04$) and urinary neopterin equal or above 220 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (10.6 vs. 18.4 months; $p = 0.02$) were indicative of poor survival. A significant correlation was observed between urinary neopterin and sucrose/xylose ratio ($r_s = 0.57$, $p = 0.007$), while correlation between urinary neopterin and sucrose/mannitol ratio ($r_s = 0.38$, $p = 0.096$) was of borderline significance. In conclusion, present data demonstrate that gastrointestinal permeability is associated with systemic immune activation and may be of prognostic significance in patients with metastatic colorectal carcinoma.

Key words: colorectal carcinoma, intestinal permeability, neopterin

Introduction

The term intestinal permeability is used to describe the barrier function of bowel mucosa, both in a metabolic and immunologic sense. Derangements of intestinal permeability have been described in patients with cancer, and further changes are known to occur during anticancer therapy (1). Recently, we have observed an association between intestinal permeability and prognosis in patients with ovarian carcinoma (2). The prognostic significance of intestinal permeability could be explained by an association between changes in intestinal permeability and systemic immune or inflamma-

tory response. In fact, we have recently reported a correlation between urinary neopterin and parameters of intestinal permeability in patients with ovarian carcinoma (3). The prognostic significance of increased urinary neopterin has been previously characterized both in gynecological tumors (4) as well as in metastatic colorectal carcinoma (5).

In order to examine prognostic significance of intestinal permeability in a different group of patients, we have retrospectively analyzed pretreatment parameters of intestinal permeability and urinary neopterin in 21 consecutive patients with metastatic colorectal carcinoma treated with the combination of

Correspondence to: Prof. MUDr. Bohuslav Melichar Ph.D., Onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic.,
Tel +420-583444295; fax +420-588442522; e-mail: bohuslav.melichar@fnol.cz

cetuximab, irinotecan, leucovorin, and 5-fluorouracil.

Patients and Methods

Twenty-one consecutive patients with metastatic colorectal carcinoma, 14 males and 7 females, aged 62 ± 11 (range 36 - 75) years, were included in the study. The patients were treated with the combination of cetuximab (loading dose 400 mg/m², subsequently 250 mg/m² weekly) followed by irinotecan (180 mg/m²), leucovorin (200 mg/m²), and 5-fluorouracil (400 mg/m² bolus and 1200 mg/m² for 46 hours) every 2 weeks (6), including one patient who received a modification of this regimen. All patients had been previously treated with oxaliplatin, and all but one patient had been pre-treated with an irinotecan-containing regimen. Before therapy, testing for gastrointestinal permeability and evaluation of urinary neopterin was performed in all patients. The protocol was approved by institutional ethical committee, and the patients signed informed consent.

To assess gastrointestinal permeability, a pretest urine sample was collected after an overnight fast to detect any endogenous mannitol. The patients then ingested 100 ml of the test solution containing 2 g of mannitol, 2 g of xylose, 10 g of lactulose, and 25 g of sucrose in water, and 1 g of sucralose in capsules. The patients continued fasting for 2 hours, and urine was collected in two portions for 5 hours and for subsequent 19 hours. Lactulose, xylose, sucrose, sucralose and mannitol were determined by capillary gas chromatography, and urinary excretion was expressed as percentage of the ingested dose of sucrose and sucralose, and as the lactulose/mannitol, sucrose/mannitol, sucrose/xylose and sucralose/mannitol ratios. Urine samples were stored at -24°C until analysis.

The analyses for determination of mannitol, xylose, sucrose, sucralose and lactulose in urine were performed as described (3, 7). All chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Samples were thawed, spiked with internal standard (phenyl-β-D-glucoside) and evaporated under vacuum to dryness (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Germany). The dried residues were derivatized by hydroxylamine in pyridine (75°C for 30 minutes) and bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (75°C for 15 minutes). The aliquot of the sample was injected into gas chromatograph equipped with a non-polar column and a flame ionization detector (GC 8000, Fisons Instruments, Milano, Italy). Chromatographic data were collected using Clarity software (DataApex, Prague, Czech Republic). The method is specific as no interfering peaks were found, and other mono- and disaccharides did not interfere with the sugars used for

gastrointestinal and colonic permeability testing. The detection limit (10 mg/l) and quantitation limit (50 mg/l) for mannitol, xylose, sucrose, sucralose and lactulose were identical, and reproducibility calculated as coefficient of variation was consistently below 7%. The quality control was performed by the measurement of customized stored quality control samples along with each set of samples.

Urinary neopterin was determined as described (5). Briefly, urine sample were collected and stored at -20°C until analysis. After centrifugation (5 minutes, 1300 g) and diluting 100 µl of urine specimens with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of disodium-EDTA per liter, samples were injected onto a column, and neopterin was determined using high performance liquid chromatography system Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission wavelengths) and quantified by external standard method. Creatinine was determined by Jaffé reaction after dilution of the sample 1:50 on a Modular analyzer (Roche, Basel, Switzerland) using a commercial kit according to the manufacturer's instructions, and neopterin concentrations were expressed as neopterin to creatinine ratio (µmol/mol creatinine).

The survival of patients with lactulose/mannitol equal or above 0.04, sucrose/mannitol equal or above 0.04, sucrose/xylose equal or above 0.02, sucralose/mannitol ratio equal or above 0.17 and urinary neopterin equal or above 220 µmol/ml creatinine was compared to the survival of patients with lower value of the respective parameters by the log-rank test. These cutoff limits were selected based on medians of respective parameters in the studied group. The correlation was examined by Spearman correlation coefficient. All statistical analyses were performed using NCSS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA).

Results

At the time of analysis, 18 patients died, and 3 patients were alive, 29 - 31 months after the start of therapy. The median survival was 12.5 months. Pretreatment sucrose/mannitol ratio (in 5 hour collection) equal or above 0.04 (median survival 10.6 vs. 18.4 months; $p = 0.03$; Figure 1), sucrose/xylose equal or above 0.02 (12.1 vs. 19 months; $p = 0.04$) and urinary neopterin equal or above 220 µmol/mol creatinine (10.6 vs. 18.4 months; $p = 0.02$; Figure 2) were also indicative of poor survival. In contrast, lactulose/mannitol and sucralose/mannitol ratios were not associated with survival. A trend for lower urinary neopterin concentrations and lower sucrose/mannitol, sucrose/xy-

lose and lactulose/mannitol ratios was observed in patients surviving 15 months and longer (Table 1).

A significant correlation was observed between uri-

Discussion

Although retrospective and exploratory, present

Table 1. Urinary neopterin and parameters of gastrointestinal permeability in patients surviving less than 15 months and 15 or more months (data are given as means \pm standard deviations)

parameter	survival		p
	less than 15 months (n = 11)	15 months and more (n = 10)	
neopterin ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine)	404 \pm 328	205 \pm 112	0.08
lactulose/mannitol ratio	0.09 \pm 0.10	0.04 \pm 0.03	0.27
sucrose/mannitol ratio	0.07 \pm 0.08	0.02 \pm 0.02	0.08
sucrose/xylose ratio	0.04 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03	0.13
sucralose/mannitol ratio	0.23 \pm 0.34	0.28 \pm 0.23	0.25

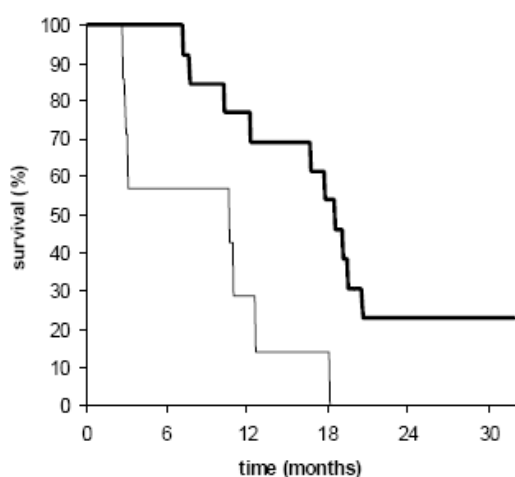


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves of patients with sucrose/mannitol ratio below (full line) versus equal or above (dashed line) 0.04. The respective median survival was 10.6 vs. 18.4 months (log-rank test, $p = 0.03$).

nary neopterin and sucrose/xylose ratio ($r_s = 0.57$, $p = 0.007$; Figure 3), while correlation between urinary neopterin and sucrose/mannitol ratio ($r_s = 0.38$, $p = 0.096$) was of borderline significance.

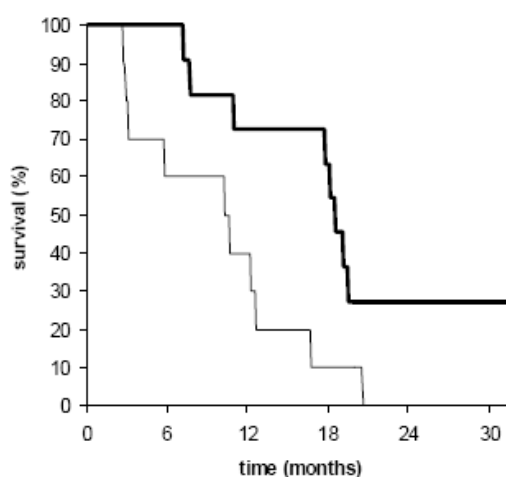


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves of patients with neopterin below (full line) versus equal or above (dashed line) 220 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine. The respective median survival was 10.6 vs. 18.4 months (log-rank test, $p = 0.02$).

data represent another indication that gastrointestinal permeability could represent a prognostic factor in patients with advanced cancer. An increase in sucrose/mannitol and sucrose/xylose ratios indicates a

derangement of gastroduodenal permeability. Increased lactulose/mannitol ratio, that reflects changes in the permeability of small bowel mucosa, was not indicative of prognosis in the present cohort that was, however, of limited size. A significant correlation was observed between sucrose/xylose ratio and urinary neopterin, and the correlation between sucrose/mannitol and neopterin was of borderline significance. A trend for higher neopterin and parameters of gastrointestinal permeability in patients surviving less than 15 months has not reached statistical significance, probably due to the limited size of the cohort.

Urinary neopterin is an indicator of systemic immune response. In earlier studies in patients with colorectal carcinoma, increased urinary neopterin was associated with inferior prognosis in both univariate and multivariate analyses (5, 8). Present data indicate that systemic immune and inflammatory response in cancer patients is associated with increased permeability of gastrointestinal mucosa, and this association may explain the prognostic significance of increased gastrointestinal permeability. The measurement of gastrointestinal permeability has been used to follow the changes of bowel function associated with therapy (1). More recently, we have demonstrated that increased lactulose/mannitol ratio may predict the toxicity of cytotoxic chemotherapy (9). The measurement of gastrointestinal permeability could thus represent a useful laboratory method for follow up of cancer patients. However, the measurement of intestinal permeability is relatively demanding in terms of logistics. Neopterin correlates with the parameters of gastrointestinal permeability (3) and has been shown to be prognostic factor (5, 8) and a predictor of toxicity (3). Therefore, measurement of neopterin could be more practical, especially if repeated measurements are required. Moreover, present data indicate that urinary neopterin is indicative of prognosis not only in cancer patients before the start of therapy, but also in patients before the subsequent lines of treatment, including the combination of chemotherapy and biological therapy, in this case the combination of cetuximab and chemotherapy. Present data are retrospective, i.e. hypothesis-generating, and should obviously be reproduced in a larger prospective cohort.

In conclusion, present data demonstrate that gastrointestinal permeability is associated with systemic immune activation and may be of prognostic significance in patients with metastatic colorectal carcinoma. Urinary neopterin is a prognostic factor also in patients treated with the combination of cetuximab and chemotherapy.

Acknowledgement

Supported by Research Project MZO 00179906 and grant of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR 9096-4.

References

- 1 Melichar B, Dvorak J, Hyspler R, Zadak Z. Intestinal permeability in the assessment of intestinal toxicity of cytotoxic agents. *Chemotherapy* 2005; 51: 336 - 338.
- 2 Melichar B, Hyspler R, Dragounova E. Intestinal permeability - a prognostic indicator in ovarian cancer? *J Clin Gastroenterol* 2008; in press.
- 3 Melichar B, Urbanek L, Krcmova L, et al. Urinary neopterin in patients with ovarian cancer. *Pteridines* 2006; 17: 145 - 153.
- 4 Melichar B, Solichová D, Freedman RS. Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 240 - 252.
- 5 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Malirova E, Cermanova M, Zadak Z. Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 2006; 21: 190 - 198.
- 6 Melichar B, Cerman J, Malirová E. Successful management of infusion reaction accompanying the start of cetuximab therapy. *Support Care Cancer* 2007; 15: 445 - 449.
- 7 Farhadi A, Keshavarzian A, Holmes EW, Fields J, Zhang L, Banan A. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. *Journal of Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 784: 145 - 154.
- 8 Weiss G, Kronberger P, Conrad F, Bodner E, Wachter H, Reibnegger G. Neopterin and prognosis in patients with adenocarcinoma of the colon. *Cancer Res* 1993; 53: 260 - 265.
- 9 Melichar B, Hyspler R, Dragounova E, Dvorak J, Kalabova H, Ticha A. Gastrointestinal permeability in ovarian cancer and breast cancer patients treated with paclitaxel and platinum. *BMC Cancer* 2007; 7: 155.

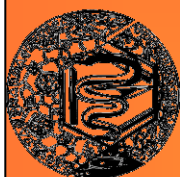
7.12. Příloha 12

Optimization and validation of HPLC method for simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection

Lubor Urbánek, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Petr Solich

Mezinárodní konference IMA 05 - Iraklion, Řecko, 2.-6.10.2005

Optimization and validation of HPLC method for simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection



Lubor Urbánek^{1,2}, Dagmar Solichová², Iveta Svobodová², Petr Solich¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

²Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital, Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

E-mail: urbaneck.l@centrum.cz



Introduction

At present time, high attention is given to an investigation of free oxygen radicals which participate in the pathogenic processes of many serious diseases. Free radicals influence the aging, irritate and damage tissues and belong to the negative factors of carcinogenesis. The vitamins A (retinol) and E (α -tocopherol) serve as reducing agents being able to inactivate the toxic effects of free radicals and protect the organism against oxidative stress. Therefore, rapid and sensitive methods allowing the simultaneous determination of these micronutrients are very useful.

Aim of the work

Validation of a simple isocratic reversed phase HPLC method for the determination of retinol and α -tocopherol in human serum using monolithic column and diode-array detection.

Experimental part

Chromatography:

The method was elaborated on the Perkin Elmer HPLC set (Norwalk, USA) composed of Series LC 200 pump, Series LC 200 autosampler, LC Column Oven 101 thermostat and LC 235C Diode Array Detector attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. Separation of retinol and α -tocopherol were performed using the Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm monolithic column (Merck, Darmstadt, Germany). As the mobile phase 100 % methanol was used at the flow rate of 2,5 ml/min and column pressure 3,1 MPa. The block heater LC Oven 101 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) was utilised to keep the analytical column temperature at 25°C. The injection volume was 50 μ l. The DAD detection of α -tocopherol and retinol was carried out at 295 nm and 325 nm respectively. The total time of analysis was 1,8 min.

Sample preparation:

Blood samples were withdrawn from the peripheral vein after twelve hours overnight fasting. The samples were then centrifuged (1600 x g, 10 min.) and serum was separated. In the liquid-liquid extraction (LLE) procedure, 500 μ l of serum was deproteinized by cool ethanol denatured with 5 % methanol (500 μ l, 5 min., 4°C). Then 2.500 μ l of n-hexane was added to this mixture and extracted for 5 minutes by a Vortex apparatus. After centrifugation (10 min., 1 600 x g), the aliquot (2 000 μ l) of the clean extract was separated and evaporated under nitrogen (60°C). The residue was dissolved in 400 μ l methanol and analysed by reversed-phase HPLC using the external standard calibration.

Conclusion

The method was validated according to standard procedures. The implementation of Chromolith Performance monolithic column shortens approximately four times the time of analysis of both vitamins in comparison with using traditional particulate column Pecosphere C18 (150 x 4mm), 5 μ m (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Both the shortening of the analysis time and the reducing of mobile phase consumption may play an important role for routine clinical analyses of biological samples.

Acknowledgment

This project was supported by IGA Ministry of Health Czech Republic, No. NR/8048-3.

Results

Vitamin A (retinol)

Repeatability-area (RSD):	4,46% (n = 10)
Repeatability-retention time (RSD):	0,16% (n = 10)
Accuracy-recovery:	100,0% (n = 3)
Accuracy-(RSD):	6,93%
Calibration range:	0,25 - 10 μ mol/l
Linearity:	$y = 3629,3x + 531,38$
Correlation coefficient:	$R^2 = 0,9999$
LOD:	0,005 μ mol/l
LOQ:	0,01 μ mol/l

Vitamin E (α -tocopherol)

Repeatability-area (RSD):	3,73% (n = 10)
Repeatability-retention time (RSD):	0,63% (n = 10)
Accuracy-recovery:	100,3% (n = 3)
Accuracy-(RSD):	2,40%
Calibration range:	0,5 - 50 μ mol/l
Linearity:	$y = 59165x + 625,92$
Correlation coefficient:	$R^2 = 0,9997$
LOD:	0,1 μ mol/l
LOQ:	0,3 μ mol/l

Fig. 1. Standard of vitamins A and E, Chromolith Performance monolithic column (retinol-1 μ mol/l, α -tocopherol-10 μ mol/l)

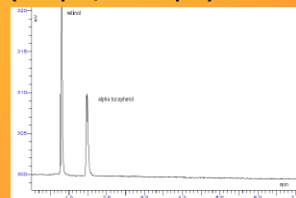


Fig. 2. Determination of vitamins A and E in a sample of human serum, Chromolith Performance monolithic column

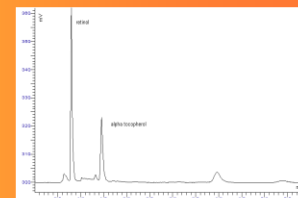


Fig. 3. Standard of vitamins A and E, Pecosphere column (retinol-1 μ mol/l, α -tocopherol-10 μ mol/l)

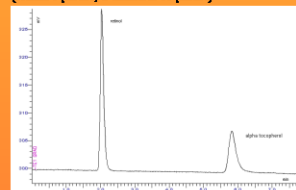


Fig. 4. Determination of vitamins A and E in a sample of human serum, Pecosphere column

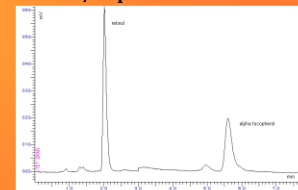


Fig. 5. Calibration curve of vitamin A

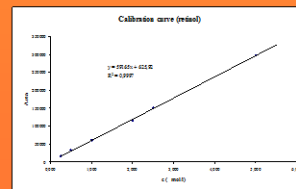
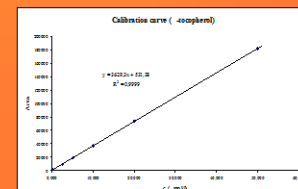


Fig. 6. Calibration curve of vitamin E



7.13. Příloha 13

Using monolithic stationary phase for HPLC determination of serum retinol, α -tocopherol and retinyl esters after absorption test of vitamin A

L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, B. Melichar, V. Opletalová, P. Solich

Mezinárodní symposium ISC 2006 – Kodaň, Dánsko, 21.-25.8.2006

Using monolithic stationary phase for HPLC determination of serum retinol, α -tocopherol and retinyl esters after absorption test of vitamin A

L. Urbánek^{1,2}, L. Krcmová¹, D. Solichová², B. Melichar³, V. Opletalová⁴, P. Solich¹

¹Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

²Dept. of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital Hradec Králové, Czech Republic

³Dept. of Radiology and Oncology, Teaching Hospital Hradec Králové, Czech Republic

⁴Dept. of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

Introduction

Absorption test of vitamin A is used for monitoring of intestinal permeability and may represent a sensitive indicator of intestinal damage. In this present study, a simple and rapid reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for selective and sensitive determination of retinol, α -tocopherol, retinyl-palmitate and retinyl-stearate in blood serum has been developed and used for the monitoring of intestinal mucosal damage in cancer patients treated with cytotoxic drugs after absorption test of vitamin A.

Vitamin A absorption test:

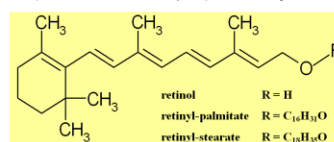
For practical assessment of the method, the vitamin A absorption test was performed. Blood samples were drawn from the peripheral vein after twelve hours overnight fast and they were marked as sample one. These samples were centrifuged (1600 x g, 10 min, 16°C) and the serum was separated and stored at -85°C. Then, a single oral dose of vitamin A (360000 IU) was administered to patients. The second blood sample was collected five hours after administration of the dosage of vitamin A and processed by the same procedure. The institutional ethical committee approved the protocol of this study and all patients signed an informed consent to participate into the study.

Aim

The aim of this study was a development of a novel, simple and rapid reversed-phase HPLC procedure for selective and sensitive determination of retinyl esters in blood serum. The method was used for sample analysis of oncology patients for monitoring changes of intestinal permeability after treatment by chemotherapy.

Methods

Sample preparation: In the liquid-liquid extraction (LLE) procedure, 2500 μ l of n-hexane:toluene 8:2 (v/v) mixture was added to 500 μ l of serum and extracted for 5 min by a shaker. The mixture was deproteinized by cool ethanol denatured with 5 % methanol (500 μ l, 5 min, 4°C) and extracted for 5 min by the same apparatus. After centrifugation (1600 x g, 10 min, 0°C), the aliquot (2000 ml) of the clean extract was separated. Another 2000 μ l of n-hexane:toluene 8:2 (v/v) mixture was added to the rest of serum sample for repeating of the extraction process. The collected clean extract was evaporated by vacuum concentrator. Then the residue was dissolved in 100 μ l of n-hexane and 300 μ l of methanol and finally 20 μ l of the sample was injected onto the chromatographic column.



Chromatography: The analyses were performed using the Perkin Elmer HPLC set (Norwalk, USA) comprising of a LC 200 pump, a LC 200 autosampler, LC Column Oven 101 thermostat and LC 235C Diode Array Detector attached to the Perkin Elmer Turbochrom

Chromatography Workstation version 4.1. Separation of retinol, α -tocopherol, retinyl-palmitate and retinyl-stearate were performed using the Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm monolithic column Merck (Darmstadt, Germany). The gradient elution was used at the flow rate 3 ml min⁻¹; mobile phase methanol:water 95:5 (v/v) in 0-2.1 min and methanol:2-propanol 60:40 (v/v) in 2.1-4.9 min. The total time of analysis was 6.0 minutes. The block heater LC Oven 101 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) was utilized to keep the analytical column temperature at 25°C. The injection volume was 20 μ l. The DAD detection of retinol, α -tocopherol, retinyl-palmitate and retinyl-stearate was carried out at 325 nm, 295 nm and 330 nm respectively.

Results

Figure 1:

Patient serum before absorption test
retinol 3.06 μ mol l⁻¹, α -tocopherol 15.31 μ mol l⁻¹, retinyl-palmitate under the limit of detection, retinyl-stearate under the limit of quantification

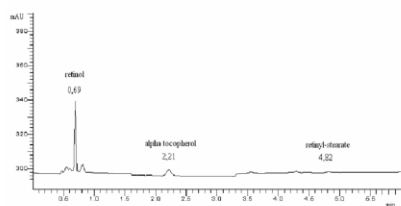


Figure 2:

Patient serum after absorption test (360 000 IU of vitamin A, after 5 hours)
retinol 3.62 μ mol l⁻¹, α -tocopherol 13.03 μ mol l⁻¹, retinyl-palmitate 37.88 μ mol l⁻¹, retinyl-stearate 18.04 μ mol l⁻¹.

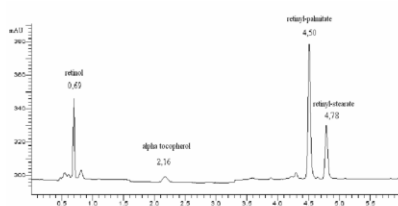


Table 1:

Validation characteristics of HPLC method for analysis of retinol, α -tocopherol and retinyl esters

Parameter	Retinol	Alpha tocopherol	Retinyl-palmitate	Retinyl-stearate
Correlation coefficient (R)	0.9997	0.9998	0.9995	0.9998
Accuracy RSD (%)	5.29	6.68	8.10	5.65
Repeatability RSD (%)	1.92	3.97	4.26	3.19
LOD (μ mol l ⁻¹)	4.0 · 10 ⁻²	5.0 · 10 ⁻¹	9.0 · 10 ⁻³	7.6 · 10 ⁻³
LOQ (μ mol l ⁻¹)	8.0 · 10 ⁻²	0.1 · 10 ¹	1.3 · 10 ⁻²	7.2 · 10 ⁻³
Resolution (R)	7.46	8.64	3.38	-

Conclusions

The novel and rapid HPLC method for analysis of retinyl esters in human serum after absorption vitamin A test was developed and used for monitoring of intestinal permeability changes after treatment by chemotherapy.

Acknowledgements

This project was supported by FRVŠ No. 1629/2006, IGA Ministry of Health Czech Republic, No. NR/8048-3 and Research Project MZO 00179906.

Literature

1. Harrison E.H., Hussain M.M.: Mechanisms Involved In the Intestinal Digestion and Absorption of Dietary Vitamin A, *J. Nutr.*, 131, 2001, 1405-1408.

7.14. Příloha 14

Využití chromatografie pro stanovení liposolubních vitaminů a cholesterolu u gerontologických pacientů s poruchami kognice

D. Solichová, R. Hyšpler, A. Tichá, I. Svobodová, L. Urbánek, L. Krčmová, P. Žďárský, B. Jurašková, L. Sobotka

12 .celostátní gerontologický kongres: Nejčastější onemocnění ve stáří-strategie v terapii, diagnostice a následné péči, Hradec Králové, 15.-17.11.2006

VYUŽITÍ CHROMATOGRRAFIE PRO STANOVENÍ LIPOSOLUBILNÍCH VITAMINŮ A CHOLESTEROLU U GERONTOLOGICKÝCH PACIENTŮ S PORUCHAMI KOGNICE

Solichová D.¹, Hyšpler R.¹, Tichá A.¹, Svobodová I.¹, Urbánek L.^{1,2}, Krčmová L.^{1,2}, Žďánský P.¹, Jurašková B.¹, Sobotka L.¹

¹Klinika Gerontologická a metabolická, FN Hradec Králové
²Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta HK, Univerzita Karlova Praha

Úvod

Stárnutí indukuje řadu významných změn jednotlivých biochemických parametrů, včetně metabolismu lipidů. Byla popsána hypocholesterolemie, porucha metabolismu mastných kyselin, lipoperoxidace a narušení antioxidantního stavu organismu. Objektívni zhodnocení těchto fenoménů je však obtížné a vyžaduje vždy komplexní pohled. Využití moderních chromatografických metod pro analýzu popisovaných biologických změn by mělo přispět ke zlepšení diagnostiky chronických chorob a z kvalitativní péče o pacienty vyšších věkových kategorií.

Cíl studie

Cílem projektu je využití moderních monolitních technologií vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro analýzu liposolubilních vitaminů A, E a hmotnostní detekce ve spojení s kapilární plynovou chromatografií (GC-MS) pro stanovení cholesterolu a jeho prekurzorů u gerontologických pacientů s Alzheimerovou chorobou (ACH) a vaskulární demencí (VD).

Soubor pacientů

Soubor tvořilo 155 gerontologických pacientů ze sedmi domovů důchodců České republiky s diagnózou Alzheimerovy choroby a vaskulární demence. Průměrný věk souboru byl 79 ± 1 rok, minimum 55 let, maximum 97 let. Podíl žen v souboru byl 130 (průměrný věk 80 ± 1 rok) a 25 mužů (průměrný věk 77 ± 2 roky).

Metody

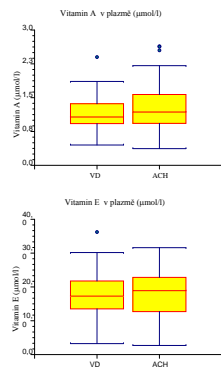
Metoda pro stanovení vitaminů A a E byla zpracována na kapalinovém chromatografu LD 240 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) vybaveným autosamperem a DAD detektorem. Pro stanovení byla použita monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, $100 \times 4,6$ mm (Merck, Darmstadt, Německo). Mobilní fází byl 100% methanol (Merck, Praha, ČR) s průtokem 2,5 ml/min, teplota 25°C, nástřik vzorku 50 μ l, tlak na koloně 3,10 MPa, celková doba analýzy 1,8 min. Retinol byl detekován při vlnové délce 325 nm, α -tokoferol při 295 nm. Retenční čas retinolu byl 0,8 min, α -tokoferolu 1,4 min. Vzorek krevní plazmy byl připraven metodou liquid-liquid extrakce do n-hexanu.

Steroly a skvalen byly extrahovány také z krevní plazmy. Vzorek byl připraven alkalickou hydrolyzou roztokem hydroxidu draselného v ethanolu. Dále byl extrahován do nepolárního rozpouštědla (n-hexanu). Vlastní stanovení bylo provedeno pomocí plynové chromatografie na nepolární kapilární koloně CP-Sil 8 CB, $30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm}$, (Varian, Palo Alto, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem v SIR (Selected Ion Recording) modu. Pro nástřik 1 μ l připraveného vzorku byl použit injektor typu split/splitless (liner 2 mm ID) o teplotě 300°C a periodou uzavřeného splitu (splitless) 1 min. Tlak na koloně byl 100 kPa a rychlost nosného plynu (helium) byla 37 cm/s. Nastavení termostatu pece: 50°C (po dobu 2 min), nárůst teploty o 15°C/min na 315°C (po dobu 14 min). Transfer line a ionizační zdroj 280°C. Ionizační energie byla nastavena na 70 eV.

Kvantifikace byla prováděna metodou vnitřního standardu. Jako interní standard pro skvalen byl použit 5 α -cholestan, pro ostatní steroly stigmasterol.

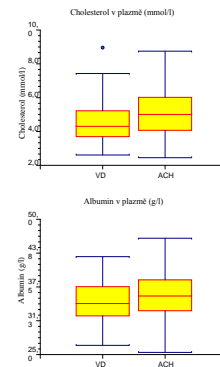
Hladiny cholesterolu a albuminu byly stanoveny pomocí komerčního kitu (Boehringer, Mannheim, Německo) na analyzátoru Hitachi 917 (Tokyo, Japonsko)

Výsledky



Tabulka 1: Průměrné koncentrace jednotlivých analytů u Alzheimerovy choroby (ACH) a vaskulární demence (VD).

Č.	Sledovaná látka	Jednotky	Alzheimerova choroba		Vaskulární demence		Korelace s látkou č.:
			Počet pacientů (N)	Průměr (\pm SD)	Počet pacientů (N)	Průměr (\pm SD)	
1	vitamin A	μ mol/l	95	1,28 \pm 0,46	56	1,14 \pm 0,34	2,3,4,5
2	vitamin E	μ mol/l	90	18,14 \pm 6,04	55	17,90 \pm 6,32	1,3,4,5
3	cholesterol	mmol/l	89	5,10 \pm 1,20	52	4,55 \pm 1,26	1,2,4,5,9
4	albumin	g/l	89	35,90 \pm 4,04	52	34,64 \pm 4,06	1,2,3,5,6,9,11
5	lathosterol	μ mol/l	90	3,75 \pm 2,20	53	3,12 \pm 1,83	1,2,3,4,11
6	sqalen	μ mol/l	90	1,52 \pm 1,50	53	1,30 \pm 1,17	4
7	sitosterol	μ mol/l	90	2,59 \pm 2,65	53	2,41 \pm 2,51	10,11,12
8	campesterol	μ mol/l	90	3,47 \pm 2,71	53	4,15 \pm 3,84	7,11,12
9	vitamin E / cholesterol	μ mol/mmol	79	3,64 \pm 1,33	47	4,02 \pm 1,48	2,4
10	lathosterol / cholesterol	μ mol/mmol	89	0,73 \pm 0,45	52	0,73 \pm 0,45	1,5,7
11	sitosterol / cholesterol	μ mol/mmol	89	0,53 \pm 0,53	52	0,52 \pm 0,45	4,5,7,8,12
12	campesterol / cholesterol	μ mol/mmol	89	0,70 \pm 0,55	52	0,90 \pm 0,71	7,11,



Závěr

U sledovaného souboru gerontologických pacientů byly nalezeny normální hodnoty vitaminů A, E a cholesterolu v plazmě (vit. A $1,2 \pm 0,4$ μ mol/l, vit. E $18,1 \pm 0,5$ μ mol/l, cholesterol $4,89 \pm 0,10$ mmol/l). Naopak hodnoty plazmatického albuminu byly mírně sníženy ($35,40 \pm 0,34$ g/l) a korelovaly s hladinami cholesterolu ($p = 0,00000$), vitaminu A ($p = 0,00002$), vitaminu E ($p = 0,03676$) a s věkem ($p = 0,00516$).

Hodnoty sledovaných parametrů u pacientů s diagnózami Alzheimerova choroba a vaskulární demence neprokázaly statisticky významný rozdíl, pouze hladina cholesterolu u Alzheimerovy choroby byla statisticky významně vyšší než u skupiny pacientů s vaskulární demencí ($5,10 \pm 0,13$ mmol/l v.s. $4,55 \pm 0,18$ mmol/l).

Poděkování

Práce byla podpořena grantovými projekty IGA MZ No. NR/7964-3, NR/8048-3 a výzkumným záměrem MZO 00179906.

7.15. Příloha 15

Využití nových stacionárních fází a moderní HPLC instrumentace v klinickém výzkumu

L. Urbánek, D. Solichová, L. Krčmová, B. Melichar, P. Solich

Advances in chromatography and electrophoresis, Chiranal 2007, Olomouc, 24.-27.6. 2007

Využití nových stacionárních fází a moderní HPLC instrumentace v klinickém výzkumu

Lubor Urbánek^{1,2}, Dagmar Solichová², Lenka Krčmová^{1,2}, Bohuslav Melichar³, Petr Solich¹

¹Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, ČR

²Klinika gerontologická a metabolická & Klinika onkologie a radioterapie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, ČR

Abstrakt

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současnosti jednou z nejvíce používaných analytických technik ve všech typech laboratorí. Důvodem je možnost separace, identifikace a kvantifikace různých analytů během jedné analýzy a v relativně širokém koncentračním rozmezí. Další výhodou je rovněž vysoká citlivost (v závislosti na použitém detektoru) a možnost automatizace.

V posledních letech se objevují nové analytické kolony s různými typy stacionárních fází jako např. monolitní, polymerní či hybridní materiály. Také chromatografická instrumentace se neustále zdokonaluje a vyvíjí, přičemž hlavní důraz je kladen na rychlost a nízké náklady analýzy. I přes nesporné výhody těchto moderních technologií je jejich využití pro rutinní analýzy zatím spíše sporadické.

Současné stanovení retinolu, α -tokoferolu a esterů retinolu po vitamin A absorbním testu s využitím monolitní kolony přispívá k odhalení poškození střevního epitelu po chemoterapii. Nový typ autosampleru pro mikrotitrační destičky RackChanger (Shimadzu, Japonsko) ve spojení s přepínacím ventilem a předkolonou umožňuje rychlé on-line stanovení velkého množství vzorků, čehož lze využít např. pro monitorování hladin neopterinu a kreatininu u onkologických pacientů. Obě tyto metody přinášejí časovou i ekonomickou úsporu, čímž se stávají atraktivní pro klinické laboratoře.

Nové typy kolon

Monolitní kolony		Kolony s polymerní st.f.		Kolony s hybridní st. f.	
Výhody (+)	Nevýhody (-)	Výhody (+)	Nevýhody (-)	Výhody (+)	Nevýhody (-)
Vyšší průtoková rychlost	Vysoká spotřeba rozpouštědel	Stabilita v celém rozsahu pH	Mikropóry-zabraňují přenosu hmoty (hl. malé molekuly)	Zvýšená teplotní i pH stabilita	Vyšší pořizovací cena
Zkrácení celkové doby analýzy	Vyšší pořizovací cena	Vysoká teplotní stabilita	Nízký maximální pracovní tlak (do 20 MPa)	Dlouhá životnost kolon	
Nízký zpětný tlak na koloně	Komerčně dostupné pouze Silik, C8 a C18		Horší separační účinnost	Separací účinnost jako u sílikagelových kolon	
Rychlá reekvilibrace					

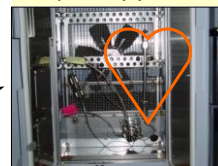
Autosampler pro mikrotitrační destičky RackChanger (Shimadzu, Japonsko)



HPLC Prominence LC 20 AB (Shimadzu, Japonsko)



Kolonový termostat s přepínacím ventilem



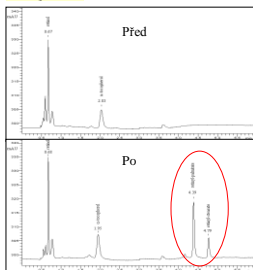
Kolona - srdce chromatografického systému



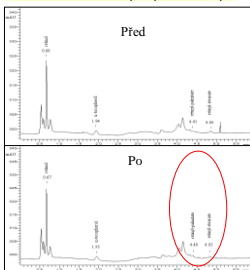
Možnosti využití

Současné stanovení retinolu, α -tokoferolu a esterů retinolu po vitamin A absorbním testu

Zdravý člověk:



Pacientka s karcinómem prsu po chemoterapii

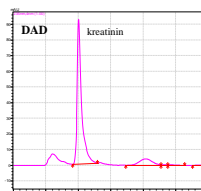
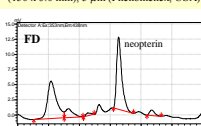


Chromatografické podmínky:

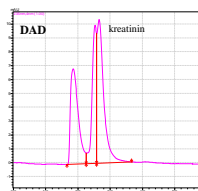
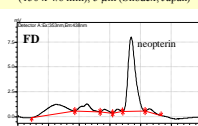
Kolona: monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm, (Merek, Darmstadt, Německo)
 Průtoková rychlost: 3.0 ml.min⁻¹
 Nástřik: 20 μ l
 Celková doba analýzy: 6.0 min
 Mobilní fáze: metanol : voda 95:5 (v/v) v 0-2.1 min
 metanol : 2-propanol 60:40 (v/v) v 2.1-4.9 min
 Teplota na koloně: 25°C
 Detekce: (DAD) retinol - 325 nm, α -tokoferol - 295 nm, estery retinolu - 330 nm

Stanovení neopterinu a kreatininu v moči pro monitoring onkologických pacientů

Hybridní kolona Gemini 5u C18 110A, (150 x 3.0 mm), 5 μ m (Phenomenex, USA)



Polymerní kolona Asahipak ODP-50 4D, (150 x 4.6 mm), 5 μ m (Shodex, Japan)



Chromatografické podmínky:

Průtoková rychlost: 0.8 ml.min⁻¹
 Nástřik: 1 μ l
 Celková doba analýzy: 6.0 min
 Mobilní fáze: fosfátový pufr 15 mM (pH 6.4)
 Teplota na koloně: 25°C
 Detekce: (FD) neopterin - ex. 353 nm, em. 438 nm
 (DAD) kreatinin - 235 nm

Poděkování

Práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy, GAUK, č. 88407/2007, výzkumného záměru MZO 00179906 a MSM 0021620822.

7.16. Příloha 16

Troubleshooting of simultaneous determination of neopterin and creatinine in biological samples

L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, B. Melichar, P. Solich

12th international meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, RDPA 2007, Island of Elba, Italy, 23.-26.9. 2007

Troubleshooting of simultaneous determination of neopterin and creatinine in biological samples

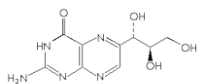
L. Urbánek^{1,2}, L. Krčmová^{1,2}, D. Solichová², L. Nováková¹, B. Melichar³, P. Solich¹

¹Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

²Dept. of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital Hradec Králové, Czech Republic

³Dept. of Radiology and Oncology, Teaching Hospital Hradec Králové, Czech Republic

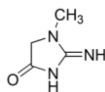
Abstract



Neopterin is produced in large amounts by human monocytes/macrophages after stimulation with the cytokine interferon- γ . Therefore, the monitoring of neopterin concentrations in body fluids like urine and serum provides information about immune system activation. Increased neopterin concentrations are found in various diseases such as HIV or malignant tumors and in neurological, cardiovascular and autoimmune diseases.(1,2)

Neopterin is a small aromatic molecule strongly fluorescing in its fully oxidized form, and therefore can be measured with high sensitivity by using its native fluorescence. It is also hydrophilic substance, which is more soluble in water than in organic solvents, and hence cannot be extracted by such solvents. Neopterin has to be protected from light because of its degradation and simultaneous measurement of creatinine is also necessary for correction of physiological variations of urine concentrations.(3)

Urine and blood are complicated matrices containing many other compounds, which make an on-line analysis difficult. We have focused on finding optimal conditions for the simple and fast determination of both compounds using modern technologies such as different types of analytical columns (monolithic, polymeric etc.) and new instrumentations (switching valve, special autosampler for microtitration plates). Comparison of different analytical methods can contribute to getting the most suitable conditions for simple, fast and cheap analysis of numerous sample sets.



Aim

The aim of the work was to find convenient conditions for on-line chromatographic determination of neopterin and creatinine in biological samples.

Methods and Problems

The original method for the assay of neopterin and creatinine was taken from Wachter and Fuchs(3). They have used reversed phase HPLC with phosphate buffer as mobile phase and flow rate of 0.8 ml.min⁻¹. Neopterin was measured by its native fluorescence and creatinine by UV absorption.

We analyze urine samples using the same method but in connection with modern instrumentation (switching valve and special autosampler for microtitration plates) and using new types of stationary phases (monolithic, polymeric, hybrid etc.). However, utilization of this HPLC instrumentation brings some new problems such as:

Deformation of the peak shape which is a typical problem of urine samples of oncologic patients treated with chemo- and radio therapy.

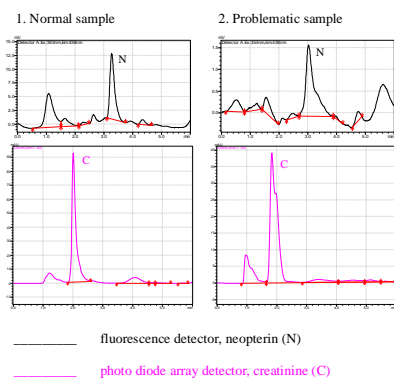
Increasing back pressure - in case of large amount of samples (300-400 PSI increase after 100 analyses). It is also connected with false negative results because of lower signal intensity and smaller peak area.



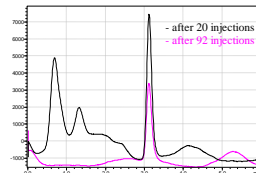
Results

Chromatograms of urine samples within monitoring of oncologic patients

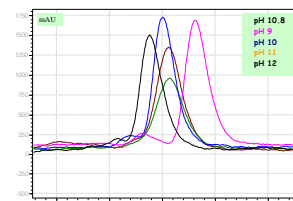
Hybrid column Gemini 5u C18 110A, (150 x 3.0 mm), 5 μ m (Phenomenex, USA)



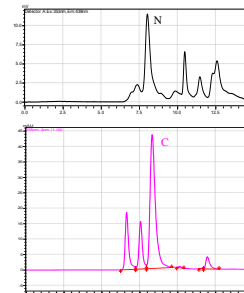
Chromatograms of neopterin standard (c = 250 nmol . l⁻¹) after 20 and 92 injections



Influence of pH on neopterin analysis in human urine (mobil phase sodium bicarbonate 0.05 mol.L⁻¹, flow rate 0.4 ml.min⁻¹, injection volume 1 μ l)



On-line analysis of urine sample with pretreatment column and switching valve



Chromatographic conditions:

Column: polymer Asahipak ODP-50 4D, (150 x 4.6 mm), 5 μ m (Shodex, Japan)
Pre-column: polymer Asahipak ODP-50G 4A, (10 x 2.0 mm), 30 μ m (Shodex, Japan)
Flow rate: 0.03 ml.min⁻¹ in 0-3 min
0.8 ml.min⁻¹ in 3-15 min
Injection volume: 0.5 μ l
Analysis time: 15 min
Mobil phase: hydrogen carbonate buffer 0.05 mol.l⁻¹ (pH 8.6)
Column temperature: 25°C
Detection: PDA - 235 nm
FD - ex. 353 nm, em. 438 nm

Literature

- 1) C. Murr, B. Widner, B. Wirleitner, D. Fuchs, *Curr. Drug Metab.* 3 (2002) 175-187
- 2) D. Fuchs, G. Weiss, H. Wachter, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101 (1993) 1-6
- 3) H. Wachter, D. Fuchs, A. Hausen, G. Reibnegger, G. Weiss, E. R. Werner, G. Werner-Felmayer, *NEOPTERIN-Biochemistry-Methods-Clinical Application*, Walter de Gruyter, New York 1992

Acknowledgements

This project was supported by GAUK No. 88407/2007, GAČR project No. 203/07/P370 and ZENTIVA company.

Conclusion

Determination of neopterin and creatinine in biological samples brings many problems to their routine analyses. Although modern HPLC technologies promise ideal conditions and possibilities, there are still many troubles to be solved in order to ensure reliable and accurate results for clinical research.

8. SEZNAM VĚDECKÉ AKTIVITY AUTORA (2004 - 2008)

PŘEHLED PUBLIKACÍ

- 1) **Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection**

Lubor Urbánek, Dagmar Solichová, Bohuslav Melichar, Josef Dvořák, Iveta Svobodová and Petr Solich

Analytica Chimica Acta, 573, 2006, str. 267-272, **IF = 2,894**

- 2) **Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using a monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects**

Lubor Urbánek, Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Bohuslav Melichar, Veronika Opletalová, Petr Solich

Journal of Separation Science, 29, 2006, str. 2485-2493, **IF = 2,535**

- 3) **Urinary neopterin in patients with liver tumors**

Bohuslav Melichar, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Lubor Urbánek, Pavel Veselý and Karolina Melicharová

Tumori, 92,2006, str. 318-322, **IF = 0,701**

- 4) **Urinary neopterin in patients with ovarian cancer**

Bohuslav Melichar, Lubor Urbanek, Lenka Krcmová, Hana Kalabova, Iveta Svobodova, Emanuela Dragounova, Pavel Vesely, Radomír Hyspler, Dagmar Solichova

Pteridines, 17, 2006, str. 145-153, **IF = 0,545**

5) Urinary neopterin in patients with upper gastrointestinal, biliary and pancreatic carcinomas

Bohuslav Melichar, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Lubor Urbánek, Karolina Melicharová

Pteridines, 17, 2006, str. 20-24, **IF = 0,545**

6) Serial urinary neopterin measurements reflect the disease course in patients with epithelial ovarian carcinoma treated with paclitaxel/platinum chemotherapy

Bohuslav Melichar, Hana Kalabova, Lubor Urbanek, Eva Malirova, Dagmar Solichova

Pteridines, 18, 2007, str. 1-7, **IF = 0,471**

7) Urinary neopterin in patients treated with gefitinib

Hana Kalabova, Josef Dvorak, Radomír Hyspler, Alena Ticha, Lenka Krcmova, Lubor Urbanek, Dagmar Solichova, Bohuslav Melichar

Pteridines, 18, 2007, str. 95-100, **IF = 0,471**

8) Serum alpha-tocopherol, retinol and neopterin during paclitaxel/ carboplatin chemotherapy

Bohuslav Melichar, Hana Kalábová, Lenka Krčmová, Lubor Urbánek, Radomír Hyšpler, Eva Malířová and Dagmar Solichová

Anticancer Research, 27, 2007, str. 4397-4402, **IF = 1,414**

9) Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate column

I. Citová, L. Havlíková, L. Urbánek, D. Solichová, L. Nováková, P. Solich

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 2007, str. 675-681, **IF = 2,867**

10) Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell counts in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy

Bohuslav Melichar, Lubor Urbánek, Lenka Krčmová, Hana Kalábová, Karolina Melicharová, Eva Malířová, Helena Hornychová, Aleš Ryška, Radomír Hyšpler and Dagmar Solichová

Anticancer Research, 28, 2008, str. 2389-2396, **IF = 1,414**

11) Gastrointestinal permeability - a parameter of possible prognostic importance in metastatic colorectal carcinoma

Bohuslav Melichar, Radomír Hyspler, Hana Kalabova, Lubor Urbanek, Lenka Krcmova, Dagmar Solichova

Pteridines, 19, 2008, str. 19-22, **IF = 0,471**

12) Permeability and Vitamin A Absorption in Patients With Chemotherapy-induced Diarrhea

Melichar B, Dvorák J., Krcmova L., Hyspler R., Urbánek L., Solichová D.

American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials, 31, 2008, str. 580-584, **IF = 1,551**

PŘEHLED POSTERŮ A PUBLIKOVANÝCH ABSTRAKT

1) Intestinal mucosal damage monitoring in cancer patients treated with cytotoxic drugs

D. Solichová, L. Krčmová, L. Urbánek, B. Melichar, I. Svobodová, V. Opletalová, V. Bláha, J. Bastos, P. Žďánský

XXII. Kongres SKVIMP, Hradec Králové, 2.-4.3. 2005

2) Optimization and validation of HPLC method for simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection

Lubor Urbánek, Dagmar Solichová, Iveta Svobodová, Petr Solich

Mezinárodní konference IMA 05, Iraklion, Řecko, 2.-6.10. 2005

3) 2D HPLC fluorimetric method on microtitate plates for simultaneous determination of neopterin and creatinine in human urine

Dagmar Solichová, Lubor Urbánek, Petr Solich, Bohuslav Melichar, Iveta Svobodová, Vladimír Bláha, Zdeněk Zadák

Mezinárodní symposium ISLS 2006, Lugo, Španělsko 18.-21.7. 2006

4) Using monolithic stationary phase for HPLC determination of serum retinol, α -tocopherol and retinyl esters after absorption test of vitamin A

L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, B. Melichar, V. Opletalová, P. Solich

Mezinárodní symposium ISC 2006, Kodaň, Dánsko, 21.-25.8. 2006

5) Využití chromatografie pro stanovení liposolubilních vitaminů a cholesterolu u gerontologických pacientů s poruchami kognice

D. Solichová, R. Hyšpler, A. Tichá, I. Svobodová, L. Urbánek, L. Krčmová, P. Žďánský, B. Jurašková, L. Sobotka

12. celostátní gerontologický kongres: Nejčastější onemocnění ve stáří-strategie v terapii, diagnostice a následné péči, Hradec Králové, 15.-17.11. 2006

6) Development of new HPLC method using a monolithic technology for the simultaneous determination of retinoic acid, retinol, alpha- and gamma-tocopherol in human serum in monitoring of anticancer therapy

D. Solichová, L. Krčmová, L. Urbánek, H. Kalábová, B. Melichar, Z. Zadák, P. Solich

31st. International symposium on high performance liquid phase separation and related techniques, HPLC 2007, Ghent, Belgie, 17.-21.6. 2007

7) Využití nových stacionárních fází a moderní HPLC instrumentace v klinickém výzkumu

L. Urbánek, D. Solichová, L. Krčmová, B. Melichar, P. Solich

Advances in chromatography and electrophoresis, Chiranal 2007, Olomouc, 24.-27.6. 2007

8) Troubleshooting of simultaneous determination of neopterin and creatinine in biological samples

L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, B. Melichar, P. Solich

12th international meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, RDPA 2007, Island of Elba, Italy, 23.-26.9. 2007

9) Změny produktů lipoperoxidace u familiární hypercholesterolemie při léčbě extrakorporální eliminací

Solichová D., Bláha M., Blažek M., Krčmová L., Svobodová I., Bláha V., Urbánek L., Kašparová M., Slanařová M., Žďánský P., Malý J.

XXIV. kongres SKVIMP, Hradec Králové, 28.2-1.3 2008.

10) Monitoring of lipoperoxidation in patients with familiar hypercholesterolemia treated by extracorporeal elimination

Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Bláha M., Bláha V., Blažek M., Žďánský P., Sobotka L., Solich P.

Conference – Oxidative Stress in Diseases, Bratislava, Slovensko, 23.-25.4. 2008

11) Koncentrace cirkulujícího vaskulárního endoteliálního růstového faktoru /VEGF/, C-reaktivního proteinu a neopterinu v moči v průběhu dose-densní chemoterapie u pacientek s karcinomem prsu

Malířová Eva, Melichar Bohuslav, Dlabalová Blanka, Ballóková Anna, Urbánek Lubor, Krčmová Lenka, Hyšpler Radomír, Hornychová Helena, Ryška Aleš, Solichová Dagmar

XXIX. Imunoanalytické dny, Špindlerův Mlýn, 11.-15.5. 2008.

12) Rapid HPLC method for the determination of vitamin A and E in human serum using new technologies

Krčmová L, Plíšek J., Kašparová M., Ascensao C., Urbánek L., Solich P., Solichová D.

8th International Conference VITAMINS 2008, Zlín, 9.-11.9. 2008

13) The new HPLC method using monolithic technology for simultaneous determination of vitamin D2, D3 and 25(OH)D3, retinol and α -tocopherol in human serum

Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Žďánský P., Sobotka L., Solich P.

8th International Conference VITAMINS 2008, Zlín, 9.-11.9. 2008

14) The new HPLC method using monolithic technology for simultaneous determination of vitamin D2, D3 and 25(OH)D3 in human serum

Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Žďánský P., Sobotka L., Solich P.

XXI. biochemický sjezd ČSBMB, České Budějovice, 14-17.9. 2008

15) Development of New HPLC Method for Determination of Vitamin D for Clinical Research

Markéta Kašparová, Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Alena Vlčková, Lubor Urbánek, Petr Žďánský, Petr. Solich

6th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD), Denizli, Turkey, 9.-12.10. 2008

- 16) Miniaturization of Solid phase extraction method for determination of liposoluble vitamins in human serum using new technologies**
Lenka Krčmová, Markéta Kašparová, Dagmar Solichová, Jiří Plíšek, Lubor Urbánek, Petr Solich
6th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD), Denizli, Turkey, 9.-12.10. 2008
- 17) Serum alpha-tocopherol and retinol during paclitaxel/carboplatin chemotherapy in patients with breast and ovarian carcinoma**
D. Solichova, B. Melichar, H. Kalabova, L. Krcmova, L. Urbaneck, E. Malirova, R. Hyspler, Z. Zadak
Clinical Nutrition Supplements, Vol.2, 2007, str.88; publikovaný abstrakt
- 18) Utilization of liquid chromatography for the monitoring of cancer patients**
L. Urbánek, D. Solichová, B. Melichar, L. Krčmová, P. Solich
Pteridines, Vol. 18, 2007, pp. 35-68; publikovaný abstrakt
- 19) Prognostic factors and management of gastrointestinal and liver tumors**
B. Melichar, P. Veselý, H. Kalábová, H. Bašová, J. Cerman, L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová
Acta Medica (Hradec Králové), Vol. 50, 2007, str. 77, publikovaný abstrakt
- 20) Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma**
B. Melichar, D. Solichová, L. Urbánek, K. Melicharová, Z. Zadák
Acta Medica (Hradec Králové), Vol. 50, 2007, str. 77-78, publikovaný abstrakt
- 21) Development of HPLC method for the simultaneous determination of α -tocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects**
D. Solichová, L. Krčmová, L. Urbánek, B. Melichar, V. Opletalová, P. Solich
Acta Medica (Hradec Králové), Vol. 50, 2007, str. 86, publikovaný abstrakt

PŘEHLED PŘEDNÁŠEK

1) HPLC stanovení neopterinu v moči s využitím autosampleru Rack Changer/c Prominence

L. Urbánek, D. Solichová

Odborný seminář uživatelů analytické instrumentace SHIMADZU - Vlachovice

27.-28.4. 2006

2) Uplatnění HPLC v klinickém monitoringu

L. Urbánek, D. Solichová, L. Krčmová

Odborný seminář gerontologické a metabolické kliniky FN HK, 24.1. 2007

3) Utilization of liquid chromatography for the monitoring of cancer patients

L. Urbánek, D. Solichová, B. Melichar, L. Krčmová, P. Solich

26th International Winter-Workshop: Clinical, Chemical and Biochemical

Aspects of Pteridines, St. Christoph, Austria 4.-11.3. 2007

4) Application of Modern Technologies in Biomedical Analyses

Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Lubor Urbánek, Markéta Kašparová, Petr Žďánský, Luboš Sobotka, Petr Solich

6th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD), Denizli, Turkey, 9.-12.10. 2008

PŘEHLED GRANTŮ A VÝZKUMNÝCH ZÁMĚRŮ

Hlavní řešitel:

FRVŠ 1629/2006

GAUK 88407/2007

Spoluřešitel:

FRVŠ 1164/2007

GAUK 296/2005

Podíl na řešení:

IGA MZ ČR NR/8156-3

IGA MZ ČR NR/8392-3

IGA MZ ČR NR/8048-3

IGA MZ ČR NR/9096-4

GAČR 203/07/P370

MZO 00179906 (výzkumný záměr FN HK)

MSM 0021620822 (výzkumný záměr FaF)

9. SHRNU TÍ

Předložená disertační práce představuje zajímavé spojení dvou na první pohled odlišných oborů, jakými jsou analytická chemie a medicína. Pohled druhý, podrobnější, však ukazuje, že oba obory si mohou být velmi blízké a při vzájemné spolupráci analytika a lékaře přináší užitek každému z nich.

První část této práce se věnuje nejprve teoretickým základům HPLC a chromatografické instrumentaci. Jedná se o krátký přehled některých principů uplatňovaných v kapalinové chromatografii a stručné představení vybraných součástí HPLC. Vzhledem k tomu, že srdcem každého chromatografického systému je analytická kolona s určitým typem stacionární fáze, se další část práce zabývá různými typy kolon a sorbentů. Zvláštní kapitola je potom věnována monolitickým kolonám a materiálům, které představují jakýsi nový a netradiční směr v chromatografii. Výhody a nevýhody použití monolitních kolon jsou pak shrnuty v publikacích, které jsou součástí experimentální části (Příloha 1, 2 a 9). Závěr této technické části tvoří rešerše s přehledem nových trendů v oblasti kapalinové chromatografie jako jsou ultra účinná kapalinová chromatografie, kolony se sub-2-mikronovými částicemi či automatizace a miniaturizace celých systémů.

Druhá část disertační práce se zabývá sběrem a úpravou biologického materiálu. Jsou zde diskutovány různé faktory, které mají vliv na konečné výsledky analýz, včetně popisu analyzované biomatrixe – krve a moči. Možnosti zpracování biologického materiálu shrnuje Kapitola 3.5.2, kde jsou uvedeny různé způsoby extrakce. Hlavní důraz je při tom kladen na vzájemné srovnání technik LLE a SPE společně s uvedením jejich modifikovaného provedení.

Závěr teoretické části je věnován detailnějšímu popisu stanovovaných látek, kterými byly vitaminy A, estery retinolu, vitamin E a buněčný metabolit neopterin. Kromě charakteristiky fyzikálně chemických vlastností těchto látek je zde uvedený také jejich biologický význam, metabolismus a terapeutické využití. Nedílnou součástí každé kapitoly je rovněž přehled možností stanovení těchto analytů.

Část experimentální je rozdělena do dvou tematických okruhů. První zahrnuje komentář k analytickým publikacím a především popisuje metodiku stanovení vybraných látek. Druhá část práce představuje komentovaný souhrn biomedicínských

prací, které využívají výsledky získané pomocí předem diskutovaných analytických metod.

V závěru disertační práce, v kapitole Přílohy, je uveden soubor dvanácti publikací, který je dále doplněn přehledem ústních prezentací a nejvýznamnějších plakátových sdělení, které byly vypracovány v rámci postgraduálního studia a přehledem grantů, na kterých se autor této práce podílel.

10. SUMMARY

The presented dissertation thesis shows an interesting connection of two research fields that seem totally different from the first sight: analytical chemistry and medicine. However, the second sight could show that both branches might exist very closely to each other and their cooperation can be even useful for both sides.

The initial part of the thesis deals with theoretical basics of HPLC and chromatographic instrumentation bringing a short overview of important principles of liquid chromatography including a brief introduction of crucial parts of an HPLC instrument. Due to the fact that the heart of the chromatographic system is an analytical column, another part of the text deals with different types of stationary phases and analytical sorbents. A separate chapter is focused on monolithic columns and other materials representing a new and original trend of chromatographic techniques. The main advantages and disadvantages of monolithic columns are then summarized in the published papers listed in the Experimental part (Enclosures 1, 2 and 9). Finally, the technical section of my thesis is concluded by a review of new trends in the chromatographic instrumentation presented e.g. by Ultra Performance Liquid Chromatography, columns filled with sub-2-micron particles or automatization or miniaturization of complete HPLC systems.

The second part of the thesis deals with different ways of biological material withdrawal and treatment. Different factors influencing the final analytical results are discussed and a short description of analyzed matrix (human serum and urine) is presented. The next chapter (3.5.2) summarizes possible procedures of bio-matrix treatment using different extraction modes. Here, a practical comparison of LLE and SPE techniques is stressed out showing their alternative ways of performance.

The final section of the theoretical part is focused on a detailed characterization of analyzed substances comprising vitamin A, retinol esters, vitamin E and neopterin. Besides the physicochemical properties of these analytes, their biological activity, metabolism and therapeutic use are also mentioned. For each analyte, current possible ways of its analytical determination found in the literature are reviewed.

The Experimental part is separated into two thematic sections. The first one comprises comments on analytical publications and, chiefly, describes the methods of determination of the studied substances. The second section presents a summary of

biomedical papers which were published using results obtained by previously described analytical methods.

The last chapter – Enclosures – shows a collection of twelve publications further completed by an overview of oral presentations and the most important poster presentations realized within my postgraduate studies including a list of grants.

11. ZÁVĚR

Už od školních let je člověk veden k tomu, aby se postupně rozhodoval, jakému oboru se v dospělosti chce věnovat a tomu se snaží přizpůsobit i své vzdělání. Během studia se tak ze studenta pomalu utváří specialista, který se až letitou praxí stane skutečným odborníkem ve svém oboru. Avšak člověk, který se delší dobu věnuje pouze určitému tématu, snadno zapomíná, že i jiná povolání mají své nepostradatelné místo ve společnosti, a že odborníci a specialisté z jiných oborů se svými znalostmi a zkušenostmi mohou značnou měrou přispět k novému pohledu na řešenou problematiku. Jejich vzájemná spolupráce, tak může vést k větším úspěchům nežli činnost jednotlivců.

Od začátku 20. století do současnosti dochází k obrovskému technickému rozvoji snad ve všech oblastech lidské činnosti a medicína společně s farmacií nejsou žádnou výjimkou. Lékaři se musí pro určení správné diagnózy čím dál častěji spoléhat na výsledky získané pomocí speciálních vyšetřovacích metod, které využívají vysoce sofistikovanou a nákladnou instrumentaci. Obsluhu a měření na těchto přístrojích pak zabezpečuje proškolený personál, který tak lékaři poskytuje data, na jejichž základě lékař provádí někdy až zásadní rozhodnutí o životě člověka. Neméně důležitá je i rychlost získávání správných výsledků.

Dalším významným faktorem je také ekonomičnost vyšetřovacích metod. Vzhledem k tomu, že financování zdravotnictví je ožehavým politickým tématem, je stále složitější získávání prostředků pro klinickou praxi i výzkum. Proto je úzká komunikace mezi výzkumníkem-analytikem a klinickým lékařem velmi důležitá, neboť umožňuje pružně uplatňovat moderní trendy, například v oblasti analytické chemie, do každodenní lékařské praxe, což vzhledem ke kladenému důrazu na úspornost nových analytických postupů může přinést i kýžený ekonomický efekt.

Předložená práce, jejímž cílem byla modernizace a vývoj nových bioanalytických metod s ohledem na rychlost a efektivnost analýz, by mohla představovat příklad takovéto účelné mezioborové spolupráce.

12. LITERATURA

- [1] Skoog D. A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R.: Fundamentals of Analytical Chemistry, 8th edition, Brooks/Cole-Thomson Learning, Belmont USA, 2004, kap. 32, str. 973-995
- [2] Meyer V. R.: Practical High-Performance Liquid Chromatography, 2nd edition, John Wiley & Sons, Chichester England, 1996, kap. 2, str. 17-49
- [3] Štulík a kol.: Analytické separační metody, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005
- [4] Bílková K., Králová B.; Izolace biomakromolekul, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 1997, kap. 2.3, str. 37-102
- [5] Holzbecher Z., Churáček J. a kol.: Analytická chemie, SNTL, Praha 1987, kap. 12.5, str. 451-459
- [6] Poole C. F.: The Essence of Chromatography, Elsevier Science B. V., Amsterdam Netherlands, 2003, kap. 4, str. 299-300
- [7] Webové stránky: www.hplc.cz, červen 2008
- [8] Webové stránky: www.zirchrom.com, červen 2008
- [9] Webové stránky: www.sigmaaldrich.com, červen 2008
- [10] webové stránky: www.waters.cz, červen 2008
- [11] Webové stránky: www.chromservis.cz, červen 2008
- [12] Webové stránky: www.chromatography.merck.de, srpen 2008
- [13] Švec F.: Chem. Listy 98, 2004, str. 232-238
- [14] Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z.: Journal of Chromatography Library vol. 67, Monolithic materials – preparation, properties and applications, Elsevier, 2003, kap. 1-2, str. 1-47
- [15] Nakanishi K., Soga N.: J. Am. Ceram. Soc., 74 , 1991, str. 2518-2530
- [16] Kubín M., Špaček P., Chromeček R.: Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 1967, str. 3881
- [17] Tennikov M.B., Gazdina N.V., Tennikova T.B., Švec F.: J. Chromatogr. A, 798, 1998, str. 55-64
- [18] Buchmeiser M.R.: Macromol. Rapid Commun., 22, 2001, str. 1082-1094
- [19] Peters E.C., Švec F., Fréchet J.M.J.: Adv. Mater., 9, 1997, str. 630-633
- [20] Podgornik A., Barut M., Stranear A., Josic D., Koloini T.: Anal. Chem., 72, 2000, str. 5693-5699

- [21] Webové stránky: www.hpst.cz, září 2008
- [22] Webové stránky: www.ssi.shimadzu.com, září 2008
- [23] Racek J. et al.: Klinická biochemie, Galén 2006, str. 23-57, str. 141-143, str. 301-305
- [24] Marshall W.J., Bangert S.K.: Clinical Biochemistry - Metabolic and Clinical Aspects, Elsevier Health Sciences, 1995, kap. 2, str. 7-14
- [25] Friedecký B.: Klinická biochemie a metabolismus, 2, 2007, str. 111-115
- [26] Mikšová Z., Froňková M., Zajíčková M.: Kapitoly z ošetrovatelské péče II, Grada, 2006, kap. 1, str. 11-38
- [27] Majors R.E.: LC/GC Europe, May 2006, str. 284-292
- [28] Majors R.E.: LC/GC Europe, February 2003, str. 71-81
- [29] Jeannot M.A., Cantwell F.F.: Anal. Chem., 68, 1996, str. 2236-2240
- [30] Liu S., Dasgupta P.K.: Anal. Chem., 67, 1995, str. 2042-2049
- [31] Pawliszyn J.: Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory, Elsevier, 2002, kap. 9, str. 253-278, kap. 15, str. 503-530
- [32] Simpson N.J.K.: Solid-phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications, CRC Press, 2000
- [33] SPE Reference Manual & Users Guide, Phenomenex
- [34] Bulletin 910 – Guide to Solid Phase Extraction, Supelco, Sigma-Aldrich Co., 1998
- [35] Purity by SPE - Oasis[®] Sample Extraction Products, Waters Corporation, 2006
- [36] Marešová V. prezentace: Principy řízených extrakcí tox z biologického materiálu pro různé typy toxikologických analýz - Význam správné přípravy vzorku pro konečný výsledek, Webové stránky: www.lfl.cuni.cz/Data/files/Toxikologie/Toxikologické%20analýzy-cílené%20a%20screening-VM.ppt, říjen 2008
- [37] Webové stránky: www.proteomics.com.cn/2005/papers/ZipTipMC2.pdf, říjen 2008
- [38] Baltussen E., Sandra P., David F, Cramers C: J. Microcolumn. Sep., 11(10), 1999, str. 737-747
- [39] Song W.O., Beecher G.R., Eitenmiller R.R.: Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water- Soluble Vitamins, Wiley NY USA 2000
- [40] Bender D.A.: Nutritional Biochemistry of the Vitamins, Cambridge University Press, Cambridge UK 1992

- [41] Vávrová J. a spol.: Vitaminy a stopové prvky, Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP, Pardubice, 2007
- [42] Webové stránky:
http://www.nature.com/nm/journal/v13/n6/fig_tab/nm0607-671_F1.html, říjen 2008
- [43] Tang G., Russell R.M.: J. Lipid Res., 31, 1990, str. 175-182
- [44] Webové stránky: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tretinoin>, říjen 2008
- [45] Webové stránky: <http://en.wikipedia.org/wiki/Isotretinoin>, říjen 2008
- [46] Webové stránky: http://www.ieo.it/inglese/innovazioni/acid_retin.shtml, říjen 2008
- [47] Niles R. M.: Nutrition 16, 2000, 1084-1090
- [48] Mann J., Truswell A.S.: Essentials of Human Nutrition, Oxford University Press, NY USA 2002, kap. 13.2, str. 238-247
- [49] Brigelius-Flohé R., Kelly F.J., Salonen J.T., Neuzil J., Zingg JM., Azzi A: Am. J. Clin. Nutr., 76, 2002, str. 703-716
- [50] Bishop M.L., Duben-Engelkirk L., Fody E.P. et al.: Clinical Chemistry-Principles, Procedures, Correlations, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia USA, 2000, str. 540-544
- [51] Kline K., Lawson K.A., Yu W., Sanders B.G.: Vitam. Horm., 76, 2007, str. 435-461
- [52] Neuzil J., Weber Ch., Kontush A.: Atherosclerosis, 157, 2001, str. 257-283
- [53] Melichar B., Kalábová H., Krcmová L., Urbánek L., Hyspler R., Malířová E., Solichová D.: Anticancer Res., 27 (6C), 2007, str. 4397-4401
- [54] Andreoli R., Manini P., Poli D., Bergamaschi E., Mutti A., Niessen W.M.A.: Anal. Bioanal. Chem., 378, 2004, str. 987-994
- [55] Rodriguez-Delgado M.A., Díaz-Flores Estévez J.F., Díaz-Flores Estévez F., Hernández Calzadilla C., Díaz Romero C.: J. Pharm. Biomed. Anal., 28, 2002, str. 991-997
- [56] Sirimanne S.R., Patterson D.G., Ma L., Justice J.B.: J. Chromatogr. B, 716, 1998, str. 129-137
- [57] Talwar D., Ha T.K.K., Cooney J., Brownlee Ch., O'Reilly D.S.J.: Clin. Chim. Acta, 270, 1998, str. 85-100
- [58] Karpinská J., Mikoluc B., Motkowski R., Piotrowska-Jastrzebska J.: J. Pharm. Biomed. Anal., 42, 2006, str. 232-236

- [59] Alvarez J.C., De Mazancourt P.: *J. Chromatogr. B*, 755, 2001, str. 129-135
- [60] Gimeno E., Castellote A.I. Lamuela-Raventós R.M., de la Torre-Boronat M.C., Lopéz-Sabater M.C.: *J. Chromatogr. B*, 758, 2001, str. 315-322
- [61] Mata-Granados J.M., Luque de Castro M.D., Quesada J.M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35, 2004, str. 575-582
- [62] Chatzimichalakis P.F., Samindou V.F., Papadoyannis I.N.: *J Chromatogr. B*, 805, 2004, str. 289-296
- [63] Siluk D., Oliveira R.V., Esther-Rodriguez-Rosas M., Ling S., Bos A., Ferrucci L., Wainer I.W.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 2007, str. 1001-1007
- [64] Taibi G., Nicotra C.M.A.: *J Chromatogr. B*, 780, 2002, str. 261-267
- [65] Baue A., Faist E. Fry D.E.: *Multiple Organ Failure: Pathophysiology, Prevention, and Therapy*, Springer, 2000
- [66] Weiss G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Werner E.R., Werner-Felmayer G., Semenitz E., Dierich M.P., Wachter H.: *FEBS Lett.*, 321, 1993, str. 89-92
- [67] Murr C., Fuchs D., Gössler W., Hausen A., Reibnegger G., Werner E.R., Werner-Felmayer G., Esterbauer H., Wachter H.: *FEBS Lett.*, 338, 1994, str. 223-226
- [68] Heales S.J.R., Blair J.A., Meinschad C., Ziegler I., *Cell. Biochem. Funct.*, 6, 1988, str. 191-195
- [69] de Castro M.R., Di Marco G.S., Arita D.Y., Teixeira L.C., Pereira A.B., Casarini D.E.: *J. Biochem. Biophys. Methods*, 59, 2004, str. 275-83
- [70] Schroecksnadel K., Winkler Ch., Fuchs D.: *J. Biochem. Biophys. Methods*, 66, 2006, str. 99-100
- [71] Werner E.R., Bichler A., Daxenbichler G., Fuchs D., Fuith L.C., Hausen A., Hetzel H., Reibnegger G., Wachter H.: *Clin. Chem.*, 33/1, 1987, str. 62-66
- [72] Slayzk W.E., Spierto F.W.: *Clin. Chem.*, 36/7, 1990, str. 1364-1368
- [73] Hibiya M., Teradaira R., Sugimoto T., Fujita K., Nagatsu T.: *J. Chromatogr. B*, 672, 1995, str.143-148
- [74] Mansilla A.E., Meras I.E., Salinas F.: *Chromatographia*, 53, 2001, str. 510-514
- [75] Turgan N., Habif S., Parildar Z., Özmen D., Mutaf I., Erdener D., Bayindir O.: *Clin. Biochem.*, 33, 2001, str. 271-275
- [76] Carru C., Zinellu A., Sotgia S., Serra R., Usai M.F., Pintus G.F., Pes G.M., Deiana L.: *Biomed. Chromatogr.*, 18, 2004, str. 360-366

- [77] Wachter H., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Weiss G., Werner E.R., Werner-Felmayer G.: Neopterin – Biochemistry-Methods-Clinical Application, Walter de Gruyter, 1992, kap. 1-2, str. 1-31
- [78] Nagatsu T., Sawada M., Yamaguchi T., Sugimoto T., Matsuura S., Akino M., Nakazawa N., Ogawa H.: Anal. Biochem., 141, 1984, str. 472-480
- [79] Webové stránky: www.brahms.de, prosinec 2008
- [80] Webové stránky: www.ibl-hamburg.com, prosinec 2008
- [81] Murr C., Widner B., Wirleitner B., Fuchs D.: Curr. Drug Metab., 3, 2002, str. 175-187
- [82] Schroecknadel K., Fischer B., Schennach H., Weiss G., Fuchs D.: Drug Metabolism Letters, 1, 2007, str. 166-171
- [83] Citová I., Havlíková L., Urbánek L., Solichová D., Nováková L., Solich P.: Anal. Bioanal. Chem, 388, 2007, str. 675-681
- [84] Hausen A., Fuchs D., König K.: J Chromatogr, 227, 1982, str. 61-70
- [85] Solichová D.: Klinické využití metody HPLC pro stanovení liposolubilních vitaminů a neopterinu - disertační práce, Hradec Králové, 2003, str. 72-78
- [86] Solichová D., Melichar B., Klejna M., Jurašková B., Královská L., Bláha V., Žďánský P., Zadák Z.: Talanta, 60, 2003, str. 459-465
- [87] Melichar B., Kalábová H., Krčmová L., Urbánek L., Hyšpler R., Malířová E., Solichová D.: Anticancer Res., 27, 2007, str. 4397-4402
- [88] Melichar B., Urbanek L., Krcmova L., Kalabova H., Svobodova I., Dragounova E., Vesely P., Hyspler R., Solichova D.: Pteridines, 17, 2006, str. 145-153
- [89] Melichar B., Kalabova H., Urbanek L., Malirova E., Solichova D.: Pteridines, 18, 2007, str. 1-7
- [90] Melichar B., Urbanek L., Krcmova L., Kalabova H., Melicharova K., Malirova E., Hornychova H., Ryska A., Hyspler R., Solichova D.: Anticancer Res., 28, 2008, str. 2389-2396
- [91] Melichar B., Solichová D., Svobodová I., Urbánek L., Melicharová K.: Pteridines, 17, 2006, str. 20-24
- [92] Melichar B., Solichová D., Svobodová I., Urbánek L., Veselý P., Melicharová K.: Tumori, 92, 2006, str. 318-322
- [93] Kalabova H., Dvorak J., Hyspler R., Ticha A., Krcmova L., Urbanek L., Solichova D., Melichar B.: Pteridines, 18, 2007, str. 95-100

- [94] Melichar B., Hyspler R., Kalabova H., Urbanek L., Krcmova L., Solichova D.:
Pteridines, 19, 2008, str. 19-22