

# 1. ÚVOD

Kolorektální karcinom zůstává více než dvě generace významným problémem české populace. Od roku 1960 stoupá výskyt tohoto onemocnění a v posledních letech zaujímá vedoucí postavení ve světových statistikách. Onemocnění je však přes veškeré mýty dobře léčitelné za předpokladu, že je diagnostikováno v časném stádiu nemoci. Pro léčbu pokročilého kolorektálního karcinomu se ve většině případů používá oxaliplatin, lék ze skupiny platinových organokomplexů, které se začaly uplatňovat při léčbě nádorů poprvé v 60. letech 20. století. Oxaliplatin je za více než čtyřicetiletou historii těchto léčiv teprve třetí látkou v pořadí, které se podařilo uplatnit v klinické praxi. Na rozdíl od svých předchůdkyň, cisplatiny a karboplatiny, má podstatně nižší vedlejší účinky a odlišnou farmakokinetiku. Přes zjevný benefit při léčbě onkologických pacientů se terapeutické monitorování oxaliplatin (jako i ostatních platinových chemoterapeutik) nedostalo do standardních monitorovacích protokolů. Proto i cílem této práce bylo zavést vhodnou metodu stanovení oxaliplatin, aby ji bylo možné rutinně používat k farmakologickému monitorování u pacientů s kolorektálním karcinomem na našem pracovišti.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (KRK) je u nás jednou z nejčastějších nádorových diagnóz. Národní onkologický registr dělí tyto nádory podle anatomické lokalizace na karcinomy tračnicku ( C18), rektosigmoideální (C19) a nádory konečníku (C20)<sup>1</sup>. Česká republika se v současné době dostává na první místo v celosvětových tabulkách v incidenci nových onemocnění<sup>2</sup>.

Bohužel, více než 60% nemocných s diagnostikovaným karcinomem tlustého střeva v České republice na toto onemocnění zemře. Přitom KRK jsou jedny z nejlépe léčitelných malignomů. Stádium nádoru v době diagnózy je pro určení další prognózy zcela zásadní. Nádory omezené na sliznici a podslizniční vrstvu jsou více než v 90% případů zcela vyléčitelné<sup>3</sup>.

Z velké většiny jsou za vznik KRK odpovědné zevní faktory (především skladba potravy). V poslední době se ukázalo, že na vzniku se uplatňují také genetické vloh<sup>3</sup>.

#### 2.1.1 Etiopatogeneze

Vznik kolorektálního karcinomu je mnohoetapový proces s vrozenými a získanými změnami genetické výbavy. V důsledku těchto změn dochází k poruchám buněčného cyklu, nekontrolované buněčné proliferaci, poruchám přirozeného buněčného zániku buněk (apoptózy) a vzniku nádoru<sup>4</sup>. Naprostá většina KRK vzniká ve střevě z adenomů, většinou z adenomových polypů<sup>5</sup>.



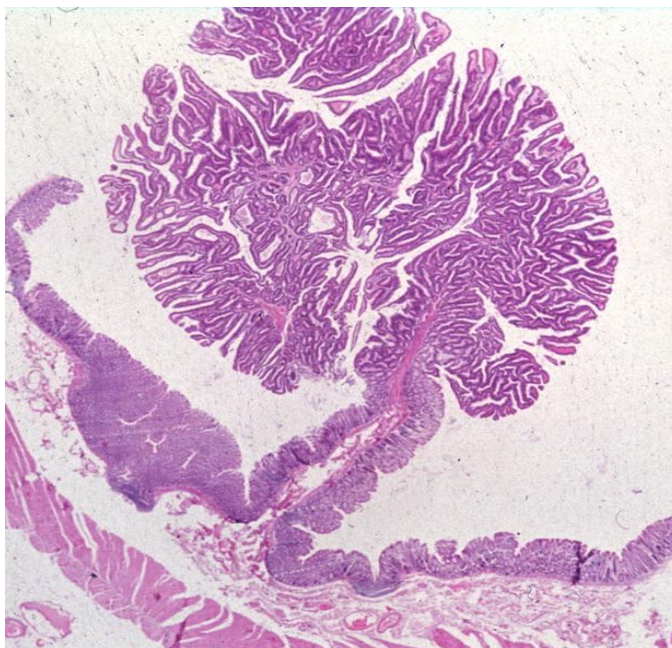
Obrázek 1: **Stopkatý polyp** (převzato z URL: <[http://www.nih.gov/news/research\\_matters/september2008/images/colonoscopy\\_1.gif](http://www.nih.gov/news/research_matters/september2008/images/colonoscopy_1.gif)> [cit. 2009-23-2])

Adenom je benigní intramukózní nádor epitelového původu lokalizovaný v jakékoliv části střeva. Mikroskopicky se adenom svým vzhledem blíží normální sliznici střeva, ale odlišuje se od ní různým stupněm atypií. Dysplazie epitelu je charakterizována cytologickými a strukturálními změnami sliznice tlustého střeva (přítomností nezralých buněk, ztrátou produkce hlenu, hypercelularitou, hyperchromazií, mitotickou aktivitou ve všech částech epitelových krypt)<sup>2</sup>.

Adenomový polyp je klinický termín označující útvar prominující do lumina střeva, spojený se sliznicí tenkou stopkou. Podle typu patologické změny v koncové části polypu se rozlišují polypy nenádorové a nádorové, které se rozlišují histologickým vyšetřením. Podle histologické struktury se adenomy dělí na tubulární, tubulovilózní a vilózní<sup>2</sup>.

Velikost polypu, histologická struktura a stupeň dysplazie jsou hlavní kritéria pro posuzování maligního potenciálu adenomu. Větší polypy, přítomnost vilózních změn a vyšší stupeň dysplazie jsou spojeny s vyšším rizikem maligní přeměny polypu<sup>5</sup>.

KRK vznikají ve sliznici a postupně prorůstají střevní stěnou do okolních struktur a infiltrují lymfatické a krevní cévy. Tímto způsobem se mohou dostat až ke vzdáleným orgánům<sup>6</sup>. Vzdálenými metastázami jsou postiženy především játra, plíce, peritoneum, vaječníky<sup>7</sup>. Hloubku nádorové invaze do stěny střeva diagnostikujeme pomocí CT. Vzdálené metastázy diagnostikujeme pomocí abdominální ultrasonografie a rentgenového snímku plic, případně upřesňujeme pomocí tomografie nebo magnetické rezonance<sup>6</sup>.



Obrázek 2: **Histologická stavba polypu** (převzato z URL: <<http://www.integrativebiology.ox.ac.uk/images/polyp.jpg>> [cit. 2009-23-2])

### 2.1.2 Klinický obraz

Nebezpečí KRK spočívá v tom, že může probíhat poměrně dlouho skrytě a manifestovat se až v pokročilém stádiu. Symptomatologie KRK závisí na lokalizaci, velikosti a makroskopické formě, v pokročilém stádiu též na rozsahu postižení dalších orgánů a celkové odezvě organismu<sup>8</sup>.

V počátku jsou všechny KRK asymptomatické, jedinou známkou jejich přítomnosti je okultní krvácení. Některé nádory působí i později tak malé obtíže, že jim nemocní nevěnují pozornost a první známkou pokročilého nádoru je až akutní stav<sup>8</sup>.

Klinické příznaky se liší podle lokalizace nádoru:

- Nádory tračnicku – projevují se anémií, slabostí, hubnutím, nevolností, bolestí břicha a melénou
- Nádory v oblasti kolondescendes – projevují se střídáním zácpy a průjmů, kolikovitou bolestí břicha
- Nádory rekta – projevují se tenesmy, tj. nutkání na stolicí, kdy dochází k malému úniku stolice s příměsí krve nebo hnisu

KRK může být příčinou náhlé příhody břišní, jako je perforace tlustého střeva a rozvinutý ileus<sup>1</sup>. V některých případech se KRK projeví až při metastázách<sup>8</sup>.

### 2.1.3 Prevence

Předpokládá se, že výživa má jednu z nejdůležitějších úloh v etiologii KRK. Příznivá změna životního stylu by mohla snížit incidenci KRK až o 50%. Z tohoto důvodu je doporučováno udržení optimální hmotnosti, dostatečná fyzická aktivita a úprava skladby potravy<sup>6</sup>.

Uskutečnily se stovky studií, jejichž závěrem je, že riziko vzniku karcinomu zvyšuje nadměrný příjem energie, tuku, častá konzumace červeného masa a nadměrný příjem alkoholu. Riziko snižuje dostatečný příjem ovoce a zeleniny, vlákniny a konzumace bílého masa (hlavně ryb)<sup>4,9</sup>.

### 2.1.4 Screening

Screening KRK je definován jako vyšetření asymptomatických osob na přítomnost nádoru ve střevě<sup>5</sup>. Screening hraje významnou roli pro časnou diagnostiku KRK. V současné době se používá:

- Test na okultní krvácení – vychází ze skutečnosti, že adenomové polypy a počínající KRK vylučují malé množství krve do stolice, která se detekuje chemickými metodami. Provádíme tedy test na přítomnost okultního krvácení. Test spočívá ve vyšetření tří po sobě následujících vzorků stolice. Je-li vzorek stolice nanesen na testovací kartu impregnovanou chromogenem, objeví se po přidání detekčního činidla modré zbarvení. Podstata barevné změny je pseudoperoxidázová aktivita hemoglobinu obsažená ve stolici postižených osob<sup>2, 5, 6</sup>.
- Sigmoidoskopie – provádí se od 50 let věku 1x za 5 let
- Kolonoskopie - provádí se v 55 letech; vyšetření se při negativním výsledku opakuje v 65 letech
- Dvojkontrastní irrigografie
- Virtuální (CT) kolonografie
- Genetické vyšetření stolice<sup>6</sup>

V běžné populaci by měl být screening KRK zahájen ve věku 50 let. U osob s rodinnou anamnézou KRK je doporučováno tuto hranici posunout na 40 let, kdy je riziko podobné jako v populaci o 10 let vyšším<sup>5</sup>.

### 2.1.5 Prognóza

Prognóza nemocných s KRK závisí na klinickém stádiu, respektive na pokročilosti onemocnění v době prvního záchytu<sup>1</sup>. KRK je onemocnění dobře léčitelné za předpokladu, že je diagnostikováno v časném stádiu nemoci<sup>8</sup>. Obecně je prognóza u nádorů omezených na střevní sliznici velmi příznivá. U karcinomů pronikajících do svaloviny a k seróze lze očekávat 30% šanci recidiv onemocnění, ať již lokálně, nebo ve formě vzdálených metastáz<sup>1</sup>.

Při srovnání lokalizací mají karcinomy konečníku zřetelně horší prognózu než karcinomy tlustého střeva, vyjádřenou 10-15% rozdílem v dlouhodobém přežití<sup>8</sup>.

Nepříznivými prognostickými faktory jsou zejména nízký stupeň diferenciacie nádoru, známky invaze do cév, aneuploidní DNA profil, ale také perforace stěny střeva nádorem nebo pooperační kontaminace dutiny břišní materiálem otevřeného nádoru<sup>1</sup>.

Dalším důležitým faktorem je, zda jsou postiženy lymfatické cévy metastázami. U histologicky negativních lymfatických uzlin se uvádí 5leté přežívání až 90%, ale postižení

lymfatických uzlin metastázami se přežití snižuje až na 50%<sup>10</sup>. U pacientů s metastázami ve vzdálených orgánech je procento přežití jen velmi nízké<sup>2</sup>.

Předoperační hodnoty CEA korelují s velikostí primárního nádoru a stupněm postižení uzlin, proto je v celé řadě studií hodnocen jako nezávislý prognostický faktor. Hodnoty CA 19-9 korelují poměrně výrazně s výskytem distančních metastáz. Obecně jsou vysoké předoperační hodnoty považovány za nepříznivý prognostický faktor. Stanovení předoperačních hodnot má dále význam pro posouzení léčebné odpovědi po primární terapii a možné určení reziduálního nádoru ve srovnání s hladinami pooperačními<sup>2</sup>.

### **2.1.6 Léčba**

V počátečním stádiu, kdy se zhoubné buňky nachází pouze na slizničních polypech, lze řešit toto stádium pouhým odstraněním polypu. Pokud se již v oblasti stopky polypu nádorové buňky nenachází, je léčba považována za dostatečnou. Prorůstá-li nádor do stěny tlustého střeva, provádí se resekce<sup>11</sup>.

Jestliže nádor prorůstá celou stěnou tlustého střeva nebo postihuje lymfatické uzliny, provádí se radioterapie a chemoterapie<sup>11</sup>.

Radioterapie nachází uplatnění především u nádoru konečníku. U těchto nádorů zajišťuje redukci lokálních recidiv a dokonce prodloužení přežití<sup>1, 8, 11</sup>. U nádorů tlustého střeva má omezený význam, především pro nežádoucí vliv na okolní tkáň, které nejsou dostatečně radiosenzitivní<sup>8</sup>.

Úkolem chemoterapie je zlikvidovat nádorovou populaci dříve, než vzniknou klinicky manifestní metastázy. Pro léčbu pokročilého KRK se užívá 5-fluoruracil s leukovorinem. Po vyčerpání účinnosti nastupuje kombinační schéma s 5-fluoruracilem, leukovorinem a oxaliplatinou. Dále se kombinuje týdenní vysokodávkové podání 5-fluoruracilu, leukovorinu s irinotecanem<sup>2</sup>.

Pacienti by měli být po léčbě KRK v pravidelných intervalech sledováni, jako u jiných onkologických onemocnění. Cílem sledování je časná diagnóza relapsu. Vyšetření se neliší od prvotních vyšetření (laboratorní vyšetření tumorózních markerů, sonografie jater, rtg plic, CT břicha, kolposkopie, irrigografie)<sup>7, 8</sup>.

## 2.2 Cytostatika

Cytostatika tlumí zejména růst tkání s vysokou proliferační rychlostí. Protože se nádorově zvrhlá tkáň většinou dělí obzvláště rychle, cytostatika ji také nejvíce postihují. Společně s ní však trpí i zdravé tkáně s vysokou frekvencí buněčného dělení a vznikají nežádoucí účinky<sup>12</sup>.

Velmi výhodné je rozdělení cytostatik podle mechanismu účinku:

a) Léčiva poškozující DNA:

- kovalentní vazbou na DNA
- uvolněním reaktivní platiny nebo jiných kovů
- interkalací
- inhibicí topoizomerázy

b) Látky ovlivňující syntézu DNA:

- inhibice syntézy stavebních jednotek DNA
- zabudování falešných stavebních jednotek DNA

c) Látky působící interkalací s mikrotubuly (s mitotickým vřeténkem):

- inhibice polymerizace tubulinu
- tvorba nenormálních mikrotubulů a inhibice depolymerizace

d) Látky ovlivňující regulační pochody organismu (př.: hormony, interferony, interleukiny, monoklonální protilátky)

e) Látky působící dalšími mechanismy<sup>12</sup>

## 2.3 Platinová cytostatika

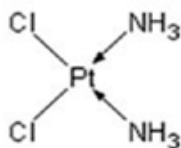
Za posledních čtyřicet let bylo syntetizováno mnoho platinových léků, ale pouze 3 byly u nás schváleny ke klinickému užívání (cisplatina, karboplatina, oxaliplatina). Tyto léky působí protinádorovými účinky vazbou na DNA. Po navázání na buněčnou DNA dochází k apoptóze (buněčné programované smrti). Apoptóza je vykonána sledem cysteinových proteáz. Dochází k mitochondriální disfunkci a DNA fragmentaci<sup>13</sup>.

Mitochondriální porucha zahrnuje:

- přeměnu pórů a jejich propustnosti
- uvolnění cytochromu c
- potlačení buněčného dýchání
- rozvrat elektrochemického potenciálu<sup>13</sup>

### 2.3.1 Cisplatina

Koncem šedesátých let byla do klinické praxe zavedena cisplatina, neboli cis-diamindichlorplatnatý komplex.



**Obrázek 3: Chemická struktura cisplatiny** (převzato z Fabrik I., Kukačka J., Průša R., Eckschlager T., Adam V., Kizek R./ Metalothionein a jeho klinický význam)

Tento komplex vytváří adukty platina-DNA. Není zcela jasné, zda cytotoxický efekt nesouvisí s vazbou cisplatiny k jinému cílovému místu v buňce – k nějakému proteinu nebo RNA.<sup>14</sup>



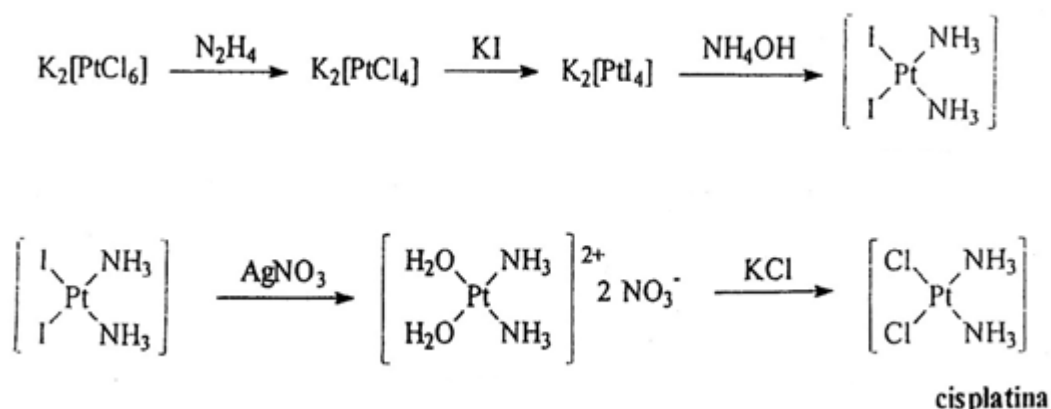
### 2.3.1.1 Objev cisplatiny

Účinky nejznámějšího platinového cytostatika (cisplatiny) byly objeveny náhodou, když Rosenberg a van Camp zkoumali vliv elektrického proudu na kolonii mikroorganismů (*Escherichia coli*)<sup>15</sup>.

Pokus prováděli takovým způsobem, že do nádoby s bakteriemi v živné půdě ponořili dvě platinové elektrody, mezi které vložili napětí. Výsledkem bylo zastavení dělení bakteriálních buněk. Byli přesvědčeni o tom, že tento jev je způsoben vlivem elektrického proudu. Avšak dalšími pokusy bylo zjištěno, že jako faktor zodpovědný za tento jev jsou platinové koordinační sloučeniny, které vznikly při elektrických dějích na platinových elektrodách<sup>16</sup>.

Pracovní hypotézu, že i dělení jiných rychle se dělících buněk, například buněk nádorových, by mohlo být zastaveno koordinačními komplexy, se podařilo prokázat i při klinickém zkoušení<sup>16</sup>.

### 2.3.1.2 Syntéza cisplatiny



Obrázek 4: Schéma syntézy cisplatiny (převzato z Hampl F., Paleček J/Farmakochemie)

Výchozí hexachlorplatičitan draselný se nejprve zredukuje hydrazinem na tetrachlorplatnatan draselný a poté se provede série výměn ligandů v koordinační sféře  $\text{Pt}^{2+}$ . Reakcí s jodidem draselným se připraví tetrajodoplatnatan draselný a následně působením vodného amoniaku diamokomplex. Z tohoto komplexu se reakcí s dusičnanem stříbrným připraví diamodiaquokomplex. Poslední výměnou ligandů (vody za chloridové ionty) vznikne cisplatin<sup>17</sup>.

### 2.3.1.3 Využití cisplatiny

Cisplatina je jedním z nejužívanějších protinádorových léků. Je vysoce účinná při léčbě tumorů varlat a vaječníků. V kombinaci s jinými cytostatiky je dosahováno velmi uspokojivých výsledků při léčbě karcinomu plic, močového měchýře, nádory v oblasti hlavy a krku<sup>1, 18</sup>, děložního čípku, nehodgkinovského lymfomu a osteosarkomu<sup>1</sup>.

Přes nesporně velký úspěch při léčbě rakoviny, je aplikace cisplatiny spojena s řadou omezení. Jde především o relativně úzké spektrum nádorů, které jsou k tomuto cytostatiku citlivé. Například nejčastěji se vyskytující nádory tlustého střeva a prsu, jsou vůči působení cisplatiny jen velmi málo citlivé. Při podávání tohoto cytostatika se také objevují velmi vážné vedlejší účinky<sup>16</sup>.

Dalším omezujícím faktorem je, že ve vodném roztoku dochází k hydrolyze, zejména při alkalickém pH. Její rychlost může omezit vyšší koncentrace chloridových iontů. Proto se doporučuje podávat cisplatinu s infuzí fyziologického roztoku<sup>1</sup>.

Kromě hydrolyzy může ve vodném roztoku docházet k přeměně cisplatiny na trans-isomer, který je silně mutagenní. Tyto pochody může urychlit světlo, a proto je nutné chránit přípravné roztoky před přímým světlem<sup>1</sup>.

### 2.3.1.4 Mechanismus účinku cisplatiny (a dalších platinových komplexů)

Prvním krokem při studiu molekulárních mechanismů chemoterapeutik je určení jejich cílového místa působení v buňkách. Hlavním cílovým místem farmakologického působení platinových cytostatik je DNA<sup>14, 15, 16, 18</sup>.

Úspěšnost komplexů platiny usmrcovat nádorové buňky je dána schopností těchto komplexů vázat se koordinační vazbou k bázím v DNA a vytvářet v ní různé typy kovalentních můstků<sup>16</sup>.

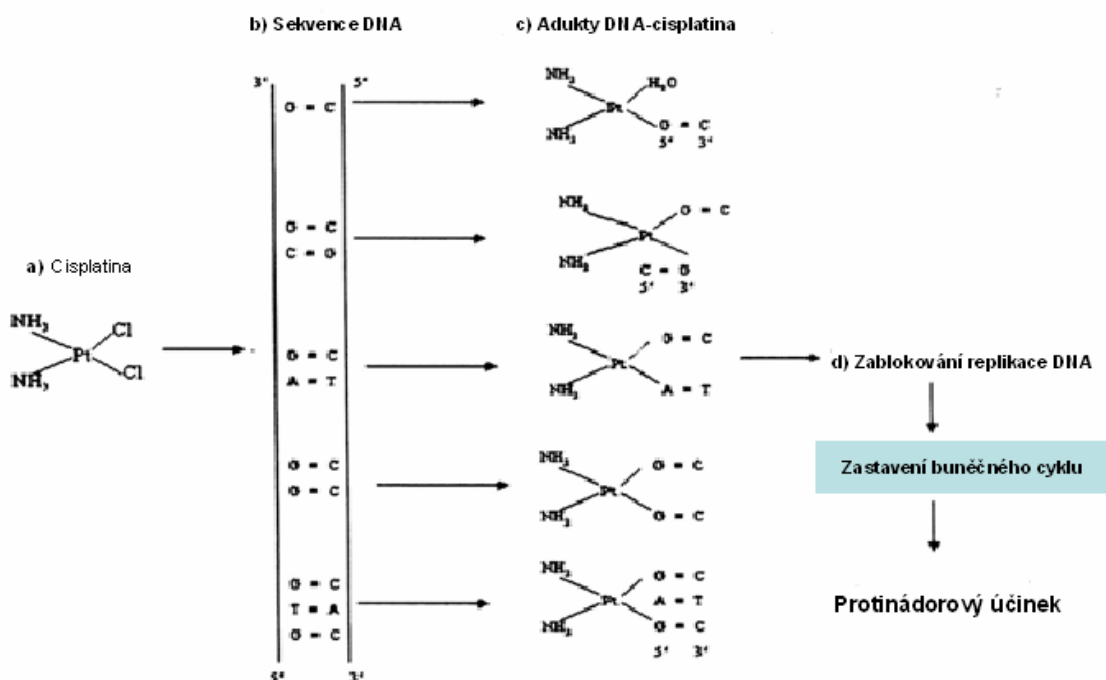
Před tím, než se cisplatina naváže na DNA musí dojít k aktivaci. Dochází k hydrolyze a k odštěpení chloridových iontů. Takto aktivovaná cisplatina je již schopná reagovat s purinovými bázemi<sup>14, 15, 18</sup>.

Nejčastěji se vyskytujícím můstkem, který v DNA vytváří cisplatina, je můstek spojující dvě bezprostředně sousedící báze v jednom řetězci DNA, přednostně zbytky guaninu. Tyto můstky výrazným způsobem ovlivňují strukturní a další fyzikální vlastnosti DNA. Například tvorba tohoto můstku je spojena s odvinutím dvojité šroubovice o 32° směrem do jejího velkého žlábků, narušením

vodíkových vazeb v párech bází spojených můstkem cisplatinu, dále se úzký žlábek DNA v místě naproti tomuto můstku rozšíří a stane se mělkým<sup>16</sup>.

Další důležitou vlastností těchto můstků je jejich schopnost zastavovat v místech jejich vzniku replikaci DNA, při které jsou před rozdělením buňky syntetizovány nové molekuly DNA<sup>16</sup>.

Při poškození DNA cisplatinou je okamžitě aktivován proces vedoucí k jeho opravě. Nejčastěji jde o tzv. excizní nukleotidovou opravu, během které je poškozené místo vystřiženo a nahrazeno novým fragmentem DNA. Tato oprava by ale vedla ke ztrátě cytostatického efektu. Pro protinádorový efekt je ale důležité, aby poškození DNA, bránící její replikaci, přetrvával co nejdelší dobu<sup>16</sup>.



**Obrázek 5:** Schéma protinádorového účinku platinových cytostatik (převzato z Kizek R., Vacek J., Adam V., Vojtěšek B./ Vztah metalothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě)

### 2.3.1.5 Cisplatinová rezistence

Výrazným omezením cisplatinu je její rezistence, kdy nádorové buňky, původně k cisplatině citlivé, se po opakované léčbě cisplatinou stávají vůči jejímu působení rezistentní<sup>16</sup>.

Vzniklý adukt DNA-cisplatina je chyba v primární struktuře DNA. Proti takovým chybám se organizmus brání a má vypracovaný mechanismus, jak tyto struktury opravovat (mutátorové geny)<sup>14</sup>. Mechanizmy buněčné obrany se dají rozdělit do tří skupin:

- transport cisplatinu mimo buňku
- vazba cytostatika intracelulárními thioley
- oprava poškozené DNA<sup>15, 19</sup>

Pokud jsou tyto opravné mechanismy v buňkách vyřazeny z činnosti, dochází k vazbě cisplatinu na DNA<sup>14, 20</sup>. Metalothionein (MT) spolu s glutathioneinem je schopen navázat cisplatinu svými –SH skupinami a tím buňku učinit neškodnou<sup>15, 19</sup>.

Ze získaných experimentálních dat vyplývá, že mutátorové proteiny velmi intenzivně ovlivňují protirakovinovou léčbu. V okamžiku, kdy se v organizmu objeví externě podaný kov (protinádorové léčivo), dojde k rychlému nárůstu MT koncentrace. Exprimovaný MT začne okamžitě vyvazovat podávané protirakovinové léčivo. Výsledkem je prudký pokles koncentrace léčiva a jeho množství se stane biologicky velmi málo účinné<sup>14, 20</sup>.

Z výše uvedených důvodů, je potřeba přistupovat k léčbě cytostatiky individuálně a nasadit co nejdříve léčbu<sup>15, 19</sup>.

V buňkách rezistentních k cisplatině kultivovaných v přítomnosti tohoto cytostatika byl skutečně prokázán vysoký obsah MT<sup>15, 19</sup>.

### **2.3.1.6 Vedlejší účinky cisplatinu**

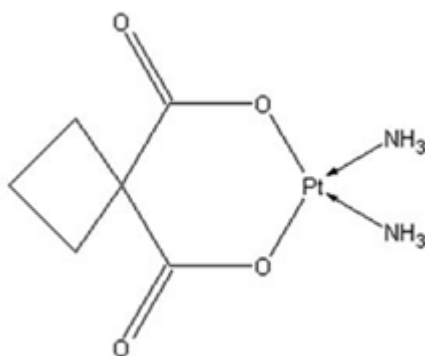
Dalším omezujícím faktorem při užívání cisplatinu jsou její vedlejší toxické účinky. Jedná se hlavně o nefrotoxicitu, ototoxicitu, nevolnost a zvracení, neurotoxicitu.

- Nefrotoxicita – cisplatina způsobuje tubulární nekrózu. Snižuje totiž metabolickou aktivitu mitochondrií tubulárních buněk, inhibuje glutathionperoxidázu a stimuluje lipoperoxidaci. Poškozuje tak buněčné membrány, DNA a intracelulární proteiny a působí nekrózu tubulárních buněk. Při mírnějším poškození je v popředí ztráta schopnosti ledvin resorbovat magnesium. Hypomagnesemie může být tedy časnou známkou poškození ledvin cisplatinou. Nefrotoxicitu se snažíme snížit dostatečným přívodem tekutin a udržováním alkalické reakce moči. Před podáním infuze cisplatinu se začíná s prehydratací (500-1000 ml 5% glukózy nebo

fyziologického roztoku po dobu 1-2 hodin). Následuje podání infuze cisplatiny. Po vykapání infuze s cisplatinou se podá 100 ml 15% roztoku manitolu k navození forsírované diurézy a nakonec následuje posthydratace 500 ml fyziologického roztoku<sup>1</sup>.

- Ototoxicita (poškození sluchu) – postiženy jsou zřejmě zevní vlasové kochleární buňky. Výskyt je přímo závislý na kumulativní dávce cisplatiny, terapie je zcela neúčinná. Proto se doporučuje při podávání cisplatiny sledovat audiogram<sup>1</sup>.

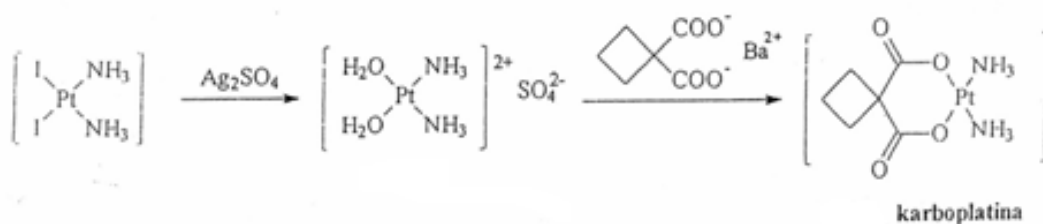
### 2.3.2 Karboplatina



**Obrázek 6: Chemická struktura karboplatiny** (převzato z Kizek R., Vacek J., Adam V., Vojtěšek B/Vztah metalothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě)

Karboplatina, neboli cis-diaminocyklobutyldikarboxylát-platnatý komplex, patří k derivátům druhé generace, jejíž syntéza byla motivována snahou omezení nefrotoxicity cisplatiny<sup>1</sup>.

#### 2.3.2.1 Syntéza karboplatiny



**Obrázek 7: Schéma syntézy karboplatiny** (převzato z Hampl F., Paleček J./Farmakochemie)

Karboplatina se připravuje analogicky jako cisplatina. Diamokomplex se reakcí se síranem stříbrným převede na diamodiaquokomplex, který reakcí s baryum-1,1-cyklobutandikarboxylátem poskytne karboplatinu<sup>17</sup>.

#### **2.3.2.2 Využití karboplatiny**

Tento chemoterapeutický lék je užíván hlavně při léčbě nádorů varlat, močového měchýře, nádorů oblasti hlavy a krku<sup>18</sup>.

Karboplatina se podává nitrožilně, bez nutnosti hydratace<sup>21</sup>.

Nacházíme zde nižší toxické účinky než u cisplatiny, což vysvětluje její nízkou reaktivitu s metalothioneinem a glutathioneinem<sup>13</sup>.

Její nevýhodou je, že vykazuje zkříženou rezistenci s cisplatinou<sup>18, 22, 23</sup>.

#### **2.3.2.3 Mechanismus účinku**

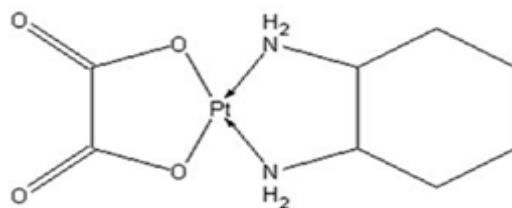
Mechanismus účinku je stejný jako u cisplatiny, avšak aktivace molekuly probíhá pomaleji<sup>12</sup>. Karboplatina tvoří podobné spektrum DNA aduktů jako cisplatina, odlišující se pouze svojí sekvenční preferencí<sup>18, 24</sup>.

Dalším rozdílem je nižší reaktivita karboplatiny. Toto chemoterapeutikum se podává v koncentraci o 2 řády vyšší než u cisplatiny<sup>18, 25</sup>.

#### **2.3.2.4 Vedlejší účinky**

Nežádoucími účinky se karboplatina od cisplatiny liší, má slabší nefrotoxické, ototoxické i emetogenní účinky. Terapii však limituje poškození kostní dřeně, zejména trombocytopenie<sup>12</sup>.

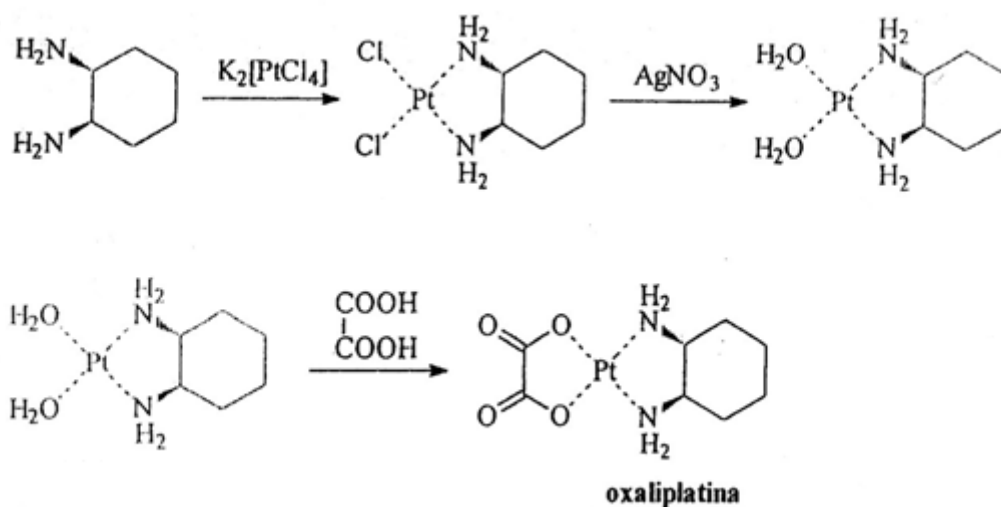
### 2.3.3 Oxaliplatina



**Obrázek 8: Chemická struktura oxaliplatiny** (Fabrik I., Kukačka J., Průša R., Eckschlager T., Adam V., Kizek R./ Metalothionein a jeho klinický význam)

Oxaliplatina, neboli cis-diaminocyklohexyl-platnatý komplex, je dalším cisplatinovým analogem, který byl schválen ke klinickému užívání v Asii, Evropě a Americe<sup>18</sup>. Je to platinový derivát třetí generace, kde je atom platiny vázán v komplexu s 1,2-diaminocyklohexanem a s oxalátovou skupinou<sup>1</sup>.

#### 2.3.3.1 Syntéza oxaliplatiny



**Obrázek 9: Schéma syntézy oxaliplatiny** (převzato z Hampl F., Paleček J./Farmakochemie)

Oxaliplatina se připravuje z tetrachloroplatnatanu draselného a cyklohexan-1,2-diaminu. Vzniklý dichlorokomplex se dusičnanem stříbrným převede na diaquo komplex. Ten reakcí s kyselinou šťavelovou poskytne oxaliplatinu<sup>17</sup>.

### 2.3.3.2 Využití oxaliplatin

Oxaliplatina je účinná v podobných indikacích jako cisplatina a karboplatina, ale na rozdíl od těchto léků je také účinná u kolorektálního karcinomu, který prozatím představuje její základní indikaci, a to převážně u nemocných s metastatickým onemocněním<sup>26</sup>.

Oxaliplatina nemá zkříženou rezistenci s cisplatinou<sup>18</sup>.

### 2.3.3.3 Mechanismus účinku oxaliplatin

Podobně jako u jiných derivátů platiny je mechanismem cytotoxického účinku oxaliplatin tvorba kovalentních vazeb mezi bázemi DNA (především uvnitř vláken, ale i mezi vlákny). Mechanismus, který způsobuje po tvorbě kovalentních vazeb platiny a DNA apoptózu buňky, je však pravděpodobně odlišný v případě cisplatin a karboplatin. Zatímco cisplatina má cytotoxické účinky pouze v případě přítomnosti intaktních genů odpovědných za reparaci DNA, oxaliplatina působí toxicky i na buňky s defektem těchto genů<sup>26, 27</sup>. Defekt výše uvedených genů je častý u KRK, proto je u tohoto nádoru cisplatina neúčinná<sup>26</sup>.

### 2.3.3.4 Farmakologické vlastnosti oxaliplatin

Farmakokinetické vlastnosti volné Pt v plazmě po podání oxaliplatin jsou trifázické, charakterizovány krátkou počáteční distribuční fází a dlouhou terminální eliminační fází ( $T_{1/2} = 252\text{--}273$  hod.)<sup>28</sup>.

Při podávání oxaliplatin v dávkách  $130\text{ mg/m}^2$  každý třetí týden, nebo  $85\text{ mg/m}^2$  každý druhý týden nebyla pozorována žádná akumulace<sup>28</sup>.

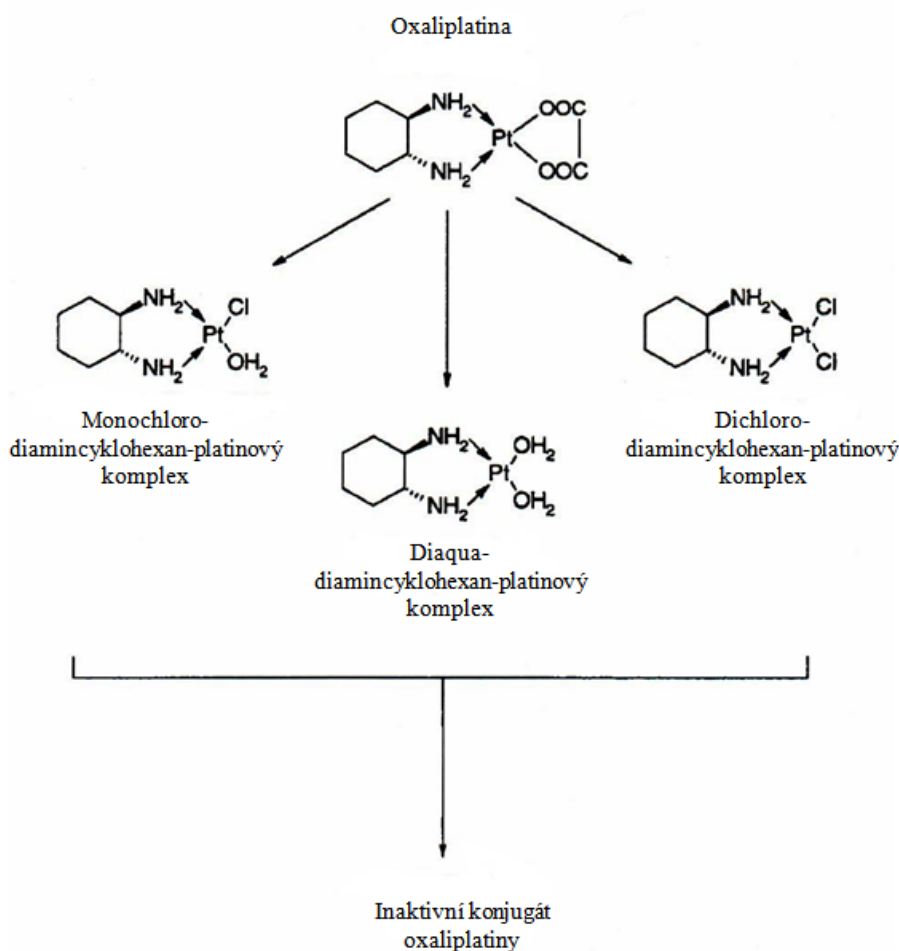
Interindividuální a intraindividuální variabilita při působení Pt ( $AUC_{0-48}$ ) je malá až nízká 33% a 5%<sup>28</sup>.

V krvi se Pt váže ireverzibilně na plazmatické proteiny (především na sérový albumin) a erytrocyty. Akumulace Pt v krevních buňkách nebyla shledána jako klinicky významná. Pt je z plazmy rychle odstraňována kovalentní vazbou na tkáň a renální eliminací. Exkrece močí ( $53,8 \pm 9,1\%$ ) je hlavní cesta eliminace Pt z těla. Fekální exkrece se podílí na eliminaci Pt pouze  $2,1 \pm 1,9\%$  z celkové dávky 5 dnů po podání. Vazba na tkáň a vylučování ledvinami rovnoměrně přispívají ke clearanci ultrafiltrabilní Pt z plazmy. Renální clearance Pt významně koreluje se stupněm glomerulární filtrace, což poukazuje na to, že glomerulární filtrace je zásadní mechanismus zodpovědný za vylučování Pt



ledvinami. Clearance ultrafiltrabilní Pt je nižší u pacientů s mírným renálním postižením, nicméně žádná významná nefrotoxicita spojená s podáváním léků zatím nebyla popsána. Vliv některých zhoršených renálních funkcí na clearanci a toxicitu Pt je stále neznámý. Faktory, jako je věk, pohlaví a zhoršené jaterní funkce, neměly na clearanci ultrafiltrabilní Pt žádný význam. Úprava dávky, vzhledem k těmto spolučinitelům, není nutná<sup>28</sup>.

Oxaliplatina podstupuje rychlou a extenzivní neenzymatickou biotransformaci. Neúčastní se enzymatických biotransformačních mechanismů, které jsou spojené s cytochromem p450. U pacientů, kterým byla podávána oxaliplatina, bylo v plazmě popsáno více než 17 metabolitů s obsahem Pt. Tyto metabolity zahrnovaly některé cytotoxické molekuly včetně monochloro-, dichloro- a diaquadiamincyklohexan platinové komplexy spolu s jinými cytotoxickými molekulami. Oxaliplatina *in vitro* neinhibuje izoenzymy cytochromu p450<sup>(28)</sup>.



**Obrázek 10: Neenzymatická biotransformace oxaliplatinu** (převzato z Graham M. A., Lockwood G. F., Greenslade D., Brienza S., Bayssas M., Gamelin E./Clinical Pharmacokinetics of Oxaliplatin: A Critical Review)

V experimentech *in vitro* se neprokázalo, že by některé jiné látky dovedly vytěsnit Pt z plazmatických proteinů. Zároveň nebyly pozorované významné farmakokinetické interakce mezi oxaliplatinou, 5-fluorouracilem a irinotecanem. Tyto výsledky poukazují na to, že aditivní a synergické antitumorové vlastnosti těchto látek nejsou vyvolány změnami v působení léku a jejich zvýšená účinnost se spíše přisuzuje mechanickým interakcím<sup>28</sup>.

Z všech těchto uvedených farmakologických vlastností je oxaliplatina zatím nejbezpečnějším a nejúčinnějším platinovým cytostatikem používaným v klinické praxi<sup>28</sup>.

### 2.3.3.5 Vedlejší účinky oxaliplatiny

Toxický profil je odlišný od cisplatiny či karboplatin. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem oxaliplatiny je neurotoxicita, která je však reverzibilní<sup>26, 29</sup>.

U oxaliplatiny rozlišujeme neurotoxicitu akutní a kumulativní senzorigickou neuropatii<sup>26, 30, 31</sup>.

#### ➤ Akutní, přechodná neurotoxicita

Akutní neurotoxicita oxaliplatinou nastane téměř u všech léčených pacientů. Toxicita má rychlý počátek, který se objevuje již během podávání nebo hodinu po infuzi. Příznaky jsou zvláštní v tom, že je často způsobuje nebo zhoršuje vystavení se chladu. Mohou se objevit projevy distální senzorigické a motorické toxicity. Senzorigická část se skládá z parestézie a dysestézie v distálních partiích, nebo v oblasti kolem úst. Asi u 1–2 % pacientů se nachází dysestézie v oblasti hltanu a hrtanu, kterou vyvolává chlad, a která způsobuje pocit ztíženého dýchání. Tyto senzorigické příznaky se občas vyskytují spolu s motorickými příznaky, které zahrnují tetanické křeče a dlouhotrvající svalové kontrakce<sup>31</sup>.

Akutní motorická toxicita, která se objevuje při podávání oxaliplatiny, se přirovnává k neuromyotonii a k otravě tetrodotoxinem a ethylenglykolem, kde mechanismem je zřejmě hyperexcitabilita motorických neuronů<sup>31</sup>.

#### ➤ Chronická, kumulativní senzorigická neuropathie

Kumulativní senzorigická neurotoxicita se manifestuje postupně úměrně se zvyšující se kumulativní dávkou oxaliplatiny. Chronickou neurotoxicitu lze pozorovat u 10–15% pacientů, jimž byly podány kumulativní dávky 780–850 mg/m<sup>2</sup>. Příznaky mají primárně podobu dysestézií (u kterých není souvislost s chladem) a parestézií v končetinách. Tyto příznaky jsou velmi podobné příznakům při toxicitě cisplatin, ačkoliv ototoxicita je u oxaliplatiny vzácná. Mezi jednotlivými cykly příznaky většinou přetrvávají a jsou intenzivnější při kumulativní

dávce. Nakonec se může objevit zhoršené vnímání, senzorická ataxie a nedostatečná koordinace jemné motoriky. Příznaky mohou být tak silné, že omezují pacienty při každodenních aktivitách<sup>31</sup>.

Důležité je, že tyto příznaky vymizí u většiny pacientů během 6 – 12 měsíců od ukončení terapie. Průměrný čas zotavení je 13 týdnů<sup>31</sup>.

### **2.3.3.6 Markery poškození nervové tkáně**

V běžné laboratorní diagnostice je používáno několik markerů poškození nervové tkáně, kterých by mohlo být využito i při vyšetření neurotoxického poškození z různých příčin. Jejich diagnostické parametry jsou naměřeny na oblast tumorů nebo traumat.

#### **2.3.3.6.1 Neuron-specifická enoláza (NSE)**

NSE byla poprvé popsána Moorem a Mc Gregorem v roce 1965. Molekulová hmotnost NSE činí 78 kDa a její biologický poločas života je pravděpodobně více než 20 hodin<sup>32</sup>. NSE je marker poškození neuronů.

Dimer NSE sestává ze dvou podjednotek  $\gamma$  nebo z podjednotek  $\alpha$  a  $\gamma$  a je charakteristický pro nervové a neuroendokrinní buňky<sup>33</sup>.

NSE je lokalizována v cytoplazmě neuronů<sup>31</sup>, ale je přítomna i v erytrocytech a v krevních destičkách a může se z nich uvolňovat. Proto je nutné krev po odběru co nejrychleji zpracovat a separovat z ní sérum nebo plazmu, aby nedošlo k hemolýze a rozpadu krevních destiček<sup>33</sup>. Hemolýza může být častá příčina falešně pozitivních výsledků<sup>32</sup>.

NSE je užitečná pro monitorování pacientů s neuroendokrinními tumory, obzvláště s malobuněčným plicním nádorem a s neuroblastomem. Z ostatních nádorů se vyšší hodnoty nachází jen u metastazujících seminomů a metastazujícího karcinomu ledviny, u nemetastazujících seminomů a u ostatních nádorů nepředstavují zvýšené hodnoty více než 40%<sup>33</sup>.

Hodnoty NSE vyšší než 17  $\mu\text{g/l}$  jsou považovány za patologické.

#### **2.3.3.6.2 S-100B protein**

Tento protein byl poprvé popsán v roce 1965 Moorem<sup>32</sup>. Protein S-100B dostal svůj název podle zvláštní vlastnosti – je totiž rozpustný i ve 100 % nasyceném roztoku síranu amonného, což je mezi proteiny naprostá výjimka<sup>32,33</sup>. S-100B protein je marker poškození glií.

Tyto proteiny jsou skupina malých  $\text{Ca}^{2+}$  vázajících modulačních proteinů s molekulovou hmotností okolo 21 kDa<sup>32</sup>. Fyziologicky se nalézá zejména v nervové tkáni<sup>33</sup>.

S100 je směs podobných proteinů složených ze dvou imunologicky rozlišitelných jednotek, které se kombinují ve variantách  $\alpha\alpha$  (S-100a<sub>0</sub>),  $\alpha\beta$  (S-100a) a  $\beta\beta$  (S-100b). Izoformy  $\alpha\beta$  a  $\beta\beta$  jsou predominantně přítomny v astroglích CNS. Biologický poločas S-100B je přibližně 1 hodina<sup>32</sup>.

Jako nádorový marker je neocenitelný při monitorování pacientů s maligním melanomem, u nichž též funguje jako nezávislý prognostický faktor. Velmi dobře koreluje s klinickým stagingem a časně detekuje klinicky němé metastázy. Tento protein nachází své uplatnění též u diagnostiky traumatického poškození mozku<sup>33</sup>.

Hodnoty S-100B vyšší než 0,110  $\mu\text{g/l}$  jsou považovány za patologické.

#### 2.3.3.6.3 Neurofilamenta

Neurofilamenta jsou nejčetnější proteiny neuronů. Při poškození neuronů se uvolňují ve velkém množství. V důsledku jejich četnosti jsou relativně snadno detekovatelné. Nález těchto proteinů svědčí jednoznačně pro neuronální poškození<sup>34</sup>.

Neurofilamenta jsou tvořena třemi jednotkami: NF-L, NF-M a NF-H<sup>34</sup>.

Neurofilamenta jsou markerem poškození axonů neuronů.

#### 2.3.3.6.4 Méně využívané markery poškození nervové tkáně

- Fibrilární kyselý protein (GFAP)
- Myelinový bazický protein (MBP)
- Protein c-tau
- Matrixové metaloproteinázy<sup>32</sup>

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo:

- Zavedení a validace metody pro stanovení oxaliplatinu pomocí bezplamenové AAS v biologických materiálech
- Stanovit koncentraci oxaliplatinu v různém biologickém materiálu u pacientů během chemoterapeutické léčby kolorektálního karcinomu
- Vyšetřit některé diagnostické markery poškození nervové tkáně u pacientů léčených oxaliplatinou

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Soubor osob

Základní soubor pacientů, od kterých byl získán biologický materiál k experimentům, byl tvořen 8 jedinci s diagnózou kolorektálního karcinomu (6 mužů, věkový průměr 67 let  $\pm$  4; 2 ženy, věkový průměr 57 let  $\pm$  8). Pacienti byli léčeni podle terapeutického protokolu FOLFOX-4 (kombinovaná chemoterapie oxaliplatinu, leukovorinu a 5-fluorouracilu)<sup>37</sup>.

Pacientům byla první den podána infuze, která sestává z 85 mg/m<sup>2</sup> oxaliplatinu a 200 mg/m<sup>2</sup> leukovorinu. Infuze byla dvouhodinová. Po dokapání infuze bylo bolusově aplikováno 400 mg/m<sup>2</sup> 5-fluorouracilu. Následovala 22 hodinová infuze 600 mg/m<sup>2</sup> 5-fluorouracilu. Proces byl opakován dva po sobě jdoucí dny. FOLFOX-4 se podává v maximálně dvanácti cyklech. Materiál byl získán od pacientů v různých cyklech terapie<sup>37</sup>.

### 4.2 Přístroje

#### 4.2.1 Měřicí přístroje

Varian SpectrAA GF 220 Z	Varian, Austrálie
Cobas e411	Roche, Japonsko
Tecan Sunrise	Tecan, Rakousko

#### 4.2.2 Další používaná laboratorní zařízení

Vortexový mixer	IKA, Německo
Magnetické míchadlo	IKA, Německo
Automatické pipety (2-20, 20-200, 100-1000 $\mu$ l)	Finnpipette, Finsko
Centrifuga	Eppendorf, Německo
Chladnička	Liebherr, Německo
Třepačka mikrodestiček RH 201	RH Plus s.r.o, ČR

## 4.3 Materiál

### 4.3.1 Chemikálie

Standardní roztok Pt 1,000 g/l (TraceCERT)	Fluka, ČR
37 % HCl (TraceCERT)	Fluka, ČR
10 % Triton X-100 Solution	Fluka, ČR
30 % AntiformA	Fluka, ČR
Argon	

### 4.3.2 Spotřební materiál

Mikrotitrační destičky (96 jamek)
Amicon Ultra (speciální kolonky pro přípravu ultrafiltrátu plazmy)
Špičky
Promývací vaničky na 1 použití
Inkubační fólie
Plastové zkumavky
Plastové cupy (vialky)
Laboratorní sklo (odměrné baňky, kádinky)

### 4.3.3 Referenční kontrolní materiály

- Referenční kontrolní materiál pro stanovení oxaliplatiny byl použit *ClinChek* firmy Recipe. Kontrola kvality byla provedena na hladině 2 (dále označována jako kontrola 3). Pro právě použitou šarži platil interval 116 – 174 µg/l.

➤ Referenční kontrolní materiál pro stanovení NSE byl použit *PC TUMOR* firmy Roche. Kontrola kvality byla provedena na dvou hladinách. Pro právě použitou šarži platilo:

- Hladina 1      10,3 ±1,74 µg/l
- Hladina 2      81,7 ±13,72 µg/l

➤ Referenční kontrolní materiál pro stanovení proteinu S100 byl použit *PC S100* firmy Roche. Kontrola kvality byla provedena na dvou hladinách. Pro právě použitou šarži platilo:

- Hladina 1      0,19 ±0,04 µg/l
- Hladina 2      2,33 ±0,49 µg/l

➤ Kontrolní materiál pro stanovení neurofilament byl součástí diagnostického setu. Kontrola kvality byla provedena na dvou hladinách, pro které platil interval:

- Hladina 1      112 – 168 pg/ml
- Hladina 2      765 – 1148 pg/ml

#### **4.3.4 Diagnostické komerční sety**

##### **4.3.4.1 Souprava pro stanovení pNF-H, ELISA; BioVendor, ČR (slouží jen pro výzkumné účely)**

1. Mikrotitrační deska, 96 jamek, s navázanou polyklonální protilátkou proti pNF-H , vakuově balená
2. Koncentrát detekční protilátky proti pNF-H (50x koncentrovaný)
3. Koncentrát HRP konjugované protilátky (50x koncentrovaný)
4. pNF-H standard, kapalný, -20 °C
5. Kontrola kvality – vysoká, kapalná (High QC), -20 °C
6. Kontrola kvality – nízká, kapalná (Low QC), -20 °C
7. Ředící roztok
8. Koncentrát promývacího roztoku (10x koncentrovaný), 100 ml, (Wash Solution Concentrate)
9. Roztok substrátu (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB), 13 ml, (Substrate TMB Solution)
10. Zastavovací roztok (0,2 M kyselina sírová), 13 ml, (Stop Solution)<sup>38</sup>



#### 4.3.4.2 Souprava pro stanovení NSE, ECLIA; Roche Diagnostics, ČR

1. Reagencie M: Mikročástice potažené streptavidinem; 6,5 ml  
Streptavidinem potažené částice 0,72 mg/ml
2. Reagencie R1: Anti-NSE-Ab~biotin; 10 ml  
Biotinylovaná monoklonální protilátka proti NSE 18E5 (myší)  
1,0 mg/l; fosfátový pufr 50 mmol/l (pH 7,2)
3. Reagencie R2: Anti-NSE-Ab~Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>; 10 ml  
Monoklonální protilátka proti NSE 84B10 (myší) značená rutheniovým komplexem 1,0 mg/l; fosfátový pufr 50 mmol/l (pH 7,2)<sup>39</sup>

#### 4.3.4.3 Souprava pro stanovení S 100, ECLIA, Roche Diagnostics, ČR

1. Reagencie M: Mikročástice potažené streptavidinem; 6,5 ml  
Streptavidinem potažené mikročástice 0,72 mg/ml
2. Reagencie R1: Anti-S100-Ab~biotin; 9 ml  
Biotinylovaná monoklonální protilátka proti S100 (myší) 1,0 mg/l;  
fosfátový pufr 50 mmol/l (pH 7,2)
3. Reagencie R2: Anti-S100-Ab~Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>; 9 ml  
Monoklonální protilátka proti S100 (myší) značená rutheniovým  
komplexem 1,0 mg/l; fosfátový pufr 50 mmol/l (pH 7,2)<sup>40</sup>

## 4.4 Metody

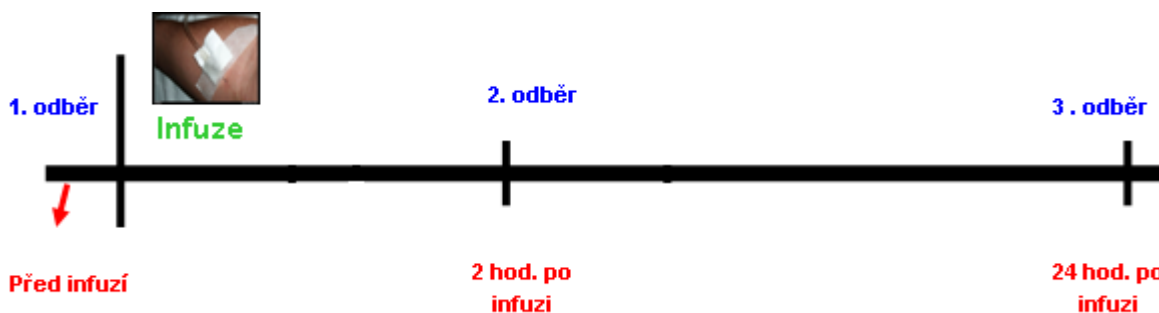
### 4.4.1 Odběr biologického materiálu, separace plazmy, příprava ultrafiltrátu plazmy

Pacientům byly odebrány vzorky krve v časových intervalech (před podáním infuze, 2 hodiny po podání infuze a 24 hodin po podání infuze). Byly použity zkumavky od firmy Vacuette s protisrážlivým činidlem (heparinem amonným). Odebraný materiál byl rozdělen na 3 části:

- Nejprve byl odpipetován 1 ml plné krve do plastových mikrozkušavek od firmy Eppendorf.
- Zbytek odebrané krve byl centrifugován (10 min při 3000 g) pro separaci plazmy.
- Příprava ultrafiltrátu plazmy (pUF) – 3 ml plazmy byly napipetovány do speciálních kolonek *Amicon Ultra* a centrifugovány 20 minut při 3000 g (eluát byl jímán do zkumavek).

Pacientům byly odebírány vzorky krve v časových intervalech:

- 1. odběr - před podáním infuze
- 2. odběr – 2 hodiny po podání infuze
- 3. odběr - 24 hodin po podání infuze



Obrázek 11: Schéma odběru krve

#### 4.4.2 Stanovení oxaliplatiny

Koncentrace oxaliplatiny byla stanovena na automatickém analyzátoru Varian SpectrAA 220Z pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací.



Obrázek 12: Atomový absorpční spektrometr s elektrotermickou atomizací (Varian SpectrAA GF 220 Z)

Atomy platiny při excitaci absorbují záření vlnové délky 265,9 nm známé intenzity, jejíž zeslabení je úměrné celkové koncentraci platiny ve vzorku. Atomizace upraveného vzorku probíhá v grafitové pídce v inertní argonové atmosféře za vysoké teploty generované elektromagnetickým polem.

#### 4.4.2.1 Příprava roztoků pro stanovení koncentrace Pt metodou AAS s elektrotermickou atomizací:

1. Pracovní mezistandard A (10 mg/l) – do 100 ml odměrné baňky (plastové) byl odpipetován 1 ml standardu Pt (Fluka 1 g/l). Ke standardu byly přidány 2 ml 37% HCl a doplněno demineralizovanou vodou po rysku. Stabilita roztoku v chladničce při 5 °C byl jeden rok.
2. Pracovní standard (600 µg/l Pt) – do 100 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 6 ml mezistandardu A. K mezistandardu A byly přidány 2 ml 37% HCl a doplněno demineralizovanou vodou po rysku. Stabilita standardu vzhledem k nízké koncentraci byla v chladničce při 5 °C cca 3 týdny (nutno skladovat v plastové nádobě).
3. Proplachovací roztok – do 500 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 2500 µl 10 % Tritonu X-100, 2080 µl 30% Antiformu A, 250 µl 37% HCl a doplněno demineralizovanou vodou po rysku.
4. Ředící roztok – do 1000 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 20 ml 10% Tritonu X-100, 2 ml 30% Antiformu A a doplněno demineralizovanou vodou po rysku.

#### 4.4.2.2 Příprava vzorků před AAS analýzou

Vzorky byly ředěny 15x, tedy k 50 µl vzorku (tj. kontroly, plné krve, plazmy, ultrafiltrátu plazmy) bylo přidáno 700 µl ředícího roztoku a důkladně promícháno na třepačce. Po homogenizaci byl připravený vzorek umístěn do speciálních plastových cupů (vialek), které se vložily do karuselu přístroje.

#### 4.4.2.3 Kalibrace a kontroly

Ke kalibraci se používá metoda kalibrační křivky. Přístroj provádí kalibraci pomocí jednoho standardu, který si do 3 bodové kalibrační křivky ředí sám. Výsledné koncentrace kalibračních roztoků byly nastaveny vzhledem k očekávanému rozsahu měřených hodnot na 150, 300 a 600 µg/l.

Kontrola kvality byla provedena komerčně dodávaným kontrolním materiálem ClinChek firmy Recipe, hladina 2 (dále označována jako kontrola 3) s cílovou hodnotou 145 µg/l (kontrolní interval 116 – 174 µg/l).

vzorek	c [ $\mu\text{g/l}$ ]	V ředícího roztoku [ $\mu\text{l}$ ]	V standardního roztoku [ $\mu\text{l}$ ]
Blank	0	20	0
standard 1	150	15	5
standard 2	300	10	10
standard 3	600	0	20

Tabulka 1: Nastavení kalibrace

#### 4.4.2.4 Nastavení přístroje

V programu Varian SpectrAA byly naprogramovány pracovní parametry metody pro stanovení Pt v biologickém materiálu.

Krok	teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	čas [s]	průtok [L/min]	typ plynu
1	65	1,0	3,0	argon
2	95	15,0	3,0	argon
3	105	20,0	3,0	argon
4	105	15,0	3,0	argon
5	120	5,0	3,0	argon
6	120	5,0	3,0	argon
7	200	10,0	3,0	argon
8	1000	5,0	3,0	argon
9	1000	10,0	3,0	argon
10	1000	2,0	0,0	argon
11	2850	0,9	0,0	argon
12	2850	1,0	0,0	argon
13	65	19,5	3,0	argon

Tabulka 2: Teplotní program pro stanovení Pt

- Lampa – byla použita speciální lampa pro stanovení Pt firmy Photron. Proud na lampě byl nastaven 5 mA.
- Monochromátor – šířka štěrbin 0,5 nm

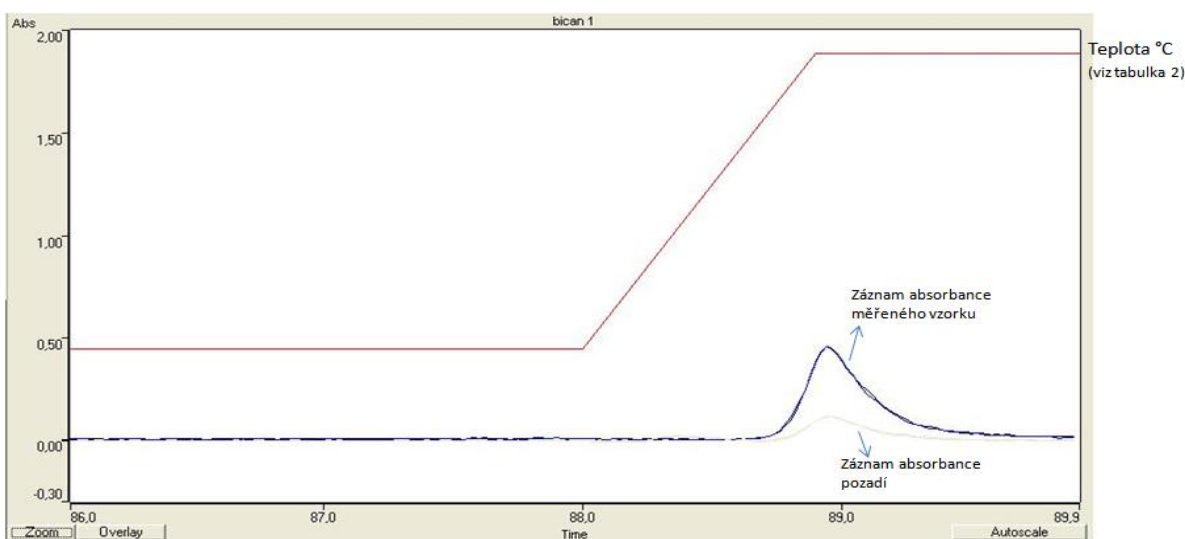
#### 4.4.2.5 Vlastní měření

Proplachovací roztok byl doplněn v nádobě pod karuselem přístroje, spuštěny všechny součásti přístroje kromě zesilovače lampy. Byla otevřena tlaková nádoba s argonem.

Pomocné roztoky a standardy byly umístěny do těchto do pozic přístrojového karuselu:

- Pozice 52 – ředící roztok
- Pozice 26 – standard
- Pozice 1 až 25 - ostatní vzorky
- Na každou 11 pozici vkládáme kontroly (po 10 vzorcích probíhá recalibrace)

Po kalibraci přístroje byly proměřeny kontrolní vzorky. Poté bylo přistoupeno k samotnému stanovení vzorků.



Obrázek 13: Ukázka záznamu měření absorbance při stanovení bezplamenovou AAS

#### 4.4.3 Stanovení pNF-H

Koncentrace neurofilament byla stanovena na fotometru Tecan Sunrise firmy Tecan. Tecan Sunrise pracuje na principu vertikální fotometrie a enzymové imunanalýzy. Jedná se o měření absorbance nebo podílu prošlého záření jamkou mikrotitrační destičky. Intenzita záření nebo absorbance jsou pak přímo nebo nepřímo úměrné výsledné koncentraci stanovovaného analytu.

Bylo použito diagnostického komerčního setu firmy BioVendor. 100 µl standardu, kontrolních materiálů a naředěných vzorků byly inkubovány 1 hodinu na mikrotitrační destičce s navázanou polyklonální protilátkou proti pNF-H (fosforylovaný neurofilament H). Po důkladném promytí promývacím roztokem, byla ke vzniklému imobilizovanému komplexu protilátka-pNF-H přidána druhá detekční králičí protilátka proti pNF-H (tedy HRP konjugát) a inkubovalo se 1 hodinu. Po inkubaci a promytí byl přidán roztok substrátu tetrametylbenzidinu (TMB). Reakce se substrátem byla inkubována 20 minut za nepřístupu vzduchu. Reakce byla zastavena přidáním kyselého zastavovacího roztoku. Fotometricky byla stanovena absorbance vzniklého žlutého roztoku při vlnové délce 450 nm. Absorbance je úměrná koncentraci pNF-H. Hodnoty pNF-H v neznámých vzorcích se stanovují z kalibrační křivky, která byla získána vynesemím absorbancí standard proti jejich známé koncentraci<sup>38</sup>.

#### 4.4.4 Stanovení NSE

Koncentrace NSE byla měřena na automatickém analyzátoru Cobas e411 firmy Roche. Cobas e411 je imunochemický analyzátor. Analyzátor je samostatnou jednotkou, která zahrnuje dávkování vzorků i reagensů, inkubaci, detekci a automatické vyhodnocení výsledků. Stanovení NSE probíhá elektrochemiluminiscenční metodou.

Metoda je založena na sendvičovém principu:

- 1. inkubace: 20 µl vzorku, biotinylovaná monoklonální protilátka proti NSE a monoklonální protilátka proti NSE, značená rutheniovým komplexem (*Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-komplex*) reagují za tvorby sendvičového komplexu.
- 2. inkubace: Po přidání mikročastic, potažených streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.
- Reakční směs je nasátá do měřicí komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem.
- Výsledky jsou vyhodnoceny z kalibrační křivky, která je specifická pro přístroj a je vytvářena na základě dvoubodové kalibrace a základní master kalibrace, dodávané v čárovém kódu reagensie<sup>39</sup>.

#### 4.4.5 Stanovení S100

Koncentrace proteinu S100 byla měřena na automatickém imunochemickém analyzátoru Cobas e411 firmy Roche (stejně jako u stanovení koncentrace NSE). Stanovení proteinu S100 probíhá elektrochemiluminiscenční metodou.

Metoda je založena na sendvičovém principu:

- 1. inkubace: 20 µl vzorku, biotinylovaná monoklonální protilátka proti S100 a monoklonální protilátka proti S100, značená rutheniovým komplexem (*Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-komplex*) reagují za tvorby sendvičového komplexu.
- 2. inkubace: Po přidání mikročastic, potažených streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.
- Reakční směs je nasátá do měřicí komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřená fotonásobičem.
- Výsledky jsou vyhodnoceny z kalibrační křivky, která je specifická pro přístroj a je vytvářena na základě dvoubodové kalibrace a základní master kalibrace, dodávané v čárovém kódu reagentie<sup>40</sup>.

### 4.5 Validace metody pro stanovení oxaliplatiny

#### 4.5.1 Opakovatelnost

Byly změřeny 3 vzorky o třech různých koncentracích v sérii 20 měření. Výsledky byly statisticky zhodnoceny (průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient).

#### 4.5.2 Reprodukovatelnost

Byly změřeny 2 vzorky o dvou různých koncentracích za podmínek reprodukovatelnosti (tj. 20 dní po sobě v singletu). Výsledky byly statisticky zhodnoceny (průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient).



### 4.5.3 Vychýlení (BIAS) metody

Bylo změřeno 20 replikátů 1 vzorku za podmínek opakovatelnosti. Výsledky byly statisticky zhodnoceny (průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient, hodnota vychýlení).

### 4.5.4 Linearita a pracovní rozsah měření

Byla připravena směs vzorků pacientů (H) o extrémně vysoké koncentraci analytu a pool vzorků pacientů o extrémně nízké koncentraci analytu (L). Smícháním obou poolů byly připraveny další tři vzorky (viz tabulka 3).

vzorek 1	L
vzorek 2	3L + 1H
vzorek 3	2L + 2H
vzorek 4	1L + 3H
vzorek 5	H

**Tabulka 3: Tabulka vzorků k validaci linearity/pracovního rozsahu**

Každý vzorek byl změřen v triplikátu. Při validaci linearity byla vyhodnocena závislost průměrů změřených hodnot (osa y) na teoretických známých (osa x). Kalibrační křivka byla vytvořena vynesáním poměru koncentrací a absorbancí.

### 4.5.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Bylo změřeno 10 vzorků blanku v sérii za podmínek opakovatelnosti. Po změření byla vypočítána hodnota meze detekce a meze stanovitelnosti:

- Mez detekce:

$$LoD = 3 \times SD$$

- Mez stanovitelnosti:

$$LoQ = 3 \times LoD$$

#### 4.5.6 Výtěžnost

Bylo vybráno 5 patientských vzorků, které neobsahují oxaliplatinu. Z každého vzorku byly připraveny 2 směsy:

- Vzorek A: 5 ml plazmy + 10  $\mu$ l standardního roztoku Pt 1,000 g/l
- Vzorek B: 5 ml plazmy + 10  $\mu$ l fyziologického roztoku

Koncentrace Pt ve vzorcích A a B byla stanovena v duplikátech.

Vyhodnocení výtěžnosti:

- Stanoví se koncentrace přídavku patientského vzorku podle vztahu:

$$Ar = \text{koncentrace přídavku} * \text{objem přídavku} / (\text{objem přídavku} + \text{objem vzorku})$$

- Změří se průměry duplikátů vzorků A a B
- Vypočtou se rozdíly mezi A a B a stanoví se průměr jejich duplikátů
- Vypočte se výtěžnost jako průměr průměr/Ar
- Vyjádří se výtěžnost v procentech:  $R\% = (\text{průměr}/Ar) * 100$

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Výsledky validace metody oxaliplatin

#### 5.1.1 Opakovatelnost

Vzorek	Kontrola 1 [µg/l]	Kontrola 2 [µg/l]	Kontrola 3 [µg/l]	Kontrola 4 [µg/l]
1	5541	3070	149	9
2	5772	2621	158	17
3	5677	3127	163	7
4	5660	3030	169	11
5	5495	2840	152	5
6	6047	2910	152	8
7	6068	3480	147	9
8	5458	3129	143	6
9	5463	2991	118	2
10	6105	3080	144	4
11	5999	2861	152	16
12	5767	2909	149	10
13	5697	3012	143	10
14	6005	3073	134	4
15	5753	3028	136	7
16	5861	3045	148	11
17	6073	3151	137	11
18	5541	3024	145	3
19	5499		145	13
20	5720		137	7
<b>Průměr</b>	<b>5760,05</b>	<b>3021,17</b>	<b>146,05</b>	<b>8,50</b>
<b>SD</b>	<b>224,54</b>	<b>172,18</b>	<b>11,02</b>	<b>4,05</b>
<b>CV</b>	<b>3,90%</b>	<b>5,70%</b>	<b>7,54%</b>	<b>47,60%</b>

Tabulka 4: Opakovatelnost při stanovení opakovatelnosti oxaliplatin

Byla provedena opakovatelnost 4 kontrolních vzorků, z nichž kontrola 1 a 2 jsou pacientské vzorky, kontrola 3 a 4 jsou komerčně dodávaný materiál. U kontroly 2 je provedeno jen 18 stanovení z důvodu nedostatku materiálu.

Pro validaci analytické metody by měla být opakovatelnost  $\pm 20\%$  pro LLOQ a  $\pm 15\%$  pro další koncentrace. Z výsledků uvedených v tabulce 4 vyplývá, že opakovatelnost v rozmezí detekce je výborná. Zatímco kontrola 4, která je mimo rozmezí detekce (viz kapitola 5.1.5) je pro kontrolu kvality nevyhovující.

### 5.1.2 Reprodukovatelnost

Vzorek	Kontrola 3 [µg/l]	Kontrola 5 [µg/l]
1	167	1889
2	170	1797
3	145	2029
4	154	1883
5	150	1746
6	162	1706
7	162	1961
8	152	1779
9	159	1960
10	143	1801
11	151	
12	151	
13	163	
14	142	
15	144	
16	162	
17	141	
18	142	
19	152	
20	144	
<b>průměr</b>	<b>152,80</b>	<b>1855,10</b>
<b>SD</b>	<b>9,16</b>	<b>105,73</b>
<b>CV</b>	<b>6,00%</b>	<b>5,70%</b>

Tabulka 5: Reprodukovatelnost při stanovení oxaliplatin

Byla provedena opakovatelnost 2 kontrolních vzorků, z nichž kontrola 3 je komerčně dodávaný kontrolní materiál a kontrola 5 je patientský vzorek. U kontroly 5 je provedeno jen 10 stanovení z důvodu nedostatku materiálu.

Pro validaci analytické metody by měla být reprodukovatelnost  $\pm 20\%$  pro LLOQ a  $\pm 15\%$  pro další koncentrace. Z výsledků uvedených v tabulce 5 vyplývá, že reprodukovatelnost je velmi dobrá.

### 5.1.3 Vychýlení (BIAS) metody

Vzorek	Kontrola 3 [µg/l]
průměr	146,05
SD	11,02
CV	7,54
BIAS	0,72

Tabulka 6: Vychýlení při stanovení oxaliplatin

Hodnoty pro výpočet vychýlení byly převzaty ze stanovení opakovatelnosti. Vychýlení bylo počítáno jen z kontroly 3, která je jedinou kontrolou deklarovanou výrobcem v rozmezí detekce (viz kapitola 5.1.5).

V dostupné literatuře bylo zjištěno, že intraindividuální biologická variabilita a interindividuální variabilita platiny jsou stanoveny  $CV_I = 18\%$  a  $CV_G = 13\%$ <sup>(28)</sup>. Z těchto údajů vyplývá, že akceptovatelná velikost vychýlení by měla být:

$$\leq 0,375 \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$$

Pro ideální vychýlení se uvádí:

$$\leq 0,125 \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$$

Naše hodnota vychýlení byla stanovena na 0,72%. Tuto podmínku tedy metoda splňuje ideálně.

### 5.1.4 Linearita a pracovní rozsah měření

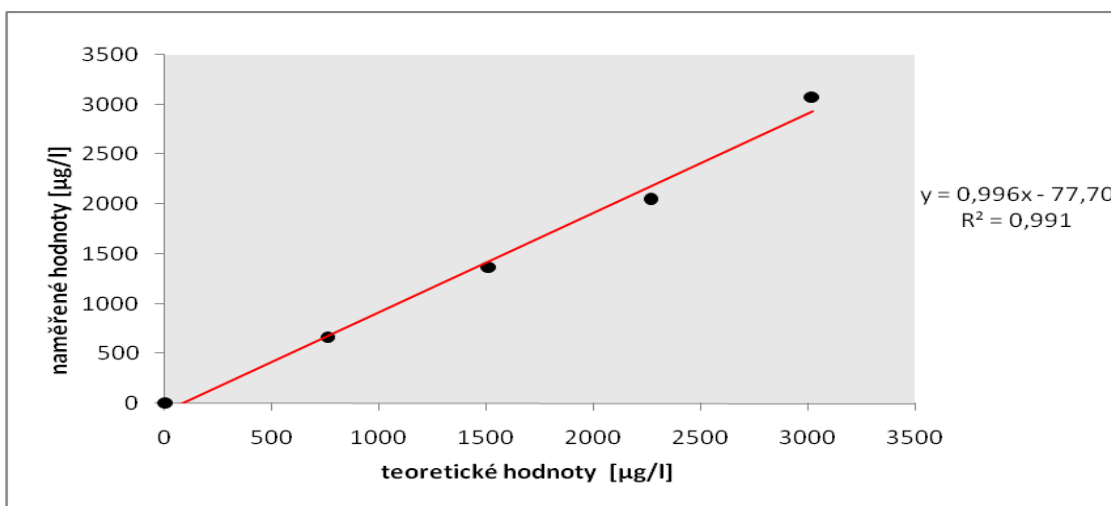
teoretická hodnota [µg/l]	průměr naměřené hodnoty [µg/l]
8,9	9
762	667
1515	1368
2268	2043
3021	3073

Tabulka 7: Tabulka výsledků linearit a pracovního rozsahu měření

Linearita byla zjištěna ze závislosti průměru třech změřených hodnot na teoretických známých hodnotách. Jako teoretická hodnota nízkého vzorku byla použita kontrola 3, která je deklarovaná

výrobce, ale je mimo rozmezí detekce (viz kapitola 5.1.5). Jako teoretická hodnota vysokého vzorku byla použita hodnota průměru opakovatelnosti kontroly 2, což je vzorek patientský (tato kontrola byla použita z důvodu nedostupnosti komerčně dostupného materiálu deklarovaného výrobcem v takovém rozsahu měření). Tyto vzorky byly postupně řaděny podle tabulky 3.

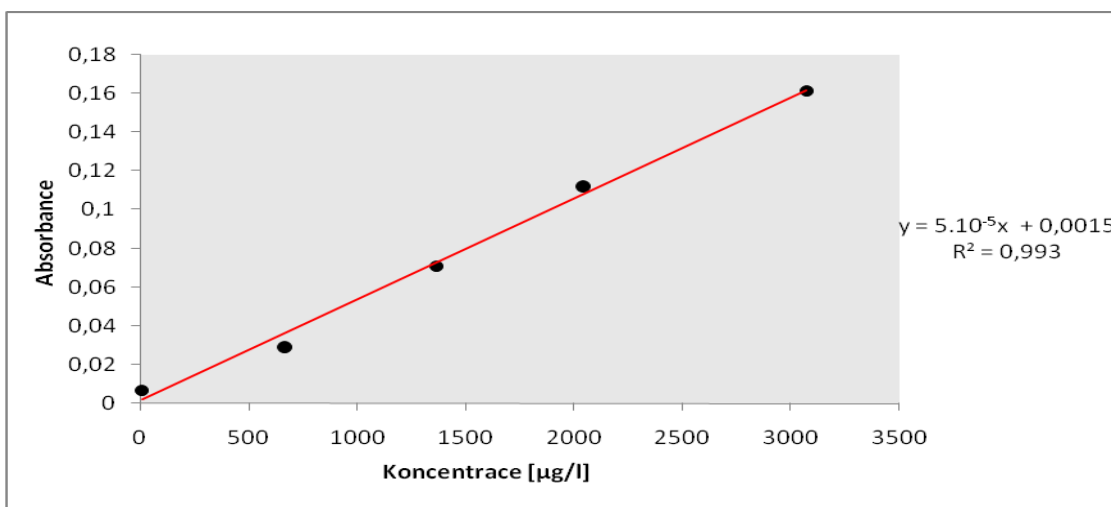
Linearita byla v daném rozsahu velmi dobrá s korelačním koeficientem 0,991.



Obrázek 14: Graf závislosti průměrů změřených hodnot na teoretických známých hodnotách

Kalibrační křivka byla vytvořena vynesemím poměru koncentrací a absorbancí. Hodnota korelačního koeficientu kalibrační křivky byla 0,993.

Obrázek 15: Kalibrační křivka oxaliplatin



### 5.1.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Vzorek	c [µg/l]
1	Nenalezen
2	Nenalezen
3	4
4	8
5	Nenalezen
6	Nenalezen
7	14
8	Nenalezen
9	8
10	10
<b>SD</b>	<b>5</b>
<b>LoD</b>	<b>15</b>
<b>LoQ</b>	<b>45</b>

Tabulka 8: Tabulka výsledků meze detekce a meze stanovitelnosti

Pro zjištění meze detekce byl použit negativní patientský vzorek. Po stanovení koncentrací 10 vzorků blanku byla mez detekce stanovena na hodnotu 15 µg/l a mez stanovitelnosti na hodnotu 45 µg/l.

### 5.1.6 Výtěžnost

Vzorek	A1	A2	B1	B2	A1-B1	A2-B2	průměr	Ar	průměr/Ar	R%
1	2233	2037	N	N	2233	2037	2135	1996	1,07	<b>106,96</b>
2	2065	2153	N	N	2065	2153	2109	1996	1,06	<b>105,66</b>
3	2273	2171	N	N	2273	2171	2222	1996	1,11	<b>111,32</b>
4	2102	2027	N	N	2102	2027	2064,5	1996	1,03	<b>103,43</b>
5	2251	2161	2	N	2249	2161	2206	1996	1,11	<b>110,52</b>

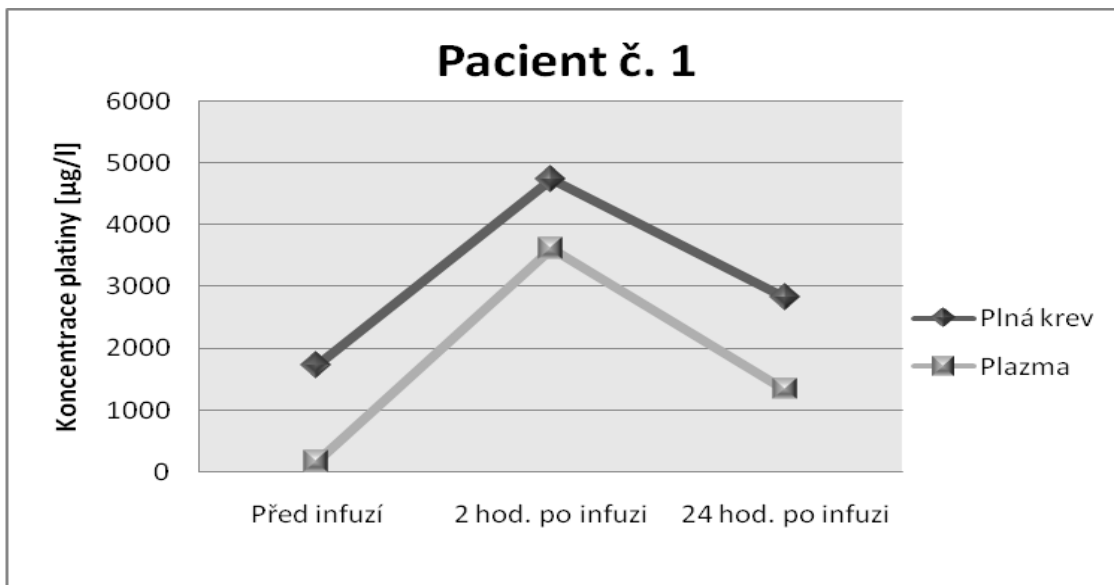
N = nenalezen

Tabulka 9: Tabulka výsledků výtěžnosti

Bylo vybráno 5 patientských vzorků, které neobsahují oxaliplatinu. Z každého vzorku byly připraveny 2 směsy (vzorek A - obsahující platinu, vzorek B - bez obsahu platiny). Koncentrace Pt ve vzorcích A a B byla stanovena v duplikátech.

Hodnota výtěžnosti by se měla blížit co nejbližší hodnotě 100%. Naše hodnota výtěžnosti činí 107,58% ± 4,1. Vyšší výtěžnost je s největší pravděpodobností způsobena vlivem matrice. Ale pro validaci analytické metody je vyhovující.

## 5.2 Terapeutické monitorování oxaliplatiny (platiny) u pacientů



Obrázek 16: Závislost koncentrace platiny na čase

Tabulka 10: Výsledné koncentrace Pt u pacienta č. 1

Pacient č. 1	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] před infuzí	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] 2 hod. po infuzi	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] 24 hod. po infuzi
<b>Plná krev</b>	1728	4740	2820
<b>Plazma</b>	168	3614	1336

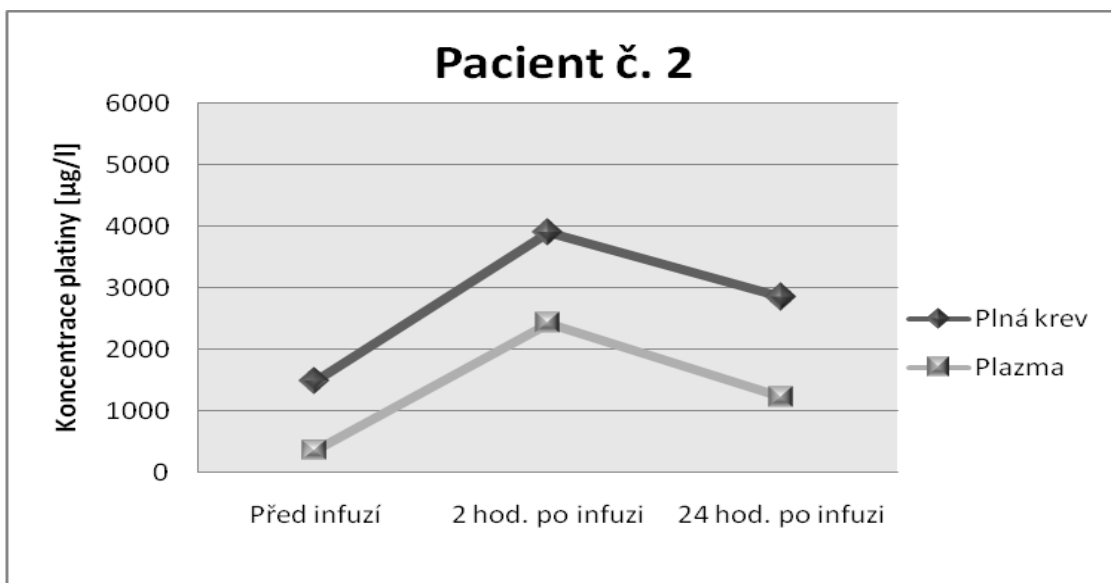
Pacient č. 1 je po osmém cyklu podávání oxaliplatiny.

Z plazmy a plné krve byla vypočítána AUC:

- AUC plné krve byla 96 096 µg/l/h
- AUC plazmy byla 62 014 µg/l/h

Z plazmy odebrané 2 hod. po infuzi byl připraven pUF a stanovena koncentrace oxaliplatiny, která byla 700 µg/l. Z toho vyplývá, že po 2 hod. bylo na proteiny navázáno 80,6% oxaliplatiny a volné (účinné) oxaliplatinu bylo jen 19,4%.





Obrázek 17: Závislost koncentrace platiny na čase

Tabulka 11: Výsledné koncentrace Pt u pacienta č. 2

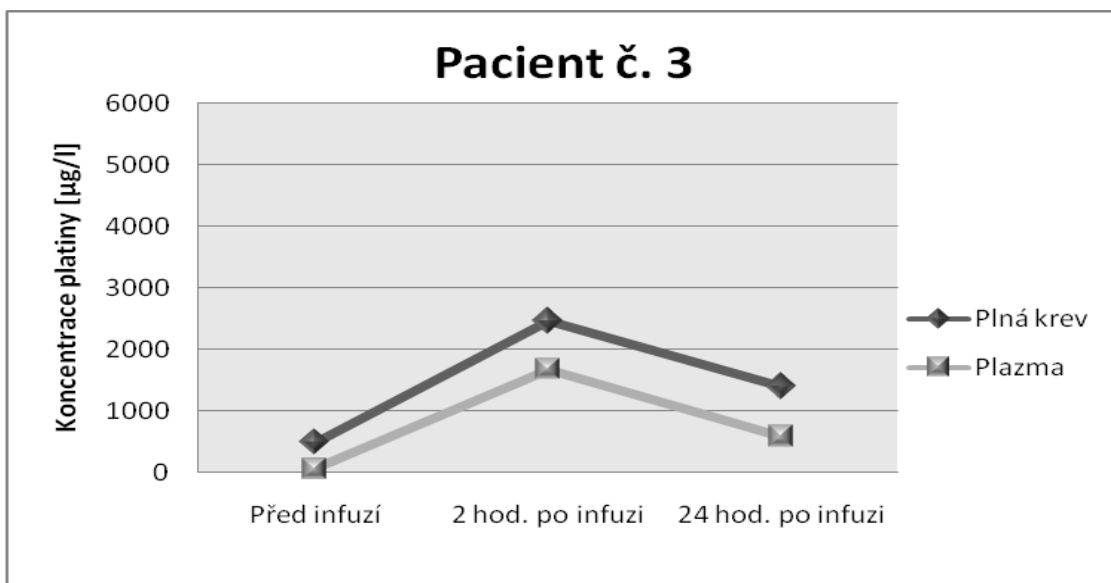
Pacient č. 2	$c$ Pt [μg/l ] před infuzí	$c$ Pt [μg/l ] 2 hod. po infuzi	$c$ Pt [μg/l ] 24 hod. po infuzi
Plná krev	1475	3889	2848
Plazma	354	2424	1218

Pacient č. 2 je po jedenáctém cyklu podávání oxaliplatiny.

Z plazmy a plné krve byla vypočítána AUC:

- AUC plné krve byla 84 835 μg/l/h
- AUC plazmy byla 45 618 μg/l/h

Z plazmy odebrané 2 hod. po infuzi byl připraven pUF a stanovena koncentrace oxaliplatiny, která byla 611 μg/l. Z toho vyplývá, že po 2 hod. bylo na proteiny navázáno 74,8% oxaliplatiny a volné (účinné) oxaliplatiny bylo 25,2%.



Obrázek 18: Závinnost koncentrace platiny na čase

Tabulka 12: Výsledné koncentrace Pt pacienta č. 3

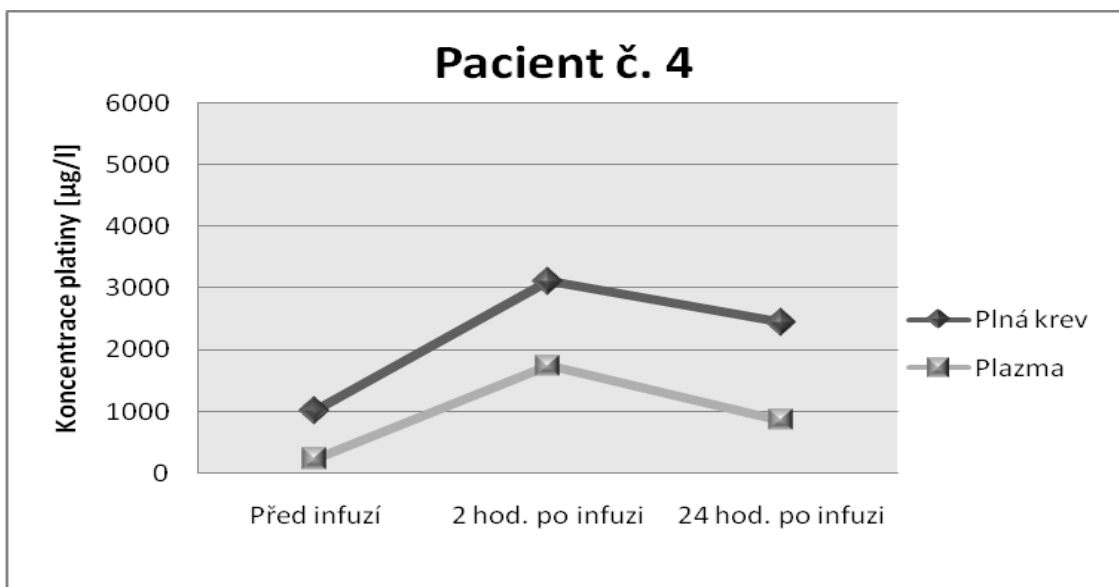
Pacient č. 3	c Pt [μg/l ] před infuzí	c Pt [μg/l ] 2 hod. po infuzi	c Pt [μg/l ] 24 hod. po infuzi
Plná krev	485	2451	1399
Plazma	53	1674	580

Pacient č. 3 je po pátém cyklu podávání oxaliplatiny.

Z plazmy a plné krve byla vypočítána AUC:

- AUC plné krve byla 48 222 μg/l/h
- AUC plazmy byla 28 248 μg/l/h

Z plazmy odebrané 2 hod. po infuzi byl připraven pUF a stanovena koncentrace oxaliplatiny, která byla 274 μg/l. Z toho vyplývá, že po 2 hod. bylo na proteiny navázáno 83,6% oxaliplatiny a volné (účinné) oxaliplatiny bylo 16,4%.



Obrázek 19: Závislost koncentrace platiny na čase

Tabulka 13: Výsledné koncentrace Pt u pacienta č. 4

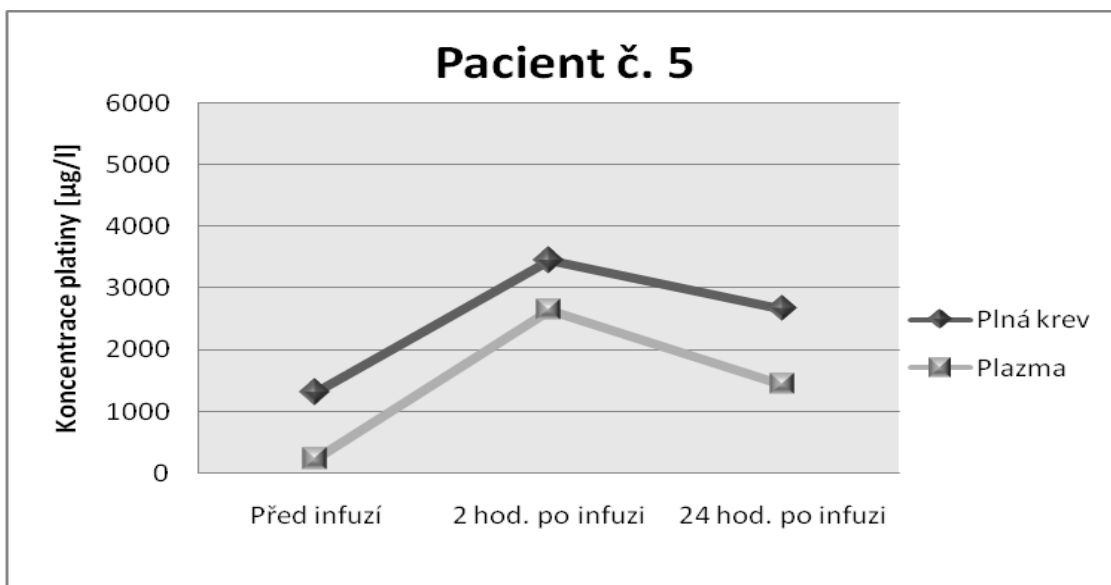
Pacient č. 4	c Pt [μg/l ] před infuzí	c Pt [μg/l ] 2 hod. po infuzi	c Pt [μg/l ] 24 hod. po infuzi
Plná krev	1017	3114	2451
Plazma	230	1738	860

Pacient č. 4 je po čtvrtém cyklu podávání oxaliplatinu.

Z plazmy a plné krve byla vypočítána AUC:

- AUC plné krve byla 69 477 μg/l/h
- AUC plazmy byla 32 514 μg/l/h

Z plazmy odebrané 2 hod. po infuzi byl připraven pUF a stanovena koncentrace oxaliplatinu, která byla 318 μg/l. Z toho vyplývá, že po 2 hod. bylo na proteiny navázáno 81,7% oxaliplatinu a volné (účinné) oxaliplatinu bylo 18,3%.



Obrázek 20: Závislost koncentrace platiny na čase

Tabulka 14: Výsledné koncentrace Pt u pacienta č. 5

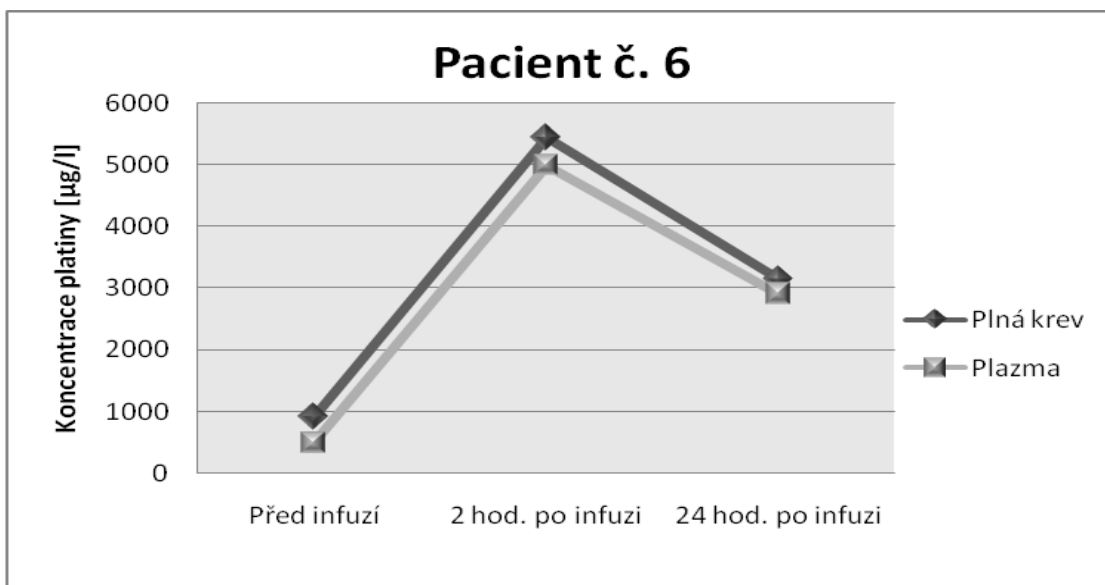
Pacient č. 5	c Pt [µg/l ] před infuzí	c Pt [µg/l ] 2 hod. po infuzi	c Pt [µg/l ] 24 hod. po infuzi
Plná krev	1313	3450	2669
Plazma	229	2650	1441

Pacient č. 5 je po šestém cyklu podávání oxaliplatiny.

Z plazmy a plné krve byla vypočítána AUC:

- AUC plné krve byla 76 835 µg/l/h
- AUC plazmy byla 50 759 µg/l/h

U tohoto pacienta koncentrace oxaliplatiny v pUF nebyla stanovena z důvodu nedostatku materiálu.



Obrázek 21: Závislost koncentrace platiny na čase

Tabulka 15: Výsledné koncentrace Pt u pacienta č. 6

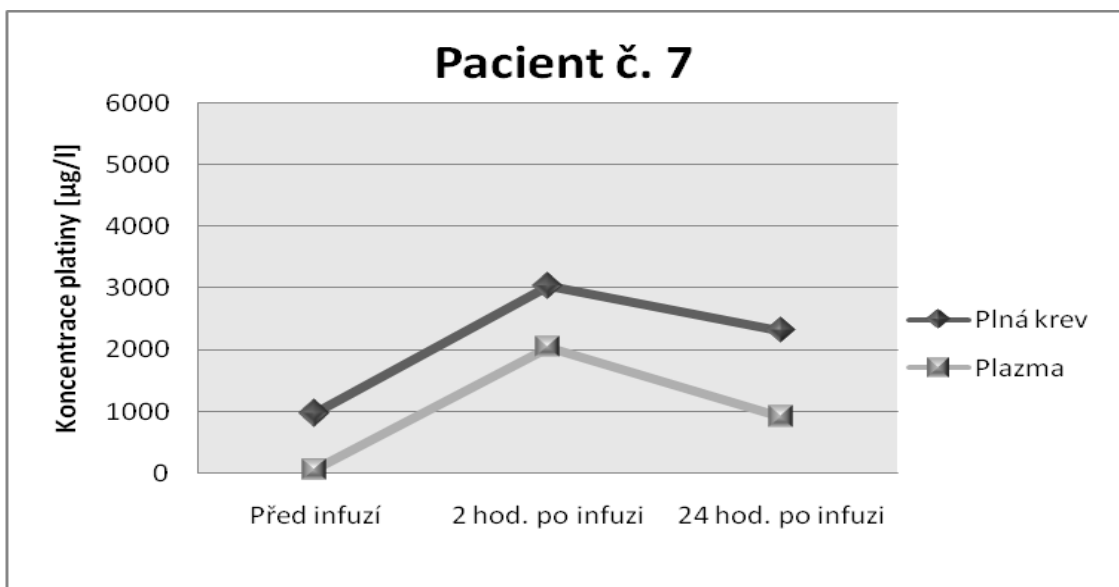
Pacient č. 6	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] před infuzí	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] 2 hod. po infuzi	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] 24 hod. po infuzi
Plná krev	910	5450	3151
Plazma	494	4991	2906

Pacient č. 6 je po desátém cyklu podávání oxaliplatiny.

Z plazmy a plné krve byla vypočítána AUC:

- AUC plné krve byla 107 331 µg/l/h
- AUC plazmy byla 97 837 µg/l/h

Z plazmy odebrané 2 hod. po infuzi byl připraven pUF a stanovena koncentrace oxaliplatiny, která byla 578 µg/l. Z toho vyplývá, že po 2 hod. bylo na proteiny navázáno 88,4% oxaliplatiny a volné (účinné) oxaliplatiny bylo 11,6%.



Obrázek 22: Závíslost koncentrace platiny na čase

Tabulka 16: Výsledné koncentrace Pt u pacienta č. 7

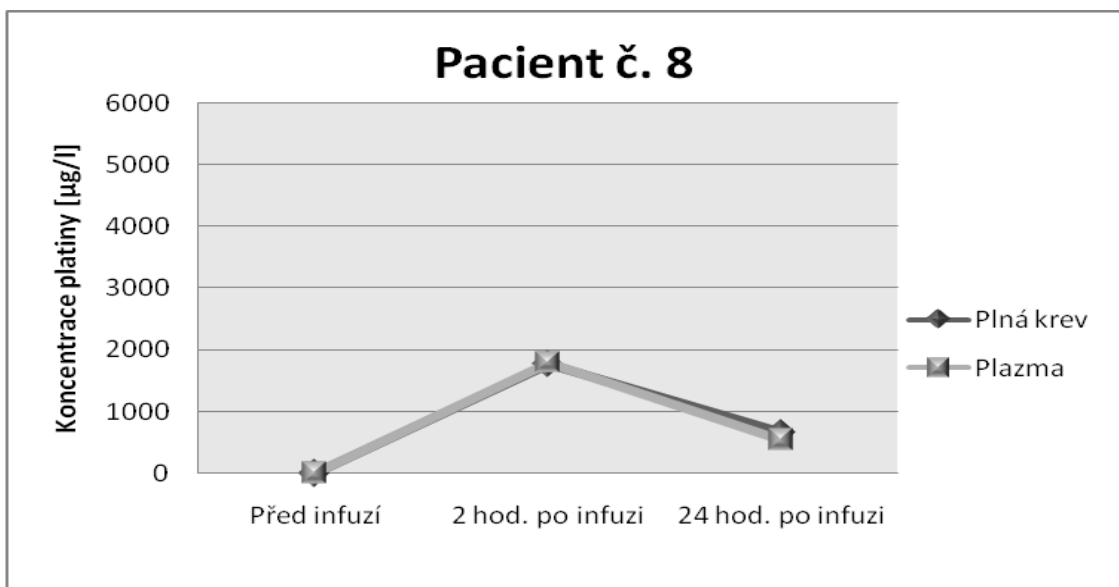
Pacient č. 7	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] před infuzí	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] 2 hod. po infuzi	$\underline{c}$ Pt [µg/l ] 24 hod. po infuzi
Plná krev	974	3041	2317
Plazma	57	2047	915

Pacient č. 7 je po sedmém cyklu podávání oxaliplatiny.

Z plazmy a plné krve byla vypočítána AUC:

- AUC plné krve byla 66 968 µg/l/h
- AUC plazmy byla 36 790 µg/l/h

Z plazmy odebrané 2 hod. po infuzi byl připraven pUF a stanovena koncentrace oxaliplatiny, která byla 330 µg/l. Z toho vyplývá, že po 2 hod. bylo na proteiny navázáno 83,9% oxaliplatiny a volné (účinné) oxaliplatiny bylo 16,1%.



Obrázek 23: Závislost koncentrace platiny na čase

Tabulka 17: Výsledné koncentrace Pt u pacienta č. 8

Pacient č. 8	c Pt [µg/l ] před infuzí	c Pt [µg/l ] 2 hod. po infuzi	c Pt [µg/l ] 24 hod. po infuzi
Plná krev	Nenalezen	1768	659
Plazma	Nenalezen	1795	541

Pacient č. 8 je po prvním cyklu podávání oxaliplatinu.

Z plazmy a plné krve byla vypočítána AUC:

- AUC plné krve byla 30 233 µg/l/h
- AUC plazmy byla 29 286 µg/l/h

Z plazmy odebrané 2 hod. po infuzi byl připraven pUF a stanovena koncentrace oxaliplatinu, která byla 194 µg/l. Z toho vyplývá, že po 2 hod. bylo na proteiny navázáno 89,2% oxaliplatinu a volné (účinné) oxaliplatinu bylo 10,8%.

## 5.3 Výsledky markerů neurotoxicity

### 5.3.1 pNF-H

Vzorek	☐ pNF-H [pg/ml] před infuzí	☐ pNF-H [pg/ml] 2 hod. po infuzi	☐ pNF-H [pg/ml] 24 hod. po infuzi
Pacient č. 1	< 65	< 65	< 65
Pacient č. 2	< 65	< 65	< 65
Pacient č. 3	< 65	< 65	< 65
Pacient č. 4	< 65	< 65	< 65
Pacient č. 5	< 65	< 65	< 65
Pacient č. 6	< 65	< 65	< 65
Pacient č. 7	< 65	< 65	< 65
Pacient č. 8	< 65	< 65	< 65

Tabulka 18: Výsledné koncentrace pNF-H

Z tabulky 18 vyplývá, že ani u jednoho pacienta nebyla nalezena vyšší koncentrace pNF-H.

### 5.3.2 NSE

Vzorek	☐ NSE [μg/l] před infuzí	☐ NSE [μg/l] 2 hod. po infuzi	☐ NSE [μg/l] 24 hod. po infuzi
Pacient č. 1	29,38	37,11	24,35
Pacient č. 2	34,39	40,84	14,99
Pacient č. 3	35,07	32,17	22,35
Pacient č. 4	25,55	14,79	12,40
Pacient č. 5	37,11	9,62	24,75
Pacient č. 6	10,34	0,15	7,07
Pacient č. 7	22,38	20,57	19,71
Pacient č. 8	14,84	27,04	15,50

Tabulka 19: Výsledné koncentrace NSE

Fyziologická hodnota NSE je 17 μg/l. Z tabulky 19 vyplývá, že téměř u všech pacientů byla stanovena vyšší koncentrace NSE. Zvýšení ale není nijak závažné, a proto ani NSE není vhodným markerem pro sledování neurotoxicity oxaliplatinu.



### 5.3.3 S100

Vzorek	c S100 [µg/l] před infuzí	c S100 [µg/l] 2 hod. po infuzi	c S100 [µg/l] 24 hod. po infuzi
Pacient č. 1	0,297	0,243	0,356
Pacient č. 2	0,094	0,122	0,083
Pacient č. 3	0,064	0,085	0,060
Pacient č. 4	0,059	0,047	0,053
Pacient č. 5	0,048	0,046	0,066
Pacient č. 6	0,149	0,063	0,056
Pacient č. 7	0,048	0,047	0,043
Pacient č. 8	0,054	0,050	0,044

Tabulka 20: Výsledné koncentrace S100

Fyziologická hodnota proteinu S100 jsou 0,110 µg/l. Z tabulky 20 vyplývá, že pouze u pacienta č. 1, 2 a 6 byly stanoveny vyšší koncentrace. A proto ani protein S100 není vhodným markerem sledování neurotoxicity oxaliplatinu.

## 6. ZÁVĚR

Byla zavedena metoda pro stanovení oxaliplatinu pomocí bezplamenové AAS v biologických materiálech (plná krev, plazma, ultrafiltrát plazmy). Metoda vykazovala výborné analytické vlastnosti. Variační koeficient opakovatelnosti a reprodukovatelnosti byl v rozmezí detekce nižší než 10%. Mez detekce byla stanovena na hodnotu 15 µg/l a mez stanovitelnosti na hodnotu 45 µg/l. Linearita je zaručena až do koncentrace 3000 µg/l. Hodnota vychýlení byla stanovena na 0,72%, hodnota výtěžnosti byla stanovena na 107,58%.

Byla sledována koncentrace oxaliplatinu v různých biologických materiálech u pacientů během chemoterapeutické léčby kolorektálního karcinomu. Bylo zjištěno, že u většiny pacientů je průměrně 57% platiny obsaženo v plazmě kromě pacienta, který je po prvním cyklu podávání oxaliplatinu. Dále bylo zjištěno, že po dvou hodinách po infuzi je volné (účinné) platiny v průměru 17%. Zdá se, že nejvhodnějším materiálem pro terapeutické monitorování oxaliplatinu je stanovení z ultrafiltrátu plazmy, ale z důvodu vysoké ekonomické náročnosti je stanovení z plazmy dostačující.

U pacientů byly vyšetřeny diagnostické markery poškození nervové tkáně – pNF-H, NSE a protein S100. Z našich výsledků vyplývá, že ani jeden z výše vyjmenovaných markerů nemá dostatečnou senzitivitu pro sledování neurotoxicity oxaliplatinu.

Monitorování koncentrace oxaliplatinu může znatelně pomoci k vytvoření individuálního terapeutického konceptu – navolit vhodné dávky a předejít nežádoucím účinkům.

## 7. LITERATURA

1. Klener P. a kol.: Klinická onkologie, Praha, Galén 2002, ISBN 80-7262-151-3
2. Holubec L. a kol.: Kolorektální karcinom - současné možnosti diagnostiky a léčby, Praha, Grada 2004, ISBN 80-247-0636-9
3. Lukáš M.: Hereditární polypózní syndromy tlustého střeva a kolorektální karcinom, *Sanquis* **16**, str. 28-31 (2001)
4. Zavoral M., Ladmanová P.: Kolorektální karcinom – Screening a dispenzarizační programy, *ČLS JEP, Doporučené postupy pro praktické lékaře*, reg.č. o/012/067
5. URL: <[www.edukafarm.cz/clanek.php?id=442](http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=442)> [cit. 2008-11-11]
6. Urban O.: Diagnostika kolorektálního karcinomu, *Onkologie* **2**, 9-11 (2008)
7. Zavoral M., Ladmanová P.: Kolorektální karcinom – diagnostika a léčba, *ČLS JEP, Doporučené postupy pro praktické lékaře*, reg.č. o/012/068
8. Jech Z., Hoch J.: Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu, *Interní medicína pro praxi* **2**, 81-84 (2004)
9. Jablonská M. a kol.: Kolorektální karcinom - časná diagnóza a prevence, Praha, Grada 2000, ISBN 80-7169-777-X
10. Penka I., Kala Z.: Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu, *Onkologie* **2**, 12-16 (2008)
11. URL: <[http://www.pfizer.cz/files/Kolorektalni\\_karcinom.pdf](http://www.pfizer.cz/files/Kolorektalni_karcinom.pdf)> [cit. 2008-11-11]
12. Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: Farmakologie a toxikologie, Praha, Grada (2004), ISBN 80-247-0836-1
13. Goodisman J., Hagrman D., Tacka K.A, Souid A.K.: Analysis of cytotoxicities of platinum compounds, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **57**, 257-267 (2006)
14. Kizek R., Vacek J., Adam V., Vojtěšek B: Vztah metalothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě, *Klinická biochemie a metabolismus* **12**, 72-78 (2004)
15. Fabrik I., Kukačka J., Průša R., Eckschlager T., Adam V., Kizek R.: Metalothionein a jeho klinický význam, *Fons* **2**, 20-22, (2008)
16. Kašpárková J., Brabec V.: Od poškození DNA k léčbě rakoviny, *Akademický bulletin Akademie věd České republiky* **10**, (2001)
17. Hampl F., Paleček J.: Farmakochemie, Praha, Vydavatelství VŠCHT 2002, ISBN 80-7080-495-5
18. Brabec V. a kol.: Antitumor activity of platinum complexes, *Advances in Cell and Molecular Biology*, 73-90 (2005)
19. Hrabeta J., Figová T., Eckschlager R., Průša R., Blastik O., Křížová S., Adam V., Cinatl J., Michaelis M., Kizek R.: *Brněnské onkologické dny XXXI*, Brno (2007)

20. Palmiter R.D.: Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **91**, 1219-1223(1994)
21. Adam Z., Vorlíček J., Sedláčková Š.: Přehled protinádorové farmakologické léčby, *Praktické lékařství* **2**, 80 (2005)
22. Kelland L.R., Farrell N.P.: *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*, Totowa, Humana Press Incorporation 2000, ISBN 0-89603-599-9
23. Lokich J.: What is the „best“ platinum: cisplatin, carboplatin, or oxaliplatin?, *Cancer Investigation* **19**, 756-760 (2001)
24. Blommaert F.A., van Dijk-Knijnenburg H.C., Dijt F.J., Engelse L., Baan R.A., Berends F., Fichtinger-Schepman A.M.: Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells, *Biochemistry* **34**, 8474-8480 (1995)
25. Vrána O., Brabec V., Kleinwächter V.: Polarographic studies on the conformation of some platinum complexes: relations to anti-tumor activity, *Anti-cancer drug design* **1**, 95-109 (1986)
26. Melichar B.: Oxaliplatina, *Farmakoterapie* **6**, 561-569 (2005)
27. Raymond E., Faivre S., Chaney S., Woynavowski J., Cvitkovic E: Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin, *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 227-235 (2002)
28. Graham M. A., Lockwood G. F., Greenslade D., Brienza S., Bayssas M., Gamelin E.: Clinical Pharmacokinetics of Oxaliplatin: A Critical Review, *Clinical Cancer Research* **6**, 1205-1218 (2000)
29. Raymond E., Chaney S.G., Taamma A, Cvitkovic E.: Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies, *Annals of Oncology* **9**, 1053-1071 (1998)
30. Gamelin E., Gamelin L., Bosii L., Quashoff S.: Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures, *Seminars in Oncology* **29**, 21-33 (2002)
31. Saif W. M., Reardon J.: Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, *Therapeutics and Clinical Risk Management* **1**, 249-258 (2005)
32. Kukačka J., Vajtr D., Lepej J., Průša R.: Biochemické markery traumatického poškození mozku, *Labor aktuell* **1**, 18-23 (2008)
33. Zima T. a spol.: *Laboratorní diagnostika*, Praha, Galén 2002, ISBN 978-80-7262-372-3
34. Shaw G., Yang C., Ellis R., Anderson K., Mickle J. P., Scheff S., Pike B., Anderson D. K., Howland D. R.: Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **336**, 1268-1277 (2005)
35. URL: <[http://www.nih.gov/news/research\\_matters/september2008/images/colonoscopy\\_1.gif](http://www.nih.gov/news/research_matters/september2008/images/colonoscopy_1.gif)> [cit. 2009-23-2]
36. URL: <<http://www.integrativebiology.ox.ac.uk/images/polyp.jpg>> [cit. 2009-23-2]

37. Petrioli R., Pascucci A., Francini E., Marsili S., Sciandivasci A., Tassi R., Civitelli S., Tanzini G., Lorenzi M., Francini G.: Neurotoxicity of FOLFOX-4 as adjuvant treatment for patients with colon and gastric cancer: a randomized study of two different schedules of oxaliplatin, *Cancer Chemother Pharmacol* **61**, 105-111 (2008)
38. Příbalové informace diagnostického komerčního setu pNF-H, BioVendor, ČR
39. Příbalové informace diagnostického komerčního setu NSE, č. 12179202001V9, Roche Diagnostics, ČR
40. Příbalové informace diagnostického komerčního setu S100, č. 12177293001V5, Roche Diagnostics, ČR

## 8. SEZNAM ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
Ar	Teoretická hodnota
AUC	Area Under Curve; plocha pod křivkou
CNS	Centrální nervový systém
CT	Computer Tomograph; počítačová tomografie
CV	Variační koeficient
CV <sub>G</sub>	Interindividuální (skupinová) biologická variabilita, vyjádřená jako variační koeficient
CV <sub>I</sub>	Intraindividuální biologická variabilita, vyjádřená jako variační koeficient
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECLIA	Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
ELISA	Enzyme-liked immunosorbent assay
GFAP	Fibrilární kyselý protein
HCl	Kyselina chlorovodíková
HRP	Křenová peroxidáza
KRK	Kolorektální karcinom
LLOQ	Lower Limit Of Quantification; spodní limit detekce
LoD	Limit of Detection; mez detekce
LoQ	Limit of Quantification; mez stanovitelnosti
MBP	Myelinový bazický protein
MT	Metalothionein
NF-H	Neurofilament Heavy Polypeptide; těžký řetězec neurofilament
NF-L	Neurofilament Light Polypeptide; lehký řetězec neurofilament

NF-M	Neurofilament Medium Polypeptide; střední řetězec neurofilament
NSE	Neuron-specifická enoláza
pNF-H	Fosforylovaná neurofilamenta typu H
Pt	Platina
pUF	Ultrafiltrát plazmy
QC	Quality Control; kontrola kvality
R	Korelační koeficient
S100	Protein S100B
SD	Směrodatná odchylka
TMB	3,3',5,5'-tetrametylbenzidin