

PENGARUH MELATONIN TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT PADA TIKUS WISTAR MODEL SEPSIS

Rizqi Indah Riani¹, Satrio Adi Wicaksono²

¹ Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

² Staf Pengajar Anestesiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang -Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang Melatonin merupakan radikal bebas yang sering digunakan sebagai antioksidan. Melatonin berperan dalam meningkatkan respon imun, dan membantu proses sitoprotektif. Dalam beberapa model hewan, melatonin telah diidentifikasi untuk membantu melawan infeksi yang disebabkan bakteri, virus, dan parasit dengan melalui berbagai mekanisme, seperti immunomodulasi atau aktivitas antioksidan. Melatonin dapat mengurangi kadar sitokin inflamasi, stress oksidatif dan disfungsi mitokondria. Melatonin merupakan salah satu obat yang dikembangkan sebagai terapi sepsis.

Tujuan Mengetahui pengaruh melatonin terhadap jumlah leukosit pada tikus wistar model sepsis dan memperoleh informasi melatonin dapat menurunkan jumlah leukosit.

Metode Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *randomized control grup pre post test*. Sampel adalah 12 ekor tikus wistar jantan dengan kriteria tertentu, dibagi secara acak menjadi 2 kelompok. Kelompok I diberi injeksi intraperitoneal lipopolisakarida (LPS) dan tidak diberi melatonin sebagai kelompok kontrol, sedangkan kelompok II diberi injeksi intraperitoneal lipopolisakarida (LPS) sebagai kelompok perlakuan dan diberi melatonin via sonde oral sebagai kelompok perlakuan. Setelah adaptasi tikus selama seminggu, pada hari ke 8 tikus diambil darahnya melalui pembuluh darah retroorbita. Uji statistik menggunakan uji *paired t-test*, *independent t-test* dan *Mann Whitney Test*.

Hasil Pada uji *independent test* didapatkan nilai rerata jumlah leukosit pada kelompok kontrol lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan. Pada uji *paired t-test* kelompok kontrol mengalami perubahan yang signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang menunjukkan hasil yang tidak bermakna. Pada uji *Mann Whitney Test* didapatkan hasil kelompok kontrol selisih pre- post1 dan post 2 mengalami peningkatan yang signifikan. Sedangkan pada kelompok perlakuan selisih pre LPS – post1 dan post2 ($p < 0,05$) mengalami penurunan yang signifikan.

Kesimpulan Pemberian melatonin tidak menyebabkan penurunan jumlah leukosit yang signifikan.

Kata kunci: Sepsis, Jumlah leukosit, Melatonin, Lipopolisakarida.

ABSTRACT

PENGARUH MELATONIN TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT PADA TIKUS WISTAR MODEL SEPSIS

Background Melatonin was a free radical frequently used as an antioxidant. Melatonin played a role in increasing immune response, and supporting cytoprotective process. On some animal models, melatonin has been identified to be able to resist bacteria infections, viruses, and parasites through some mechanisms such as immunomodulation or antioxidant activities. Melatonin could decrease the level of inflammation cytokine, oxidative stress, and mitochondria dysfunction. Melatonin was one of medicine developed as a sepsis therapy.

Objective this research was to find out the melatonin influence on the amount of white blood cells of a wistar rat sepsis model and to obtain the information that melatonin could decrease the number of white blood cells.

Methods this research was an experimental research with a randomized control group using pre and post test. The samples were 12 male wistar rats with certain criteria divided into 2 groups. The first group was given an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) and was not given melatonin as control group. The second group was given an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) and was given melatonin by oral sonde as treatment group. After a week, in the eighth day, the blood of each rat was taken from the retro-orbital blood vessel. The statistical test used paired t-test, independent t-test, and Mann Whitney test.

Results In the independent test, the average score of the amount of white blood cells from control group was higher than the experimental group. In the paired t-test, the control group underwent a significant change ($p < 0,05$) compared to experimental group which showed a meaningless result. In the Mann Whitney test, the result of pre-post 1 and post 2 from the control group got a significant increase while the result of pre LPS – post 1 and post 2 from the experimental group got a significant decrease ($p < 0,05$).

Conclusion The melatonin treatment did not cause a significant decrease of the amount of white blood cells.

Keywords Sepsis, The amount of white blood cells, Melatonin, Lipopolysaccharide.

PENDAHULUAN

Sepsis adalah suatu sindroma klinik yang terjadi disebabkan adanya respon tubuh yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroorganisme. Gejala yang terjadi panas, takikardia, takipnea, hipotensi, disfungsi organ berhubungan dengan gangguan sirkulasi darah dan leukositosis atau leukopeni. Sepsis dapat dibedakan menjadi sepsis berat dan syok septik yang merupakan penyebab penting kematian.¹

Berdasarkan penelitian yang dilakukan di lima negara berpenghasilan tinggi (Amerika Serikat, Inggris, Perancis, Australia, dan Selandia Baru) di 1995-2002 menunjukkan variasi yang luas dalam kejadian sepsis berat untuk setiap tahunnya, mulai dari 51-300 kasus per 100.000 penduduk. Penelitian yang dilakukan dengan data dari 91 ICU di Inggris, Wales, dan Irlandia Utara melaporkan kejadian tahunan 51 kasus sepsis berat per 100.000 orang. Temuan ini sesuai dengan penelitian kohort berbasis di Inggris lain yang melaporkan kejadian 66 kasus per 100.000 per penduduk.² Pada tahun 2015, dilakukan penelitian terkait dengan demam, sepsis, tifoid dan HIV. Penelitian sepsis bertujuan untuk memperoleh data penyebab terjadinya penyakit sepsis pada dewasa dan anak-anak. Lokasi penelitian adalah di RS dr Wahidin Sudiro Husodo Makassar dan RS Sardjito Yogyakarta, sampai dengan Mei 2015 berjumlah 42 pasien di RS Wahidin Sudiro Husodo dan 43 pasien di RS Sardjito dari target masing-masing 125 kasus.³

Penanganan sepsis dengan identifikasi dan intervensi berjenjang dengan target resusitasi yang telah ditentukan dalam protokol penatalaksanaan di unit gawat darurat atau di ruang perawatan intensif maupun non-intensif, yaitu dengan menerapkan EGDT.⁴ CRP merupakan protein fase akut yang dibentuk di hati (oleh sel hepatosit) akibat adanya proses peradangan atau infeksi.⁵

Melatonin dikenal oleh para profesional medis dan awam atas tindakan hipnotisnya. Berdasarkan beberapa fungsinya memiliki potensi untuk mengambil tempat bagi obat bius, karena menjadi pilihan yang menarik sebagai *anxiolytic* dan obat penenang, untuk induksi anestesi umum sebagai hipnotis atau sebagai induksi adjuvant dan peri-operatif untuk analgesia, mengurangi peradangan dan untuk menyediakan kondisi operasi yang menguntungkan.⁶ Berdasarkan hal-hal tersebut diatas maka peneliti ingin meneliti seberapa besar pengaruh melatonin terhadap jumlah leukosit tikus wistar model sepsis.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *randomized control grup pre post test*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang (Unnes) untuk perlakuan pada hewan coba dan Laboratorium RSUP dr Kariadi Semarang untuk pengukuran jumlah leukosit pada bulan April 2016.

Sampel penelitian adalah tikus wistar jantan sebagai objek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eklusi. Kriteria inklusi penelitian ini, yaitu tikus wistar jantan, umur 2-3 bulan, sehat dan aktif, berat 150-300 gram, serta tidak terdapat kelainan anatomi. Sampel dieksklusi jika mati saat adaptasi dan perlakuan. Pemilihan subjek penelitian dilakukan secara simple random sampling.

Pada penelitian ini terdiri dari 2 kelompok di mana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor hewan percobaan. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol yang hanya diberi injeksi intraperitoneal LPS dosis 2 mg/200 g tikus. Selanjutnya, dilakukan pengambilan darah setelah 6 jam pasca pemberian LPS melalui vena retro orbita, dan dilanjutkan pengambilan darah 1 jam tanpa pemberian melatonin dan 2 jam tanpa pemberian melatonin.

Kelompok kedua adalah kelompok perlakuan yang diberi makan dan minum standar, injeksi intraperitoneal LPS dosis 2 mg/200 g tikus yang diinjeksikan pada hari ke-8 penelitian serta melatonin dosis 4 mg/200 g tikus per oral yang diberikan pada hari yang sama seperti LPS sebanyak 2 kali setelah pemberian LPS dilakukan.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian suplementasi melatonin. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah leukosit pada tikus wistar. Data yang dikumpulkan adalah data primer yang diperoleh dari pembacaan hasil pemeriksaan laboratorium. Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji Saphiro-Wilk. Karena diperoleh distribusi normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji statistik *parametric t-Test*. Bila distribusi datanya tidak normal, diuji beda dengan menggunakan statistik uji *non-parametric Mann Whitney Test*.

HASIL

Tabel 1. Uji Normalitas Data dengan Uji Saphiro Wilk

Variabel	Kelompok		Keterangan
	Kontrol	Perlakuan	
Setelah LPS (pre)	0,889	0,672	Normal
Melatonin 1 (post1)	0,926	0,976	Normal
Melatonin 2 (post 2)	0,893	0,199	Normal
Δ Setelah LPS – Melatonin 1	0,013	0,140	Tidak normal
Δ Setelah LPS – Melatonin 2	0,003	0,559	Tidak normal

Keterangan : $p > 0,05$: data distribusi normal

Tabel 2. Jumlah Leukosit pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Jumlah leukosit	Kelompok Jumlah Leukosit		p
	Kontrol	Perlakuan	
Setelah LPS (pre)	11,15 ± 2,2; 10,75 (8,50-14,5)	10,58 ± 2,46; 10,55 (7,6-13,7)	0,683 ^b
Melatonin 1 (post 1)	13,22 ± 2,45; 13,3 (9,3-16,3)	9,72 ± 2,05; 9,85 (6,6-12,4)	0,023 ^{*b}
Melatonin 2 (post 2)	14,5 ± 2,48; 14,35 (11,2-17,7)	10,42 ± 2,3; 10,3 (7,9-13,0)	0,014 ^{*b}
P (pre-post 1)	0,035 ^{*a}	0,393 ^a	-
P (post 1-post 2)	0,002 ^{*a}	0,198 ^a	-
P (pre-post 2)	0,008 ^{*a}	0,892 ^a	-
Δ Setelah LPS – Melatonin 1	1,8 (0,7 – 5,5)	0,4 (-3,7 – 1,3)	0,043 ^{*c}
Δ Setelah LPS – Melatonin 2	2,6 (2,1 – 7,2)	0,6 (-4,7 – 2,8)	0,025 ^{*c}

Keterangan : * Signifikan $p < 0,05$; ^a Uji t-berpasangan; ^b Uji t-tidak berpasangan; ^c Uji Mann-Whitney

Berdasarkan hasil *uji paired t-test* perbandingan jumlah leukosit Pre-Pos 1 didapatkan ($p = 0,035$) kemudian pada Pos1-Pos 2 diperoleh data ($p=0,002$) dan Pre-Post 2 didapatkan data ($p= 0,008$) maka disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan setelah pemberian LPS pada kelompok kontrol. Kemudian pada kelompok perlakuan berdasarkan data Pre-Post 1 didapatkan data ($p=0,393$) pada Post1-Pos 2 diperoleh data ($p=0,198$) dan Pre-post 2 didapatkan data ($p=0,892$) maka dapat disimpulkan bahwa ketiga data tersebut terdapat perbedaan jumlah leukosit namun tidak signifikan setelah pemberian LPS pada kelompok perlakuan.

Selanjutnya untuk *uji independent sample t-test* pada kelompok pre pemberian setelah LPS diperoleh nilai ($p = 0,683$) maka disimpulkan terdapat pengaruh tidak signifikan jumlah leukosit setelah pemberian LPS. Kemudian pada pemberian melatonin 1 diperoleh nilai ($p= 0,023$) dan pada pemberian melatonin 2 diperoleh nilai ($p=0,014$) maka dapat disimpulkan terdapat pengaruh signifikan setelah pemberian melatonin terhadap jumlah leukosit baik pada melatonin 1 maupun melatonin 2.

Kemudian dengan menggunakan uji non parametrics dengan *Mann Whitney Test* diperoleh data median dan minimum – maksimum sebesar 1,8 (0,7 – 5,5) pada kelompok kontrol sedangkan pada kelompok perlakuan sebesar -0,4 (-3,7 – 1,3) dan diperoleh nilai ($p = 0,043$) maka disimpulkan terdapat pengaruh yang signifikan selisih setelah LPS– Melatonin 1. Selanjutnya data berdasarkan selisih setelah LPS-melatonin 2 diperoleh data median dan minimum – maksimum sebesar 2,6 (2,1 – 7,2) pada kelompok kontrol dan sebesar 0,6 (-4,7 – 2,8) pada kelompok perlakuan dengan nilai ($p=0,025$) maka disimpulkan terdapat pengaruh yang signifikan selisih setelah LPS – melatonin 1.

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian melatonin terhadap jumlah leukosit pada model sepsis tikus wistar. Sampel penelitian ini adalah 12 ekor tikus wistar yang telah memenuhi kriteria inklusi yang ditetapkan. Dari ke-12 tikus wistar tersebut dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 6 ekor tikus wistar sebagai kelompok kontrol, 6 ekor tikus wistar yang diinjeksi LPS intraperitoneal dan diberi melatonin via sonde oral. Dimana pada kelompok kontrol jumlah leukosit mengalami peningkatan terus-menerus dibanding

kelompok perlakuan yang mengalami perubahan tetapi tidak sesuai dengan hipotesis. Definisi sepsis adalah *systemic inflammatory response syndrome (SIRS)* yang terjadi karena adanya infeksi. Sepsis terjadi ketika bahan kimia yang dilepaskan ke dalam darah untuk melawan infeksi memicu respon inflamasi seluruh tubuh. Angka kematian sepsis yang tinggi, utamanya pada pasien – pasien dengan penyakit kritis mendorong untuk dilakukannya penelitian – penelitian tentang obat – obatan yang dapat menghambat kaskade inflamasi.¹

Leukosit adalah sel darah yang mengandung inti, disebut juga sel darah putih. Leukosit mempunyai peranan dalam pertahanan seluler dan humoral organisme terhadap zat-zat asing. Leukosit bekerja sama dengan imunoglobulin dan komplemen sebagai respon imun.⁷ Rata-rata jumlah leukosit dalam darah manusia normal adalah 5000-9000/mm³, bila jumlahnya lebih dari 10.000/mm³, keadaan ini disebut leukositosis, bila kurang dari 5000/mm³ disebut leukopeni.⁸ Peningkatan leukosit menunjukkan aktivasi pertahanan dan sistem kekebalan tubuh dan menunjukkan ada peradangan pada jaringan. Hal ini paling sering disebabkan oleh infeksi atau proses inflamasi.⁹

Melatonin adalah hormon yang disekresi oleh kelenjar hipofisis sebagai kronobiotik yang berperan dalam pengaturan irama sirkadian normal dan juga proses pubertas, adaptasi dan respon imun. Dari penelitian-penelitian setelahnya diketahui melatonin berperan dalam melawan radikal bebas, meningkatkan respon imun, dan membantu proses sitoprotektif. Dalam beberapa model hewan, melatonin telah diidentifikasi untuk membantu melawan infeksi yang disebabkan bakteri, virus, dan parasit. Melatonin dapat mengurangi kadar sitokin inflamasi, stress oksidatif dan disfungsi mitokondria.⁶

Selain itu, melatonin dapat mencegah endotoksemia akibat induksi LPS dengan menurunkan sirkulasi TNF- α , produksi superoksida dalam aorta, dan iNOS dalam hepar.¹⁰ Pemberian melatonin (10-60 mg/kgBB) intraperitoneal pada tikus sebelum dan setelah pemberian LPS secara signifikan dapat menurunkan peroksidasi lemak pada paru dan menetralkan peningkatan NO akibat induksi LPS dalam paru dan hepar dengan dosis yang tepat.¹¹ Pemberian melatonin (60 mg/kgBB) secara efektif dapat menurunkan aktivitas NOS mitokondria dan produksi NO, sehingga dapat mencegah toksisitas akibat LPS.¹²

Pada penelitian ini didapatkan jumlah leukosit pada tikus wistar model sepsis yang mendapat perlakuan pemberian melatonin 4mg/tikus 200 gram tidak didapatkan penurunan jumlah leukosit yang signifikan dibanding tikus wistar kelompok kontrol. Sedangkan pada penelitian XJ Lin et al yang berjudul *Therapeutic effects of melatonin on heatstroke-induced*

multiple organ dysfunction syndrome in rats. Hasil yang diperoleh adalah melatonin dapat mengurangi jumlah leukosit khususnya pada infiltrasi neutrofil. Penelitian tersebut menjelaskan bahwa melatonin mengurangi infiltrasi neutrofil dan level mediator inflamasi, respon inflamasi seperti lesi molekul-1, *E-selectin*, *tumor necrosis factor-alpha*, interleukin (IL) -1 β , dan IL-6, (v) dari sitokin anti-inflamasi IL-10, serta mengurangi indeks infiltrasi neutrofil polimorfonuklear dalam paru-paru seperti aktivitas *myeloperoxidase*. Pada penelitian tersebut juga dijelaskan bahwa melatonin memiliki efek menguntungkan untuk melemahkan beberapa sindrom disfungsi organ (MODS) di syok sepsis.¹³

Selain itu, lama paparan dan dosis berperan dalam mempengaruhi efek melatonin terhadap sepsis. Yavuz T *et al* dalam penelitiannya yang berjudul *Effects of melatonin on Candida sepsis in an experimental rat model* menyebutkan bahwa melatonin dapat menurunkan jumlah leukosit akan tetapi tidak signifikan. Pemberian melatonin dosis 200 μ g/kg/hari secara intraperitoneal selama 21 hari dapat menurunkan faktor inflamasi akan tetapi tidak signifikan. Sedangkan pada penelitian ini, pemberian melatonin dengan dosis 4mg/tikus 200 gram selama 1 jam dan 2 jam pasca injeksi LPS intraperitoneal tidak dapat menurunkan jumlah leukosit tetapi melatonin dapat mencegah peningkatan jumlah leukosit yang berlebihan. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil penelitian yang menunjukkan kelompok perlakuan yang mendapat melatonin mengalami peningkatan jumlah leukosit yang lebih rendah dibanding dengan kelompok kontrol yang tidak mendapat melatonin. Oleh karena itu melatonin dapat menjadi bagian dari terapi sepsis yang ada selama ini, tetapi tidak sebagai terapi utama.¹⁴

Keterbatasan pada penelitian ini adalah penulis tidak dapat mengontrol beberapa faktor, antara lain: faktor lingkungan, faktor penyakit lain, serta faktor intrinsik seperti daya tahan dan kerentanan tikus. Kurangnya waktu penelitian sehingga penulis tidak dapat membuat variasi waktu penelitian.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas dapat diambil kesimpulan bahwa melatonin tidak dapat menurunkan jumlah leukosit tetapi melatonin dapat mencegah peningkatan jumlah leukosit yang berlebihan. Selain itu, melatonin merupakan suplemen sehingga tidak dapat digunakan terapi utama sepsis. Oleh karena itu, hanya dapat digunakan sebagai terapi pendamping.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian melatonin dosis bertingkat dan lama paparan yang bervariasi dan dengan melakukan analisis kimia darah lain untuk mengetahui tingkat kerusakan organ akibat pemberian lipopolisakarida. Selain itu, diperlukan studi epidemiologi mengenai dosis aman melatonin dalam penggunaannya sebagai antioksidan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini. Penulis juga berterima kasih kepada dr. Satrio Adi Wicaksono Sp.An selaku dosen pembimbing karya tulis ilmiah, dr. Widya Istanto Nurcahyo, Sp.An. KAKV, KAR selaku ketua penguji, dr. Endang Sri Lestari, Ph.D selaku penguji, serta keluarga dan teman-teman yang senantiasa memberikan doa dan dukungan sehingga penulisan hasil karya tulis ilmiah ini dapat terselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Vodovotz Y, Billiar TR. In silico modeling: methods and applications to trauma and sepsis. *Crit Care Med*. 2013;41(8):2008-2014.
2. Tsertsvadze A, Royle P, McCarthy N. Community-onset sepsis and its public health burden: protocol of a systematic review. *Syst Rev*. 2015;4(1):119.
3. INA-RESPOND | Pusat Teknologi Terapan Kesehatan Epidemiologi Klinis. http://www.pusat2.litbang.depkes.go.id/pusat2_v1/supervisi-kabandan-ke-site-ina-respond/. Accessed November 17, 2015.
4. "Early goal-directed therapy" versus "Early" and "goal-directed" therapy for severe sepsis and septic shock: Time to rationalize - ProQuest. <http://search.proquest.com/docview/1713996364/fulltextPDF/9E6D61C6B45E9PQ/4?accountid=49069>. Accessed November 19, 2015.
5. Miglietta F, Faneschi ML, Lobreglio G, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and serum lactate dehydrogenase in the diagnosis of bacterial sepsis, SIRS and systemic candidiasis. *Infez Med*. 2015;23(3):230-237. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26397291>. Accessed November 3, 2015.

6. Kurdi MS, Patel T. The role of melatonin in anaesthesia and critical care. *Indian J Anaesth.* 2013;57(2):137-144.
7. Abramson N, Melton B RB. Leukocytosis : Basics of Clinical Assessment. *American Family Physician.* 2000;62(9):2053-2060.
8. Pemberton P, Veenith T, Snelson C, Whitehouse T. Is It Time to Beta Block the Septic Patient? *Biomed Res Int.* 2015;2015:424308.
9. Chabot-Richards DS GT. Leukocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(3):279-288.
10. Wu CC, Chiao CW, Hsiao G, Chen A, Yen MH. Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res.* 2001;30(3):147-156.
11. Crespo E, Macías M, Pozo D, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 1999;13(12):1537-1546.
12. Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 2003;17(8):932-934.
13. Lin X-J, Mei G-P, Liu J, et al. Therapeutic effects of melatonin on heatstroke-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res.* 2011;50(4):436-444.
14. Yavuz T, Kaya D, Behcet M, Ozturk E, Yavuz O. Effects of melatonin on Candida sepsis in an experimental rat model. *Adv Ther.* 2007;24(1):91-100.