

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

**Wydział Farmaceutyczny**

**Olga Maliszewska**

**Optymalizacja metod chromatograficznych jako narzędzi**   
**analitycznych do pomiaru stężeń wybranych leków**   
**cytostatycznych w materiale biologicznym**

***Optimization of chromatographic methods as analytical tools***

***for the determination of selected cytostatic drugs***

***in biological material***

Praca doktorska

**Promotor pracy:**

**dr hab. Alina Plenis**

**Gdańsk, 2023 r.**

***Podziękowanie***

*Pragnę serdecznie podziękować mojej Promotor dr hab. Alinie Plenis za wsparcie merytoryczne w trakcie prowadzonych badań, jak również podczas redagowania pracy doktorskiej. Ponadto dziękuję za życzliwość, cierpliwość oraz poświęcony czas.*

*Dziękuję Współautorom publikacji za pomoc oraz cenne wskazówki podczas prowadzenia badań.*

Spis treści

[Wykaz skrótów: 4](#_Toc137702464)

[Spis publikacji, w których opublikowano wyniki pracy doktorskiej: 6](#_Toc137702465)

[Spis publikacji, które nie wchodzą w skład pracy doktorskiej: 8](#_Toc137702466)

[Spis streszczeń zjazdowych, które są związane z rozprawą doktorską: 8](#_Toc137702467)

[Spis streszczeń zjazdowych, które nie są związane z rozprawą doktorską: 11](#_Toc137702468)

[1. Wstęp 12](#_Toc137702469)

[1.1. Epidemiologia nowotworów 12](#_Toc137702470)

[1.2. Charakterystyka nowotworów 13](#_Toc137702471)

[1.3. Sposoby leczenia onkologicznego 15](#_Toc137702472)

[1.4. Charakterystyka leków przeciwnowotworowych 16](#_Toc137702473)

[*1.4.1. Antracykliny* 16](#_Toc137702474)

[*1.4.2. Taksany* 19](#_Toc137702475)

[1.5. Terapia monitorowania stężeniem leku 20](#_Toc137702476)

[1.6. Opracowanie metody opartej na wysokosprawnej chromatografii cieczowej 22](#_Toc137702477)

[2. Cel pracy 26](#_Toc137702478)

[3. Omówienie publikacji 28](#_Toc137702479)

[3.1. Publikacja 1. 29](#_Toc137702480)

[3.2. Publikacja 2. 35](#_Toc137702481)

[3.3. Publikacja 3. 38](#_Toc137702482)

[3.4. Publikacja 4. 42](#_Toc137702483)

[3.5. Publikacja 5. 46](#_Toc137702484)

[4. Podsumowanie 49](#_Toc137702485)

[Streszczenie 51](#_Toc137702486)

[Summary 53](#_Toc137702487)

[Referencje 55](#_Toc137702488)

[Publikacje, które wchodzą w skład rozprawy doktorskiej 73](#_Toc137702489)

# **Wykaz skrótów:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| AS | naczyniakomięsak | *Angiosarcoma* |
| DLLME | dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz | *Dispersive liquid-liquid microextraction* |
| ESI | jonizacja poprzez elektrorozpraszanie | *Electrospray Ionisation* |
| FDA | Agencja Żywności i Leków | *Food and Drug Administration* |
| FL | detektor fluorescencyjny | *Fluorescence* *detector* |
| HL | chłoniak Hodgkina | *Hodgkin Lymphoma* |
| HLB | złoże hydrofilowo-hydrofobowe | *Hydrophilic Lipophilic Balance* |
| HPLC | wysokosprawna chromatografia cieczowa | *High-Performance Liquid Chromatography* |
| IATDMCT | Międzynarodowe Stowarzyszenie Monitorowania Leków Terapeutycznych i Toksykologii Klinicznej | *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology* |
| ICH | Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi | *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* |
| IS | wzorzec wewnętrzny | *Internal Standard* |
| LC-MS | chromatografia cieczowa w połączeniu ze spektrometrią mas | *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry* |
| LC-MS/MS | chromatografia cieczowa w połączeniu z tandemową spektrometrią mas | *Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry* |
| LLE | ekstrakcja ciecz-ciecz | *Liquid-liquid extraction* |
| LOD | granica wykrywalności | *Limit of Detection* |
| LOQ | granica oznaczalności | *Limit of Quantification* |
| PBS | buforowana fosforanem sól fizjologiczna | *Phosphate Buffered Saline* |
| RMA | pęcherzykowaty mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy | *Metastatic Alveolar Rhabdomyosarcoma* |
| RME | zarodkowy mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy | *Metastatic* *Embryonale* *Rhabdomyosarcoma* |
| RMS | mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy | *Rhabdomyosarcoma* |
| RP-HPLC | wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz | *Reversed Phase* *High-Performance Liquid Chromatography* |
| RSD | względne odchylenie standardowe | *Relative Standard Deviation* |
| SPE | ekstrakcja do fazy stałej | *Solid phase extraction* |
| SPME | mikroekstrakcja do fazy stałej | *Solid phase microextraction* |
| STS | mięsak tkanek miękkich (MTM) | *Soft Tissue Sarcoma,* |
| TCA | kwas trichloroctowy | *Trichloroacetic acid* |
| TDM | terapia monitorowania stężeniem leku | *Therapeutic Drug Monitoring* |
| TNM | guz, węzły chłonne, przerzuty | *Tumor, lymph Nodes, Metastatis* |
| UA-DLLME | dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz wspomagana ultradźwiękami | *Ultrasound* *Dispersive liquid-liquid microextraction* |
| UPLC | ultrasprawna chromatografia cieczowa | *Ultra-Performance Liquid Chromatography* |
| UV-VIS | detektor spektrofotometryczny w zakresie światła ultrafioletowego i widzialnego | *Ultraviolet-Visible Detector* |

# **Spis publikacji, w których opublikowano wyniki pracy doktorskiej:**

1. O. Maliszewska, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, Optimization of LC method for the quantification of doxorubicin in plasma and urine samples in view of pharmacokinetic, biomedical and drug monitoring therapy studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **2018**; vol. 158, s. 376-385.   
   Doi: 10.1016/j.jpba.2018.06.031

**Punktacja IF:** 2.983; **Punktacja MEiN:** 35.000

1. N. Treder, O. Maliszewska, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, A. Plenis, Development and validation of a high-performace liquid chromatographic method with a fluorescence detector for the analysis of epirubicin in human urine and plasma, and its application in drug monitoring, *J. Chromatogr. B*., **2019**; vol. 1136, art. 121910, s. 1-8  
   Doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121910

**Punktacja IF:** 3.205; **Punktacja MEiN:** 70.000

1. O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, W. Rodzaj, E. Bień, M.A. Krawczyk, A. Plenis, Sensitive Analysis of Idarubicin in Human Urine and Plasma by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: An Application in Drug Monitoring, *Molecules,* **2020** Dec 9;25(24):5799  
   Doi: 10.3390/molecules25245799

**Punktacja IF:** 4.412; **Punktacja MEiN:** 140.000

1. O. Maliszewska, N. Treder, A. Roszkowska, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, A. Plenis, Comparative Study of Various Procedures for Extracting Doxorubicin from Animal Tissue Samples, Separations **2023**, 10, 6

Doi: 10.3390/separations10010006

**Punktacja IF:** 3.344; **Punktacja MEiN:** 20.000

1. O. Maliszewska, A. Roszkowska, M. Lipiński, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, E. Bień, M. A. Krawczyk, A. Plenis, Profiling Docetaxel in Plasma and Urine Samples from a Pediatric Cancer Patient Using Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with LC–MS/MS, *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1255  
   Doi: 10.3390/pharmaceutics15041255

**Punktacja IF:**6.525; **Punktacja MEiN:**100.000

**Łączna punktacja IF:** 20.469; **Łączna punktacja MEiN:** 365.000

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie każdej z wymienionych prac w formie publikacji to:

* współudział podczas tworzenia koncepcji prac, prowadzenie eksperymentów bądź współudział w ich wykonywaniu, opracowywanie uzyskanych danych, interpretacja otrzymanych wyników, przegląd literatury naukowej, współudział podczas pisania manuskryptów oraz edycji prac na etapie recenzji.

# **Spis publikacji, które nie wchodzą w skład pracy doktorskiej:**

1. N. Treder, A. Plenis, O. Maliszewska, N. Kaczmarczyk, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, E. Bień, M.A. Krawczyk, A. Roszkowska. Monitoring of sirolimus in the whole blood samples from pediatric patients with lymphatic anomalies. *Open Med*. 18: (2023) 20230652. https://doi.org/10.1515/med-2023-0652

**Punktacja IF:** 2.123

**Punktacja MEiN:**20.000

Spis streszczeń zjazdowych, które są związane z rozprawą doktorską:

1. A. Plenis, O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, A. Roszkowska, P. Kowalski, T. Bączek, Different approaches for anthracycline antibiotic isolation from biological samples: 6th International International Webinar on chemistry and Pharmaceutical Chemistry, webinar (online meeting), November 25-26, 2022 (występienie ustne)
2. N. Treder, O. Maliszewska, I. Olędzka, A. Roszkowska, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, E. Bień, A.M. Krawczyk, A. Plenis, Monitoring concentration profiles   
   of anthracycline antibiotics in pediatric oncology patients, 4TH Central European Biomedical Congress, [virtual conference, Kraków, Poland], 7-9 June 2021 (wystąpienie ustne)
3. O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, A. Plenis, Monitorowanie stężenia idarubicyny w ludzkim osoczu i moczu metodą SPE-LC z detekcją 9 fluorescencyjną. XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 20-22 września 2021, (plakat)
4. O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, T. Bączek, A. Plenis, Porównanie procedur ekstrakcji doksorubicyny z tkanek zwierzęcych z użyciem deproteinizacji, LLE i SPE, Biologia, Chemia i Środowisko: Spojrzenie Młodych Naukowców: Edycja II: materiały Konferencji Młodych Naukowców, [on-line], Kraków, 24-25.04.2021 (plakat)
5. O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, E. Bień, M.A. Krawczyk, A. Plenis, Opracowanie nowych procedur LC-FL do oznaczania wybranych leków cytostatycznych w płynach ustrojowych i ich zastosowanie w praktyce klinicznej XXVI Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk, Polska, 28-29 stycznia 2021, (plakat)
6. A. Plenis, O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, Opracowanie metod oznaczania wybranych antybiotyków antracyklinowych w osoczu i moczu krwi ludzkiej techniką LC-FL i ich zastosowanie w praktyce klinicznej: III Poznańska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa: Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia, on-line, Poznań, 04-05.06.2020 r. (wystąpienie ustne)
7. A. Plenis, O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, , E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek**,** The application of LC-FL methods for the quantification of selected anthracycline antibiotics in human plasma and urine samples (poster), CECE 2019: 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Gdańsk, Poland, 24-26th September 2019 (plakat)
8. N. Treder, O. Maliszewska, , I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, A. Plenis**,** A new method for epirubicin analysis using high-performance liquid chromatography with fluorescence detector in human plasma and urine and its application to real samples (poster), CECE 2019 : 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Gdańsk, Poland, 24-26th September, 2019 , (plakat)
9. A. Plenis, N. Treder, O. Maliszewska, P. Kowalski, I. Olędzka, N. Miękus, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek**;** Development and validation of LC method for the determination of epirubicin in human plasma and urine: application to a drug monitoring (poster),  15th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, CECE2018, Brno, Czech Republic, October 15-17.2018, (plakat)
10. N. Treder, A. Plenis, O. Maliszewska, P. Kowalski, I. Olędzka, N. Miękus, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek**;** Monitorowanie poziomu epirubicyny w wybranych płynach ustrojowych techniką LC-FL (poster), XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk, 07-08.12.2018, (plakat)
11. O. Maliszewska, W. Rodzaj, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Kossakowska, N. Miękus, T. Bączek; Quantification of idarubicin in human plasma and urine by LC-FL method (poster) ITP 2017: 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques; PKChrom 2017: XI Polska Konferencja Chromatograficzna : "Chromatography in pharmacy and bioanalysis", Sopot/Gdańsk, Poland, 10-13 September 2017 (plakat)
12. A. Plenis, O. Maliszewska, I.Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek; Development and validation of LC assays for the quantification of doxorubicin in human plasma and urine : application to a drug monitoring (poster) ITP 2017 : 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques ; PKChrom 2017 : XI Polska Konferencja Chromatograficzna :"Chromatography in pharmacy and bioanalysis", Sopot/Gdańsk, Poland, 10-13 September 2017 (plakat)
13. O. Rudzińska (Maliszewska), A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, Comparative study of various extraction procedures of doxorubicin from animal tissues based on lle and spe techniques, 9th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences "Towards novel concepts in pharmaceutical sciences", Kraków, Poland, 26-27.05.2017 (wystąpienie ustne)
14. A. Plenis, M. Żółtowska, O. Rudzińska (Maliszewska), I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, E. Bień, M. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, Determination of doxorubicin in human plasma and urine by liquid chromatography with fluorescence detection, 9th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences "Towards novel concepts in pharmaceutical sciences", Kraków, Poland, 26-27.05.2017 (plakat)

Spis streszczeń zjazdowych, które nie są związane z rozprawą doktorską:

1. A. Plenis, N. Treder, A. Roszkowska, O. Maliszewska, N. Kaczmarczyk, I. Oledzka, P. Kowalski, T. Bączek, E. Bień, M. A. Krawczyk, The development of DLLME combined with LC-MS/MS for the determination of sirolimus in the whole blood samples and its application in clinical practice: 4th - International Conference on Pharmaceutical and Medical Sciences, [hybrydowa], Martin [Słowacja], Kraków [Polska], Szeged [Węgry], 16-18th September 2022 (plakat)
2. N. Kossakowska, A. Kowalik, N. Miękus, I. Olędzka, O. Maliszewska, T. Bączek, Application of 1-ethyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate ionic liquid during extraction procedure for determination of biogenic amines by capillary electrophoresis, ITP 2017 : 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques ; PKChrom 2017 : XI Polska Konferencja Chromatograficzna :"Chromatography in pharmacy and bioanalysis", Sopot/Gdańsk, Poland, 10-13 September 2017 (plakat)

Wstęp

## **Epidemiologia nowotworów**

Od wielu lat choroby nowotworowe to jedne z najczęstszych przyczyn zgonów wśród ludzi na całym świecie [1]. Na podstawie światowych danych z 2020 r. odnotowano, że u 19,3 mln osób zdiagnozowano nowotwór, z czego zmarło 10 mln [2]. W Polsce, w 2020 r. na choroby nowotworowe zachorowało 146 tys. osób, a umarło około 100 tys. osób [3]. Liczby te w porównaniu do danych sprzed 40 lat systematycznie wzrastają, co wskazuje na wyraźny skok zachorowalności i umieralności. Najczęściej raportowane przypadki nowotworów wśród dorosłych to rak płuca, jelita grubego, prostaty oraz piersi [2]. Według najnowszych prognoz GLOBOCAN2020 do 2040 roku przewiduje się, że liczba nowych zachorowań wzrośnie o ok. 47 % tzn. do 28,4 mln w porównaniu do danych z 2020 roku [2]. Warto także zwrócić uwagę na to, że coraz częściej chorują dzieci w wieku 0-19 lat, przy czym śmiertelność w tej grupie wiekowej maleje, chociaż nadal pozostaje na relatywnie wysokim poziomie. W Polsce, w 2020 r. chorobę nowotworową zdiagnozowano u 1082 dzieci a 191 z nich zmarło [3]. W tej grupie wiekowej, najczęściej raportowanymi przypadkami nowotworów są: białaczka, chłoniaki oraz guzy mózgu [2], [4]. W wyniku tak znacznego wzrostu liczby zachorowań, zarówno wśród dorosłych jak i dzieci, konieczne jest podjęcie wszelkich działań, aby rozprzestrzenianie się nowotworów zostało zatrzymane, ponieważ stanowią nie tylko problem zdrowotny, ale również społeczno-ekonomiczny. Według najnowszych szacunków w ciągu najbliższych 30 lat globalny koszt leczenia nowotworów będzie wynosił około 25 bilionów dolarów [5]. Do głównych czynników takiego stanu rzeczy należy wzrost populacji oraz starzejące się społeczeństwo, jak również inne czynniki ryzyka tj. nadużywanie alkoholu, nieprawidłowe żywienie, palenie tytoniu, ekspozycja na słońce, brak aktywności fizycznej [6]. Warto przypomnieć tutaj znane słowa Hipokratesa – „lepiej zapobiegać niż leczyć”. W przypadku nowotworów jest to szczególnie istotne, gdyż część z nich ma związek z czynnikami zewnętrznymi, np. zanieczyszczeniem powietrza, które można ograniczać [7]. W związku z tym opublikowano Europejski Kodeks Walki z Rakiem, znany także pod polską nazwą „12 sposobów na zdrowie” [8], [9]. Opisuje on profilaktykę nowotworów jako zbiór przepisów ograniczających czynniki ryzyka (tzw. kancerogenów na organizm ludzki) oraz promuje badania przesiewowe, których wprowadzenie w życie może znacząco obniżyć zachorowalność na nowotwory.

## Charakterystyka nowotworów

Nowotwór definiuje się jako niekontrolowany podział, wzrost oraz namnażanie zmienionych form komórek powstałych na skutek mutacji, zmiany w DNA komórki, co prowadzi do zaburzenia homeostazy ustroju. W związku z tym, nowotwór jest charakteryzowany jako nabyta choroba genetyczna. W wyniku dynamicznych zmian, jakie zachodzą w organizmie ludzkim, zmienione komórki zaczynają się gromadzić, co prowadzi do utworzenia zmiany nowotworowej i dalej, do przerzutów [10], [11].

Spośród wielu rodzajów nowotworów możemy wyróżnić dwa podstawowe typy: łagodne oraz złośliwe. **Pierwszy – to zmiany, które powstają powoli, bez nacieków do sąsiednich tkanek, przy czym powstające komórki są bardzo podobne do tkanki zdrowej. Istotne jest to, że w przypadku leczenia u pacjentów takiej zmiany nie ma nawrotów oraz przerzutów. Drugim typem są nowotwory złośliwe, które charakteryzują się znacznie szybszym tempem wzrostu. Ponadto, mogą powodować liczne nacieki do okolicznych tkanek, jak również dawać odległe przerzuty, nawet przy zastosowaniu leczenia. W tym przypadku komórki nowotworowe mają wyraźnie odmienną budowę niż tkanki zdrowe [12].**

Komórki naszego organizmu nieustanie się dzielą. Jest to proces, podczas którego w kodzie DNA mogą pojawiać się błędy. W prawidłowym trybie za sprawą białek sygnałowych ten proces zostaje zatrzymany poprzez układ odpornościowy. W efekcie, komórki albo zostają naprawione, albo ulegają apoptozie. Wśród genów tworzących nowe komórki można wyróżnić protoonkogeny czyli geny, które mogą się przekształcić w geny inicjujące niekontrolowane podziały [13], [14]. Po ich mutacji bądź przyłączeniu się do nich wirusa wywołującego zmiany w pierwotnej postaci sekwencji DNA może on zostać przekształcony w onkogen. Ten, z kolei powoduje dalsze mutacje i prowadzi do procesu, określanego jako kancerogeneza, podczas której ze zdrowej tkanki zaczyna powstawać tkanka nowotworowa. Proces ten składa się z kilka etapów tj. *inicjacji*, *promocji* oraz *progresji*, które to mogą zachodzić przez wiele lat [13]. Jako *inicjację* określa się uszkodzenie pojedynczego genu w kodzie genetycznym, które w sytuacji, gdy zmutowana komórka nie obumrze lub też nie dojdzie do jej naprawy, powoduje inicjację procesu kancerogenezy. Kolejnym etapem jest *promocja*, w trakcie której mutacje zaczynają się powielać i dochodzi do niekontrolowanej proliferacji uszkodzonych komórek. Ostatnim etapem kancerogenezy jest *progresja*, podczas której powstaje guz nowotworowy, nacieki do okolicznych tkanek oraz przerzuty [15].

Jak już wspominano, nowotwory dzielą się na łagodne oraz złośliwe. Wśród nowotworów złośliwych, ze względu na rodzaj tkanki, w której powstaje nowotworzenie, można wyróżnić kilka grup tj. raki, chłoniaki, mięsaki, białaczki, glejaki czy czerniaki [16]. Ponadto, nowotwory mogą mieć różne stadium choroby opisane zgodnie z klasyfikacją TNM (ang. *Tumor, lymph Nodes, Metastatis*) oznaczającą rozmiar pierwotnej zmiany nowotworowej, guza w skali od 0 do 4, stan węzłów chłonnych, który jest klasyfikowany w skali od 0 do 3 oraz obecność przerzutów w skali od 0 do 1 [17]. Zgodnie z tą klasyfikacją lekarze określają sposób dalszego postępowania leczniczego. Ponadto, do określenia rodzaju nowotworu pomocna jest Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych, która w swojej bazie zawiera około 100 rodzajów nowotworów [18].

Wśród nowotworów, które są diagnozowane u pacjentów, a jednocześnie w ramach realizacji rozprawy doktorskiej były potwierdzone u dzieci leczonych onkologicznie, dla których oznaczano profile zmian stężenia leków cytostatycznych z zastosowaniem opracowanych metod chromatograficznych były:

* **Chłoniak Hodgkina** (ang. *Hodgkin Lymphoma*, HL) – jest znany także pod nazwą ziarnica złośliwa oraz choroba Hodgkina. HL definiuje się jako rzadki, złośliwy nowotwór układu chłonnego, który głównie występuje u ludzi do 30 roku życia. Z danych za 2020 r. na całym świecie HL zdiagnozowano u 83 087 osób, natomiast 23 376 osób zmarło. Z kolei w Polsce na HL chorowało 681 osób a 167 umarło [19]. Nazwa tej choroby jest związana z nazwiskiem brytyjskiego lekarza Thomasa Hodgkina, który w 1832 r. po raz pierwszy opisał ten nowotwór. Początek choroby ma miejsce w węzłach chłonnych szyi, gdzie z limfocytów B powstają komórki nowotworowe. W zmienionych chorobowo miejscach wyróżnia się komórki Reed-Sternberga oraz Hodgkina [20]. Początkowo choroba objawia się poprzez powiększone węzły chłonne, które nie powodują bólu, a także gorączkę, nocne poty oraz świąd skóry. W następstwie rozwijania się choroby, komórki nowotworowe zajmują kolejne węzły chłonne pach, śródpiersia i pachwin [21]. W zaawansowanych stadiach nowotwór może naciekać do pobliskich tkanek oraz dawać odległe przerzuty do wielu narządów organizmu np. do śledziony i wątroby. Po rozpoznaniu choroby stosuje się leczenie chemioterapeutyczne wraz z radioterapią, co skutkuje 80 % wyleczeń [22].
* **Mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy** (ang. *Rhabdomyosarcoma*, RMS) należy do grupy nowotworów tkanek miękkich., tzw. mięsaków, ponieważ powstają z mutacji komórek mięśni szkieletowych. RMS to najczęściej występujące schorzenie u dzieci do lat 19 z grupy rzadkich nowotworów złośliwych. Najczęściej obejmuje obszary głowy i szyi. RMS można podzielić na różne typy: m.in. mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy, typ pęcherzykowaty mięśniakomięsaka – (ang. *Metastatic Alveolar Rhabdomyosarcoma*, RMA) oraz zarodkowy mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy - (ang. *Metastatic* *Embryonale* *Rhabdomyosarcoma*, RME). Standardowe leczenie RMS polega na zastosowaniu chemioterapii z radioterapią oraz leczenia chirurgicznego. Według dostępnych źródeł literaturowych, 70 % przypadków leczenia dzieci kończy się sukcesem, a w przypadku dorosłych jedynie 27 % [23], [24].
  + **Mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy** (RMA) – jak już powyżej wspomniano, jest to nowotwór z rodzaju RMS najczęściej diagnozowany u dzieci, który należy do mięsaków tkanek miękkich (MTM) (ang. *Soft Tissue Sarcoma,* STS). Ten typ nowotworu często ma bardzo agresywny przebieg. W wyniku szybkiego rozrostu, często powoduje przerzuty do węzłów chłonnych i dalszych narządów. Po zdiagnozowaniu RMA, w zależności od stadium choroby oraz lokalizacji nowotworu, zaleca się resekcję chirurgiczną połączoną z chemioterapią oraz radioterapią. Często, pomimo zastosowanego leczenia, pojawiają się nawroty choroby a rokowania są bardzo złe [23].
* **Naczyniakomięsak serca** (ang. *Cardiac Angiosarcoma*, AS) – nowotwór najbardziej rzadkich nowotworów należących do grupy MTM. Według statystyk AS stanowi ok. 2 % wszystkich MTM u dorosłych, a w przypadku dzieci występuje jeszcze rzadziej. Ponadto, jest to schorzenie, które jest bardzo trudne do zdiagnozowania. MTM lokalizują się w różnych obszarach ciała m.in. skóra, obszar głowy i szyi, wątroba, serce. Charakteryzuje się bardzo gwałtownym i agresywnym przebiegiem choroby. Jeżeli jest to możliwe, podstawą leczenia jest leczenie chirurgiczne w połączeniu z chemioterapią bądź tylko chemioterapia, gdy zmiana nie jest operacyjna. Rokowania dla pacjentów z AS są bardzo złe, co przekłada się na znaczną śmiertelność w przypadku zdiagnozowania u pacjentów tego nowotworu [22], [23].

## **Sposoby leczenia onkologicznego**

Podstawowym celem leczenia onkologicznego jest zatrzymanie rozwoju choroby, a w przypadku, gdy nie jest to możliwe, przedłużenie życia chorego. Obecny postęp medycyny a także liczne badania diagnostyczne pozwalają na wykrycie wielu nowotworów już w bardzo wczesnym stadium, gdy jako podstawowe stosowane jest leczenie chirurgiczne. Jest to leczenie miejscowe, które ma na celu całościową eliminację guza lub częściowe zmniejszenie jego rozmiarów wówczas, gdy jest to składowa leczenia skojarzonego z chemioterapią lub/i radioterapią. Radioterapia polega na napromieniowaniu miejsca ze zmianą nowotworową promieniami X. Zabieg nie trwa długo, mimo to, aby był skuteczny wymaga wielu powtórzeń, czego efektem ubocznym jest często ostry odczyn popromienny [27]. Chemioterapia opiera się na stosowaniu leków przeciwnowotworowych. Obecnie, dostępnych jest szereg substancji wykazujących działanie przeciwnowotworowe o zróżnicowanych mechanizmach działania farmakologicznego. Leki te można stosować pojedynczo lub w połączeniu z lekami o odmiennych mechanizmach, co z uwagi na ich różnicowany profil działania farmakologicznego pozwala osiągnąć wyższą skuteczność terapeutyczną, a jednocześnie obniżyć skutki działań niepożądanych, gdyż dawki pojedynczych leków są wówczas niższe niż w przypadku monoterapii [14].

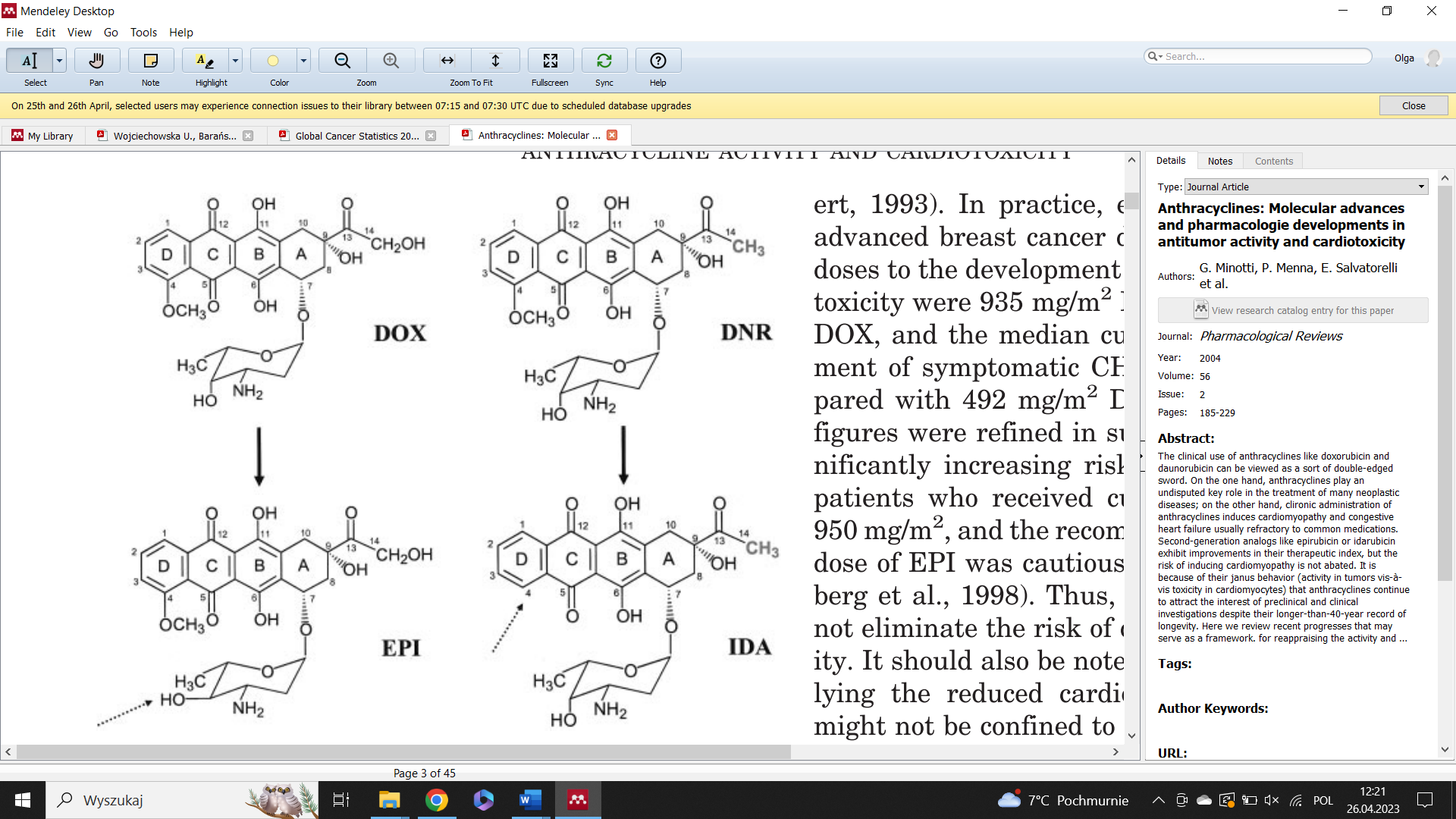
Wymienione powyżej sposoby leczenia należą do podstawowych modeli terapeutycznych stosowanych dla pacjentów ze zdiagnozowanymi nowotworami.

## **Charakterystyka leków przeciwnowotworowych**

Jak wspomniano powyżej, stosowanie leków przeciwnowotworowych ma na celu eliminację komórek nowotworowych, które dzielą się w sposób niekontrolowany w organizmie chorego. Pomimo swojej wysokiej skuteczności onkologicznej, substancje te działają również na zdrowe komórki organizmu, które mają zdolność do szybkiego podziału. W większości przypadków leki te są podawane dożylnie bądź doustnie, ale mogą być także aplikowane domięśniowo bądź też do jam ciała np. do pęcherza moczowego. Ze względu na mechanizm działania można wyróżnić szereg ich grup tj. leki alkilujące, antymetabolity, hormonoterapia, immunoterapia oraz antracykliny i taksany [28], których bardziej szczegółowy opis przedstawiono poniżej.

### ***1.4.1. Antracykliny***

Jest to grupa antybiotyków cytostatycznych pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego. Pierwszą substancją wyekstrahowaną ze szczepu bakterii *Streptomyces peucetius* była **daunorubicyna**. Z kolei ze szczepu *Streptomyces caesius* wyizolowano **doksorubicynę**. Do tej grupy należy również **epirubicyna** oraz **idarubicyna** – półsyntetyczne analogi wcześniej wykrytych antracyklin (Ryc. 1). Ogólna struktura chemiczna antracyklin charakteryzuje się układem pierścieniowym, który jest pochodną antrachinonu połączonym wiązaniem α-glikozydowym z resztą cukrową.



**DAU**

***Ryc. 1.*** *Struktura chemiczna antracyklin* [29]*.*

Różnice w budowie chemicznej poszczególnych substancji sprawiają, iż ich właściwości farmakokinetyczne są różnicowane (Tabela 1).

***Tabela 1.*** *Właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne wybranych antracyklin*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Masa [g/mol]** | **Wartość pKa** | **Biologiczny okres**  **półtrwania [h]** | **Eliminacja** |
| Daunorubicyna | 527,52 | 7,85 | 11-27 | Żółć i mocz |
| Doksorubicyna | 543,52 | 8,34 | 30 | Żółć i kał |
| Epirubicyna | 543,52 | 8,08 | 32 | Żółć i mocz |
| Idarubicyna | 497,49 | 8,04 | 5 do 24 | Żółć i mocz |

Przykładowo, idarubicyna, z powodu wyższej hydrofobowości i biodostępności może być podawana doustne w przeciwieństwie do pozostałych antracyklin, które są podawane wyłącznie dożylnie.

Główny mechanizm działania antracyklin polega na interkalacji substancji leczniczej pomiędzy nici DNA. Ponadto, kolejne możliwe mechanizmy to hamowanie enzymów topoizomerazy II, jak również tworzenie się wolnych rodników, które w efekcie niszczą komórki nowotworowe. Leki te mają szerokie zastosowanie m.in. w terapii raka płuc, żołądka, białaczek, mięsaków tkanek miękkich, chłoniaków itd. Jednakże, antracykliny mają również swoje ograniczenia, które przede wszystkim wynikają z kardiotoksyczności. Jest to najpoważniejszy w skutkach efekt uboczny, które może prowadzić do niewydolności serca, kardiomiopatii czy zapalenie mięśnia sercowego [30]. Z tego powodu maksymalna dawka kumulacyjna wynosi 550 mg/m2 powierzchni ciała [31]. Kardiotoksyczność można podzielić na cztery typy: *ostrą*, *podprzewlekłą*, *wczesną przewlekłą* oraz *późną przewlekłą*. Mechanizm powstawania kardiotoksyczności jest prawdopodobnie związany ze stresem oksydacyjnym prowadzącym do powstawania reaktywnych form tlenu oraz azotu. Związki te w wyniku reakcji z żelazem powodują degradację tkanki mięśniowej serca. Dodatkowo, antracykliny wykazują szereg innych efektów niepożądanych tj. wymioty, nudności czy biegunka.

W lecznictwie, antracykliny mogą być stosowane w monoterapii bądź w połączeniu z lekami o odmiennym mechanizmach działania farmakologicznego (Tabela 2).

***Tabela 2.*** *Przykłady schematów leczenia wybranych nowotworów oparte na włączeniu antracyklin*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Schemat**  **leczenia** | **Nazwy leków wchodzących w skład schematu leczenia** | **Nowotwór** | **Ref.** |
| ABVD | doksorubicyna, bleomycyna, winblastyna, dakarbazyna | Chłoniak Hodgkina | [22] |
| BEACOPP | bleomycyna, etopozyd, doksorubicyna,  cyklofosfamid, winkrystyna,  prokarbazyna, prednizon | Chłoniak Hodgkina | [22] |
| VAC | winkrystyna, aktynomycyna D, cyklofosfamid | RMS | [24] |
| IVA | ifosfamid, winkrystyna, aktynomycyna D | RMS | [24] |
| CEVAIE | karboplatyna, epirubicyna, winkrystyna, ifosfamid, aktynomycyna D, etopozyd | RMA | [32] |
| VACA | winkrystyna, doksorubicyna,  cyklofosfamid, aktynomycyna D | AS | [25] |
| OEPA | winkrystyna, etopozyd, prednison, doksorubicyna | HL | [33] |
| IOA | winkrystyna, ifosfamid, doksorubicyna | RMS |
| EPI | epirubicyna | RMA | [34] |
| O-TIDA/  O-TE | trofosfamid, idarubicyna, etopozyd | RMA | [35] |
| CEVAIE  VAC  PAC/DOC | karboplatyna, epirubicyna, winkrystyna, ifosfamid, aktynomycyna D, etopozyd  winkrystyna, aktynomycyna D, cyklofosfamid  paklitaksel  doceteksel | AS | [36] |

### ***1.4.2. Taksany***

To grupa leków, która charakteryzuje się budową dwuterpenową. Ich główną część struktury chemicznej stanowi pierścień taksoidowy połączony z pierścieniem oktasenowym i łańcuchem bocznym, który odpowiada za główny kierunek działania przeciwnowotworowego taksanów. Mechanizm ten polega na stabilizacji mikrotubul poprzez ich wiązanie z β-tubuliną, co zwiększa ich polimeryzację oraz powoduje zmiany konformacyjne prowadzące do silniejszego wiązania się z sąsiednimi mikrotubulami. Dochodzi do reorganizacji sieci mikrotubul, a to utrudnia przebieg wielu procesów komórkowych prowadząc w konsekwencji do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M i śmierci komórki. Ponadto, sugeruje się, że przy niskich stężeniach taksanów, substancje te oddziałują na endotelium, co powoduje zatrzymanie angiogenezy w obszarze nowotoworowym, a to dodatkowo wspomaga działanie przeciwnowotworowe tych leków. Podobnie, jak inne leki cytostatyczne, taksany powodują wiele działań niepożądanych, w tym wymioty, biegunkę czy mielotoksyczność. Jednak najczęściej wymienianym ograniczeniem jest neuropenia.

Przedstawicielami taksanów są **docetaksel** oraz **paklitaksel**, których struktury chemiczne różnią się między sobą za sprawą odmiennych podstawników w pierścieniu taksoidowym oraz łańcuchu bocznym (Ryc. 2).

|  |  |
| --- | --- |
|  | |
| **Docetaksel** | **R1**: OC(CH3)3 **R2**: H |
| **Paklitaksel** | **R1:** C5H5 **R2**: COCH3 |
| ***Ryc. 2.*** *Struktura chemiczna wybranych taksanów* [37]. | |

Jako pierwszy odkryto paklitaksel, który to został wyizolowany z kory cisu krótkolistnego *Taxus brevifolia,* [38]. Obecnie oba leki, zarówno paklitaksel jak i docetaksel, otrzymuje się z półsyntetycznej pochodnej substancji o nazwie 10-deacetylobakatyny III, która pochodzi z drzewa cisu pospolitego *Taxus baccata*. W onkologiidocetaksel znany jest pod nazwą handlową *Taxotere* [39]. Lek ten wykazuje aktywność w leczeniu raka piersi, żołądka, gruczołu krokowego, niedrobnokomórkowego raka płuc [39]. Standardowe schematy leczenia obejmują dawkowanie 75 mg/m2 docetakselu co trzy tygodnie w 1 godzinnym podaniu dożylnym [40]. Paklitaksel jest stosowany w raku jajnika, piersi oraz niedrobnokomórkowego raka płuc, ale jest często zastępowany docetakselem z uwagi na jego mniejszą toksyczność oraz rzadsze wywoływanie silnych reakcji nadwarażliwości, które w wielu przypadkach występują po podaniu paklitakselu.

## **Terapia monitorowania stężeniem leku**

Obecny, rozwój medycyny wskazuje na potrzebę prowadzenia terapii onkologicznej opartej na bardziej zindywidualizowanym podejściu do pacjenta. Jedną z metod, która to zapewnia jest terapia monitorowania stężeniem leku (ang. *Therapeutic Drug Monitoring*, TDM), której założeniem jest kontrolowanie stężenia substancji czynnej w płynach ustrojowych pacjentów po jego podaniu [41]. Na tej podstawie możliwe jest dopasowanie dawki do indywidualnych potrzeb pacjenta, a to może skutkować zarówno poprawą efektów leczenia jak i jednoczesne zmniejszeniem efektów ubocznych. Początki TDM datuje się na lata 70-te, kiedy po raz pierwszy zastosowano kontrolę stężenia takich leków jak digoksyna, czy fenytoina [42]. Obecnie w praktyce klinicznej wśród monitorowanych leków można wyróżnić m.in. antybiotyki, leki przeciwcukrzycowe czy przeciwpadaczkowe [43], a także metotreksat, 5-flourouracyl, busulfan czy karboplatyna należące do leków o działaniu przeciwnowotworowym [44]. Wskazaniem do ich monitorowania jest wąski indeks terapeutyczny, którymi te substancje czynne się charakteryzują. Tą samą właściwość posiada także szereg innych leków o działaniu cytostatycznym czy cytotoksycznym. Dla tego typu leków szczególnie trudno jest ustalić właściwą dawkę z uwagi na dużą zmienność wewnątrz- i międzyosobniczą oraz ogólny stan zdrowotny pacjenta, które mogą znacząco różnicować procesy wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu czy eliminacji leku z organizmu. W efekcie, ostateczne poziomy substancji leczniczej u człowieka mogą charakteryzować się bardzo dużą zmiennością. Kolejnymi czynnikami są wiek, płeć czy masa ciała. Mimo to, TDM dla pacjentów przyjmujących cytostatyki nie jest tak popularna w praktyce klinicznej, jak w przypadku innych grup farmakologicznych. W celu zwiększenia świadomości zastosowania TDM w terapii przeciwnowotworowej powstało Międzynarodowe Stowarzyszenie Monitorowania Leków Terapeutycznych i Toksykologii Klinicznej (ang. *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*, IATDMCT) [44]. Aktualne badania naukowe potwierdzają skuteczność prowadzenia TDM u pacjentów onkologicznych [45]. Jednakże, aby prowadzenie TDM było możliwe, konieczny jest rozwój nowych, precyzyjnych i dokładnych metod analitycznych, które pozwolą na określanie stężenia leków w płynach ustrojowych człowieka. Ponadto, ciągły rozwój medycyny przynosi coraz to nowsze rozwiązania i innowacje w leczeniu onkologicznym, ale ich wprowadzenie do użytku zawsze jest poprzedzone szeregiem badań, w tym tych dotyczących testów na zwierzętach doświadczalnych. Przykładowo, tego typu badania są wymagane wówczas, gdy ich celem jest udowodnienie wyższej skuteczności przeciwnowotworowej nowo opracowanej postaci leku dla substancji czynnej już dopuszczonej do obrotu aptecznego. Jednakże, to także narzuca konieczność opracowania wiarygodnych metod analitycznych do oznaczania wybranych leków w tkankach zwierzęcych. W laboratoriach farmaceutycznych i klinicznych, z uwagi na wysokie możliwości rozdzielcze oraz dużą dostępność aparatury pomiarowej, bardzo często w takich przypadkach korzysta się z metod opartych na technikach chromatograficznych, a zwłaszcza wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

## **Opracowanie metody opartej na wysokosprawnej chromatografii cieczowej**

Wśród różnych technik separacyjnych stosowanych do oznaczania substancji leczniczych, w tym także leków cytostatycznych, na szczególną uwagę zasługuje chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. *Reversed Phase Liquid Chromatography*, RP-LC), w której rozdzielenie mieszaniny składników próbki przebiega na fazie stacjonarnej o charakterze mniej polarnym niż faza ruchoma, będąca najczęściej mieszaniną wody (alternatywnie wodnego roztworu kwasu, zasady bądź buforu o określonym pH) i modyfikatora organicznego (najczęściej metanolu (MeOH) lub acetonitrylu (ACN)). Wynik rozdzielenia ilustruje chromatogram, na podstawie którego można zidentyfikować związek biorąc pod uwagę jego czas retencji (tR) oraz określić jego stężenie w badanej próbie wykorzystując proporcjonalną zależność tej zmiennej z wysokością (H) bądź polem powierzchni (A) piku danego analitu.

Jednakże, aby rozdzielenia chromatograficzne było satysfakcjonujące, należy przeprowadzić proces optymalizacji nowej metody chromatograficznej, który dotyczy wyboru fazy stacjonarnej oraz ustalenia, w jakiej temperaturze będzie przebiegało rozdzielenie chromatograficzne. Ponadto, jaki będzie skład jakościowy i ilościowy oraz szybkość przepływu fazy ruchomej, objętość dozowanej próbki, a także rodzaj i warunki pracy detektora. Każdy z tych etapów może bowiem decydować o ostatecznym sukcesie bądź niepowodzeniu danej metody chromatograficznej projektowanej w celu oznaczania wybranych analitów w określonej matrycy, w tym leków cytostatycznych w materiale biologicznym. Przykładowo:

* nieodpowiednio dobrane złoże fazy stacjonarnej bądź skład fazy ruchomej może skutkować zbyt niską sprawnością układu, które będzie prowadziło do braku lub nieodpowiedniego kształt pików analitów, nakładania się sygnałów bądź zbyt słabej elucji oznaczanych związków, a to może skutkować koniecznością przedłużenia czasu wymaganego do przeprowadzenia analizy chromatograficznej przy niewielkiej zdolności separacyjnej układu. Efektywność procesu chromatograficznego jest wówczas niska a koszt analizy i obciążenie dla środowiska naturalnego coraz wyższe.

Niewystarczająca sprawność układu HPLC może być także skutkiem:

* niedostosowania wielkości nastrzyku próbki na układ LC (im mniejsza objętość wprowadzanej próbki tym niższa zdolność metody do wykrywania i oznaczania analitów na niskich poziomach stężeń; jednakże zbyt duża objętość nastrzyku skutkuje “przeładowanie kolumny” i pogorszeniem jakości rozdzielenia chromatograficznego),
* nieodpowiedniej temperatury kolumny chromatograficznej bądź szybkości przepływu fazy ruchomej (zbyt niska może prowadzić do “rozmycia pików” a zbyt wysoka do nakładania się sygnałów).
* niewłaściwego doboru rodzaju i warunków pracy detektora do pomiaru zjawiska fizykochemicznego, na którym oparta jest analiza jakościowa i ilościowa związków w próbie.

Aktualnie, dostępny jest szeroki wachlarz różnorodnych detektorów, z których szczególnie popularne w analizie substancji leczniczych, w tym także leków cytostatycznych, są detektory spektrofotometryczne w zakresie światła ultrafioletowego i widzialnego (ang. *Ultraviolet-Visible Detector*, UV-VIS) oraz bardziej selektywne detektory fluorescencyjne (ang. *Fluorescence* *Detector*, FL). Detektory FL w wielu przypadkach pozwalają także wykrywać anality w stężeniach nawet 100-krotnie niższych niż UV-VIS. W ostatnim dziesięcioleciu, z uwagi na istotnie wyższą selektywność oraz czułość oznaczeń, coraz większe znaczenie zyskuje chromatografia cieczowa w połączeniu ze spektrometrią mas (ang. *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*, LC-MS) oraz LC w połączeniu z tandemową spektrometrią mas (ang. *Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Obie te techniki bazują na identyfikacji związków na podstawie widma mas, które są cechą charakterystyczną każdego związku, a analiza ilościowa opiera się na monitorowaniu jonu/ów o określonym stosunku masy do ładunku (m/z). Istnieje wiele rozwiązań analitycznych dotyczących technik LC-MS bądź LC-MS/MS, w tym z użyciem jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (ang. *Electrospray Ionisation*, ESI), które jest w połączeniu z analizatorem typu potrójnego kwadrupola.

Należy jednak podkreślić, iż niezbędnym krokiem przez analizą LC jest optymalizacja procedury ekstrakcji, która umożliwia efektywne izolowanie analitu/ów z matrycy próbki. Jest to szczególnie istotne wówczas, gdy anality występują na bardzo niskich poziomach stężeń w obecności innych, dominujących ilościowo matrycowych składników próbki. W przypadku, gdy związki te posiadają podobny charakter fizykochemiczny co analizowane substancje, to mogą z nimi interferować. Tym samym, mogą wystąpić trudności analityczne w wykazaniu selektywności metody. Rozwiązaniem jest wówczas wspomniane powyżej zastosowanie bardziej selektywnego detektora (FL bądź MS, MS/MS) bądź odpowiednie przygotowanie prób do analizy chromatograficznej. Wśród szeregu metod, które możemy zastosować podczas przygotowania prób można wymienić:

* Deproteinizację,
* Ekstrakcję ciecz-ciecz (ang. *Liquid-liquid extraction*, LLE),
* Ekstrakcję do fazy stałej (ang. *Solid phase extraction*, SPE),
* Mikroekstrakcje do fazy stałej (ang. *Solid phase microextraction*, SPME),
* Dyspersyjną mikroekstrakcję ciecz-ciecz (ang. *Dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME).

Zalety i wady każdej z tych metod w odniesieniu do izolacji wybranych cytostatyków z materiału biologicznego przez analizą LC, zostaną bardziej szczegółowo omówione w części opisowej dotyczącej wyników badań uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Niezbędnym etapem opracowania metody analitycznej test także proces walidacji metody, który ma na celu określenie sprawności jej działania i ograniczenia, a także sprawdzić przydatność metody do określonych celów. Wykonując walidację należy wyznaczyć doświadczalnie wartości parametrów walidacyjnych (selektywność, liniowość, zakres liniowości, granicę wykrywalności (ang. *Limit of Detection*, LOD), granicę oznaczalności (ang. *Limit of Quantification*, LOQ), precyzję (w tym powtarzalność i odtwarzalność często definiowane wartością współczynnika zmienności (ang. *Relative Standard Deviation,* RSD (%)), dokładność (najczęściej opisywana jako odzysk (%)), elastyczność/odporność (w tym stabilność roztworów i próbek) oraz wydajność ekstrakcji analitu/ów z badanego materiału. Następnie, należy ocenić, czy uzyskane parametry walidacyjne spełniają kryteria akceptacji stawione metodom analitycznym do danych aplikacji. W przypadku metod służących do oznaczania substancji czynnych kryteria te są wyznaczane przez wytyczne Agencji Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) oraz Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ang. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use,* ICH) [46]. Wszystkie wymagane etapy walidacyjne były prowadzone w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

W ramach opracowania nowych metod chromatograficznych do określania stężeń wybranych leków cytostatycznych w materiale biologicznym do potencjalnych zastosowań w TDM bądź innych aplikacji w obszarze badań klinicznych, farmakokinetycznych czy farmakodynamiczych jako anality wytypowano cytostatyki należące do grupy antracyklin (doksorubicyna, epirubicyna i idarubicyna) oraz taksanów (docetaksel). Wybór wymienionych powyżej cytostatyków do badań był związany z tym, że pomimo szeregu już opublikowanych procedur analitycznych do monitorowania tych substancji przeciwnowotworowych w matrycach biologicznych, ciągle istnieje potrzeba opracowania nowych, alternatywnych narzędzi analitycznych o wyższym potencjale aplikacyjnych niż dotychczas dostępne w laboratoriach przyszpitalnych, farmaceutycznych czy klinicznych. Opracowanie nowych procedur chromatograficznych, a następnie wprowadzenie do laboratoriów może ułatwić rozpowszechnienie praktyki TDM w przypadku leczenia pacjentów onkologicznych. Ponadto, wyznaczone profile stężeń wybranych cytostatyków w rzeczywistych próbkach pobranych od pacjentów poddanych chemioterapii może pogłębić naszą wiedzę w zakresie ich efektywności terapeutycznej oraz działań niepożądanych, co może przełożyć się na poprawę jakości życia i rokowań dla pacjentów, a także bezpieczeństwo ich stosowania w praktyce klinicznej.

Cel pracy

Głównym celem pracy była optymalizacja metod chromatograficznych jako narzędzi analitycznych do pomiaru stężeń wybranych leków cytostatycznych w materiale biologicznym.

Aby zrealizować cel tych badań zaplanowano dwa etapy realizacji, które obejmowały:

* Opracowania metod oznaczania doksorubicyny, epirubicyny i idarubicyny w różnorodnych matrycach biologicznych (mocz i osocze krwi ludzkiej) oraz tkanki zwierzęce w przypadku doksorubicyny techniką chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (LC-FL). Realizacja tego zadania badawczego wymagała:
* opracowania optymalnych warunków ich separacji chromatograficznych techniką LC-FL,
* opracowania optymalnych warunków izolacji wymienionych antracyklin z wybranych matryc biologicznych,
* walidacji opracowanych metod chromatograficznych zgodnie z wymaganiami FDA oraz ICH,
* potwierdzenia użyteczności opracowanych metod chromatograficznych w praktyce klinicznej poprzez ich zastosowanie do wyznaczenia profili stężeń wybranych antracyklin w próbkach osocza i moczu pobranych od pacjentów poddanych leczeniu onkologicznemu,
* odniesienie uzyskanych danych do wcześniej opublikowanych w literaturze w aspekcie efektywności i bezpieczeństwa ich stosowania dla pacjenta i jego otoczenia,
* potwierdzenie użyteczności opracowanej metody oznaczania doksorubicyny w tkankach szczurzych techniką LC-FL do potencjalnych zastosowań w badaniach z udziałem zwierząt laboratoryjnych,
* Opracowania metody oznaczania docetakselu w moczu i osoczu krwi ludzkiej techniką LC-MS/MS, co wiązało się z:
* opracowaniem optymalnych warunków separacji chromatograficznych tego analitu techniką LC-MS/MS,
* opracowaniem optymalnych warunków izolacji docetakselu ze wspomnianych matryc biologicznych,
* walidacją opracowanej metod chromatograficznej zgodnie z wymaganiami FDA oraz ICH,
* potwierdzeniem użyteczności opracowanej metod LC-MS/MS w praktyce klinicznej poprzez jej zastosowanie do wyznaczenia profili stężeń docetakselu w próbkach osocza i moczu pobranych od pacjenta poddanego leczeniu onkologicznemu.

# **Omówienie publikacji**

Praca doktorska pod tytułem „*Optymalizacja metod chromatograficznych jako narzędzi analitycznych do pomiaru stężeń wybranych leków cytostatycznych w materiale biologicznym*” stanowi cykl pięciu publikacji opublikowanych w zagranicznych czasopismach naukowych z listy JCR w latach 2018-2023. W publikacjach nr 1-3 przedstawiono opracowane metody chromatograficzne oznaczania antracyklin (doksorubicyny, epirubicyny i idarubicyny) w ludzkim osoczu oraz moczu techniką LC-FL, natomiast w publikacji nr 4 opisano rozszerzenie opracowanej metody, którą przedstawiono w publikacji nr 1, do oznaczania doksorubicyny w tkankach zwierzęcych. W przypadku metod LC-FL do oznaczania wyżej wymienionych antracyklin, zdecydowano się zaproponować niezależne protokoły analityczne dla każdego leku z uwagi na możliwość maksymalnego dostosowania do jego charakteru fizykochemicznego warunków ekstrakcji i separacji danego analitu. Takie podejście umożliwiało także dostosowania zakresu stężeń, w których dana metoda była walidowana, do wymagań dotyczących potencjalnych aplikacji klinicznych. To jest bowiem bardzo istotne, aby dostosować zakres liniowości metody do spodziewanych poziomów stężeń substancji czynnej u pacjenta/ów po podaniu określonej dawki leku zależnie od postaci, w jakiej ten lek był aplikowany. Takie podejście było także podyktowane tym, iż jak wspomniano w rozdziale 1.4.1, antracykliny mogą być stosowane w monoterapii bądź terapii wielolekowej, ale nigdy nie są podawane jednocześnie, aby minimalizować efekty uboczne ich działania. Nie istnieje zatem konieczność ich jednoczesnego oznaczania w rzeczywistych próbkach pobranych od pacjentów. Ponadto, wytypowano do ich oznaczeń technikę LC-FL z uwagi na naturalne właściwości fluorescencyjne antracyklin, które to sprawiają, że związki te nie wymagają derywatyzacji, a to znacznie uproszcza przebieg procedury przygotowania prób do analizy. Jednocześnie, gwarantuje osiągnięcie znacznie wyższej selektywności oraz czułości w porównaniu do analiz opartych na detektorach UV-VIS. Istotnym czynnikiem jest także to, że detekcja FL jest także konkurencyjna względem MS(MS), gdyż umożliwa monitorować niektóre anality na porównywalnym poziomie wartości parametrów LOD oraz LOQ. Tym samym, metody LC-FL oferują odpowiednią dokładnością, precyzją i czułością analiz bez ponoszenia wysokich nakładów finansowych na ich przeprowadzenie związanych z zakupem oraz serwisowaniem aparatury LC-MS(MS). Mogą być także stosowane w większości laboratoriów klinicznych i farmaceutycznych, gdyż aparatura LC-FL w porównaniu do LC-MS(MS) jest bardziej dostępna i prostsza w obsłudze i nie wymaga personelu o wysoce specjalistycznym przeszkoleniu.

Tematem przewodnim publikacji 5 było opracowanie metody LC-MS/MS do oznaczania docetakselu w ludzkim osoczu i moczu oraz potwierdzenie jej użyteczności w praktyce klinicznej. W tym przypadku, wybór techniki LC-MS/MS był uwarunkowany wymogami dotyczącymi poziomu stężeń leku, które są osiągane u pacjentów po podaniu tego leku we wlewie dożylnym. Metody chromatograficzne oparte na detekcji UV-VIS nie spełniają kryterium czułości oraz liniowości w zakresach stężeń oznaczanych w rzeczywistych próbkach klinicznych, a docetaksel nie wykazuje naturalnej fluorescencji, co narzuca konieczność derywatyzacji tego analitu przez analizą LC-FL. Tym samym procedura przygotowania prób byłaby skomplikowana i czasochłonna obniżając atrakcyjność tego rozwiązania analitycznego do zastosowań klinicznych.

Wszystkie badania kliniczne potwierdzające użyteczność opracowanych metod chromatograficznych, które opisane w publikacjach nr 1-3 i 5, były prowadzone we współpracy z Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (UCK) przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (GUMed). Badania te uzyskały zgodę Niezależnej Komisji Biotycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/232/2015, NKBBN/232/2018 i NKBBN/232-219/2021).

## **3.1. Publikacja 1.**

O. Maliszewska, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, Optimization of LC method for the quantification of doxorubicin in plasma and urine samples in view of pharmacokinetic, biomedical and drug monitoring therapy studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **2018**; vol. 158, s. 376-385.

***Wprowadzenie***

Jak wspominano we wstępie, coraz więcej ludzi choruje na choroby nowotworowe. Ten problem dotyka również dzieci, dla których dopasowanie określonej dawki leku jest szczególnie trudne z uwagi na fakt, iż w przypadku pacjentów pediatrycznych profile farmakokinetyczne oraz farmakodynamiczne leków mogą znacząco różnić się od tych u osób dorosłych. Tematem przewodnim pierwszej publikacji z cyklu doktorskiego było opracowanie nowej metody oznaczania doksorubicyny w próbkach osocza i moczu ludzkiego opartej na technice LC-FL do potencjalnych aplikacji w praktyce klinicznej, w tym onkologii dziecięcej. Z danych literaturowych wynikało wprawdzie, iż dotychczas opublikowane metody oznaczania tego cytostatyku w próbkach biologicznych były także w główniej mierze oparte na LC-FL [47]–[51] bądź alternatywnie LC-MS(MS) [52]–[55], ale jak wspomniano powyżej, duże zainteresowanie techniką LC-FL wynika z naturalnych właściwości fluorescencyjnych doksorubicyny, które umożliwiają projektowanie alternatywnych do LC-MS(MS) metod chromatograficznych opartych na pomiarze emisji promieniowania tego związku, którego to intensywność jest ściśle skorelowana ze stężeniem tego analitu w próbie, po jego wcześniejszym wzbudzeniu odpowiednio dobraną długością fali promieniowania w zakresie UV-VIS.

Z danych literaturowych wynikało, że dotychczas opracowane metody chromatograficzne, niezależnie od wybranego sposobu detekcji doksorubicyny w próbkach biologicznych, były oparte na deproteinizacji [47], [48], [50]–[52], [56], ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) [49], [57] oraz ekstrakcji do fazy stałej (SPE) [53], [58], [59][54]. W przypadku deproteinizacji - jako rozpuszczalnik strącający białka najczęściej wybierano MeOH [47], [51], [52] podczas gdy rozpuszczalnikiem ekstrahującym w LLE był chloroform (Chl) z dodatkiem acetonitrylu (ACN) oraz buforu fosforanowego [57] bądź mieszanina izopropanolu i Chl [49]. W metodach SPE dominowały złoża C18 [54], [59], chociaż doniesienia o zastosowaniu kolumienek z hydrofilowo-hydrofobową fazą stacjonarną (ang. *Hydrophilic Lipophilic Balance*, HLB) były również opublikowane [48], [58]. Dane literaturowe wskazywały także, że analiza LC była prowadzona w odwróconym układzie faz, a monitorowanie doksorubicyny za pomocą detektora FL prowadzono przy długości fali wzbudzenia w zakresie 470-480 nm, oraz fali emisji pomiędzy 548-560 nm [47], [49]–[51], [59]. Ponadto, odnotowane, że niektóre z dotychczasowych metod oznaczania doksorubicyny charakteryzują się długim czasem przygotowania prób do analizy LC [49], relatywnie wysokimi objętościami próbki wymaganymi do analizy (≥ 1 ml) [47], [48], [50]–[52], [56], niską wydajnością ekstrakcji [53]–[55], [60], długim czasem analizy chromatograficznej (≥ powyżej 15 min) [47], [51], [54], [55], [57]–[60], wysokimi poziomami LOD [47], [48], [50], [51], [56], [59], jak również brakiem potwierdzenia użyteczności danej metody chromatograficznej w praktyce klinicznej [48], [55], [56], [58].

Ze względu na coraz częstsze podkreślanie znaczenia TDM w praktyce onkologicznej, zwłaszcza dziecięcej, zdecydowano się zatem na opracowanie metody pozwalającej kontrolować stężenie doksorubicyny w płynach ustrojowych dzieci poddanych chemioterapii, która nie będzie wymagała dużej objętości próbki do analiz i będzie oparta na technice powszechnie dostępnej w laboratoriach przyszpitalnych i klinicznych.

***Część doświadczalna i wyniki badań***

Pierwszym etapem optymalizacji metody oznaczania doksorubicyny w materiale biologicznym było opracowanie warunków analizy chromatograficznej oraz parametrów pracy detektora FL. W tym celu włączono do badań cztery kolumny chromatograficzne: Discovery ® HS C18, Synergy 4µ Hydro-RP 80A, InertSustianTM C18 oraz Synergy 4µ Max-RP o zróżnicowanych parametrach dotyczących rodzaju złoża (C12 i C18), długości kolumny, wielkości ziarna czy średnicy kolumny. Wśród nich, najlepsze rezultaty otrzymano po zastosowaniu Discovery HS C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, która użyto w temperaturze 30oC. W tych analizach, faza ruchoma składała się z ACN i 0,1 % kwasu mrówkowego w wodzie w proporcji 33:67, (*v*/*v*) dla próbek osocza oraz w proporcji 32:68, (*v*/*v)* dla próbek moczu. Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min. Objętość próbek do analizy wynosiła odpowiednio: 30 µl dla stężeń doksorubicyny ≤ 1 µg/ml oraz 5 µl dla próbek zawierających ten cytostatyk w zakresie 5-25 µg/ml. Jako wzorzec wewnętrzny (ang. *Internal Standard*, IS) wytypowano daunorubicynę. Ten wybór był podyktowany jej zbliżoną budowę chemiczną do oznaczanego związku (Ryc. 1.), która to gwarantowała porównywalny charakter oddziaływań fizykochemicznych występujących podczas izolacji tego analitu z matrycy biologicznej oraz separacji chromatograficznej. Czas retencji tej antracykliny był także optymalny względem doksorubicyny. Badane związki monitorowano przy długościach fali wzbudzenia λ = 487 nm oraz fali emisji λ = 555 nm.

Kolejnym etapem badań było opracowanie optymalnych warunków ekstrakcji doksorubicyny z próbek osocza oraz moczu. W tym celu sprawdzono różne warianty ekstrakcji tj. deproteinizację, LLE oraz SPE, a wszystkie analizy wykonywano dla objętości próbek osocza 0,25 ml i 0,5 ml moczu. W pierwszej kolejności, w ramach eksperymentów opartych na deproteinizacji, zastosowano MeOH, ACN oraz mieszaninę ACN:MEOH (1:1, *v*/*v*). Wśród tych procedur, najwyższą wydajność ekstrakcji doksorubicyny otrzymano po zastosowania ACN, która dla próbek osocza oraz moczu wynosiła odpowiednio 57,4 ± 6,1 % oraz 68,2 ± 5,4 %. W ramach LLE stosowano octan etylu, dichlorometan (DCHM) oraz mieszaninę Chl z MeOH (4:1, *v*/*v*). Spośród wymienionych rozpuszczalników, najwyższe wyniki ekstrakcji gwarantowało zastosowanie mieszaniny Chl z MeOH, dla której wydajność w przypadku próbek osocza wynosiła 51,6 ± 11,3 %, a dla próbek moczu 58,6 ± 12,7%. Kolejnym etapem badań było testowanie procedur opartych na SPE z użyciem kolumienek LiChrolut C18 (100 mg, 1 ml) oraz Supel Select HLB (60 mg, 3 ml). Ostatecznie, do dalszych badań zastosowano kolumienki HLB, gdyż gwarantowały nieznacznie wyższe wyniki wydajności ekstrakcji. W przypadku próbek osocza, wartości te dla doksorubicyny wynosiły 68,1 ± 5,3 %, a dla moczu 75,8 ± 8,2 % w porównaniu do 66,8 ± 6,9 % oraz 74,1 ± 9,0 % odnotowanych dla kolumienek C18. Podczas optymalizacji ekstrakcji SPE, sprawdzano także wpływ zmiany pH matrycy próbki (0,05 M HCl, 0,1 M HCl, 0,2 M HCl) bądź dodatek modyfikatora organicznego (MeOH) na efektywność procesu SPE. Ponadto, oceniano efektywność różnorodnych odczynników do przemywana złoża kolumienek (woda, MeOH:H2O (1:9, *v/v*), ACN:H2O (1:9, *v/v*), 0,01 M HCl) i elucji analitów (MeOH, MeOH:0,1 M HCl (9:1, *v/v*), ACN, ACN:MeOH (1:1, *v/v*), DCHM:2-propranol (1:1, *v/v*)). Najwyższą wydajność ekstrakcji doksorubicyny wyznaczono po zastosowaniu 0,1 M kwasu solnego do modyfikacji pH matrycy próbki osoczu/moczu przez ekstrakcją SPE, a także wody i MeOH jako odczynników do przemywania oraz elucji badanych analitów. Wydajność tego procesu dla prób osocza i moczu wynosiła odpowiednio 97,4 ± 6,6 % oraz 99,4 ± 7,1 %. Wydajność ta była wyższa [49], [51], w odniesieniu do wcześniej opublikowanych procedur izolacji doksorubicyny z próbek biologicznych.

Opracowaną metodę SPE-LC-FL do oznaczania doksorubicyny w próbkach osocza oraz moczu ludzkiego zwalidowano zgodnie z kryteriami FDA i ICH. Potwierdzono selektywność metody (Fig. 1. w publikacji 1) oraz wykazano jej liniowość w zakresie 1-1000 ng/ml dla próbek osocza i 0,001-25 µg/ml dla próbek moczu. Parametry LOD i LOQ wynosiły odpowiednio 0,5 i 1 ng/ml, zarówno dla próbek osocza, jak i moczu, co dowodzi, że były niższe [47], [48], [50]–[52], [56], [59] bądź porównywalne [53] do wcześnie opublikowanych dla protokołów analitycznych dotyczących oznaczeń doksorubicyny w matrycach biologicznych. Precyzja, jak również dokładność, mieściły się w wymaganych zakresach wyznaczonych dla metod bioanalitycznych (Tabela 3. w publikacji 1). Przeprowadzono także badania dotyczące oceny stabilności wzorcowych roztworów doksorubicyny oraz próbek biologicznych zawierających ten cytostatyk, które to przechowywano w zróżnicowanych warunkach eksperymentalnych. Uzyskane dane potwierdziły, że doksorubicyna jest stabilna i może być oznaczana w opracowanych warunkach SPE-LC-FL.

Tym samym zgromadzone dane walidacyjne udowodniły, że opracowana metoda SPE-LC-FL może być zastosowana do badań klinicznych.

Kolejnym etapem badań było potwierdzenie użyteczności opracowanej metody chromatograficznej do kontroli stężenia doksorubicyny w próbach pobranych od pacjentów onkologicznych. W pierwszym przypadku, pacjentem był 15-letni chłopiec z HL, który otrzymywał leki przeciwnowotworowe zgodnie ze schematem II kursu OEPA (winkrystyna, etopozyd, prednizon, doksorubicyna). Doksorubicyna była podawana w pojedynczym 4 h wlewie dożylnym w dawce 40 mg/m2 powierzchni ciała. Próbki osocza i moczu pobierano przez przed podaniem leku oraz w określonych przedziałach czasowych przez 48 h od rozpoczęcia wlewu dożylnego.

W drugim badaniu, pacjentem był 17-letni chłopiec z RMS obszaru głowy i szyi, który otrzymywał chemioterapię w schemacie IOA (ifosfamid, winkrystyna, doksorubicyna). Doksorubicyna była podawana w dwóch wlewach dożylnych w 12 godzinnym odstępie czasowym, każdy wlew był 4 h w dawce 20 mg/m2 powierzchni ciała. Próbki osocza i moczu pobierano przed rozpoczęciem, a także w określonych przedziałach czasowych do 36 h od rozpoczęcia pierwszego wlewu.

Zebrane próbki analizowano z zastosowaniem opracowanej metody SPE-LC-FL, a uzyskane profile stężeń doksorubicyny wskazały, że w przypadku pierwszego pacjenta stężenie maksymalne (Cmax) leku w osoczu oznaczono w 4 h po podaniu (252,2 ng/ml) (Fig. 3. w publikacji 1). Po osiągnięciu Cmax, poziom doksorubicyny spadał do 6 h, a następnie podnosił się do wartości 38 ng/ml (10 h), aby po ponownym obniżeniu, wzroście i spadku osiągnąć 10,7 ng/ml w 48 h po podaniu leku. Profil ten, jak i wartość Cmax była porównywalna do danych opisanych w literaturze, co dowodzi, że ten cytostatyk nie wchodzi w interakcje z innymi lekami protokołu OEPA [61]–[63]. Należy także zauważyć, że w przypadku moczu, najwyższe stężenie (17868,8 ng/ml) odnotowano dla próbki zebranej w przedziale 0-4 h, co wskazuje, że ten poziom był prawie 70 razy wyższy niż w osoczu w tym samym czasie. W kolejnych przedziałach czasowych stężenie leku malało do wartości 427,4 mg/ml w 48 h od rozpoczęcia wlewu. Tak wysoki poziom może wskazywać na potencjalne ryzyko narażenia personelu medycznego oraz członków rodziny/opiekunów na negatywne skutki działania doksorubicyny w bezpośrednim kontakcie z moczem pacjenta.

W drugim przypadku, Cmax analizowanego leku także było oznaczone w 4 h po rozpoczęciu wlewu, ale na niższym poziomie (98,4 ng/ml), gdy w moczu w tym samym przedziale czasowym (0-4 h) jego maksymalne stężenie było 95-krotnie wyższe niż w osoczu (9436,2 ng/ml) (Fig. 4. w publikacji 1). W kolejnym przedziale czasowym stężenie doksorubicyny w osoczu malało, aby w 8 h ponownie wzrosnąć do 42,7 ng/ml. Z uwagi na fakt, iż w schemacie IOA podanie leku było dwukrotne, a nie pobrano próbek tuż przed i zaraz po drugim podaniu leku, kolejne Cmax obliczono na podstawie programu komputerowego NON-MEM określając wartość na poziomie 132,6 ng/ml i czas jego osiągnięcia na 17 h od rozpoczęcia pierwszego wlewu. W kolejnych pomiarach, stężenie malało aż do uzyskania poziomu 8,7 ng/ml w 36 h od rozpoczęcia pierwszego wlewu. Powyższy profil stężeń doksorubicyny w osoczu był porównywalny do danych literaturowych odnoszących się do farmakokinetyki doksorubicyny po podaniu zgodnie z protokołem IOA [64]. Jednakże, pomimo prostoty i braku inwazyjności w pobieraniu próbek moczu brakuje kompletnych danych opisujących poziom stężeń doksorubicyny w tej matrycy biologicznej. Jak wspomniano powyżej, u pacjenta leczonego zgodnie z protokołem IOA także odnotowano bardzo wysokie stężenie tego leku w pierwszych godzinach po podaniu, które utrzymywało się na relatywnie wysokim poziomie do 36 h. To zaś potwierdza, że istnieje pewne ryzyko ekspozycji na doksorubicynę osób mających kontakt z moczem pacjenta. Takie ryzyko wskazywał Sottani i współ. [55], ale nie potwierdził tego rzeczywistymi danymi klinicznymi. Zgromadzone wyniki mogą zatem stanowić cenne źródło informacji na temat pełnego profilu farmakokinetycznego doksorubicyny u pacjentów.

***Wnioski***

Wynikiem przeprowadzonych badań było opracowanie nowej metody chromatograficznej z detekcją fluorescencyjną do oznaczania doksorubicyny z próbek osocza oraz moczu ludzkiego, która charakteryzuje się wysoką dokładnością oraz precyzją, jak również niskimi wartościami parametrów LOD oraz LOQ, w porównaniu do wcześniej opracowanych metod opartych na detekcji FL bądź MS(MS). Zaletą tej metody jest krótki czas analizy wynoszący 8 min dla obu matryc biologicznych. Dodatkową korzyścią jest niewielka objętości próbki (dla prób osocza 0,25 ml, a dla moczu 0,5 ml) wymagana do przeprowadzenia analizy SPE-LC-FL, co w przypadku pacjentów pediatrycznych jest istotnym czynnikiem zwiększającym potencjał aplikacyjny metody w praktyce klinicznej. Dodatkowo, po raz pierwszy zaproponowano zakwaszenie próbek biologicznych 0,1 M HCl przed procedurą SPE, co poprawiło efektywność tego procesu. Potwierdzono, że zaproponowana metoda SPE-LC-FL może być stosowana w laboratorium klinicznym do monitorowania stężenia doksorubicyny u pacjentów poddanych chemioterapii, w tym zgodnie z protokołami OEPA oraz IOA. Co więcej, opracowana metoda umożliwia analizę zarówno próbek osocza, jak i moczu, co jest istotne, gdyż w literaturze brakuje danych opisujących profil zmian stężeń doksorubicyny w tej drugiej matrycy biologicznej. To ważny aspekt z uwagi na wskazanie potencjalnego ryzyka narażenia personelu medycznego, jak również opiekunów pacjentów przyjmujących doksorubicynę na negatywne skutki działania tego leku w kontakcie z moczem pacjenta po podaniu leku.

## **3.2. Publikacja 2.**

N. Treder, O. Maliszewska, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, A. Plenis, Development and validation of a high-performace liquid chromatographic method with a fluorescence detector for the analysis of epirubicin in human urine and plasma, and its application in drug monitoring, *J. Chromatogr. B*., **2019**; vol. 1136, art. 121910, s. 1-8

***Wprowadzenie***

Literatura naukowa opisująca dotychczasowe metody monitorowania epirubicyny w materiałach biologicznych skupiała się głównie na oznaczaniu tego leku w osoczu i surowicy [58], [65]–[76], gdy od 2013 roku nie ukazała się żadna publikacja, która opisywałaby procedurę oznaczania epirubicyny w moczu, a jej użyteczność została potwierdzona podczas analizy rzeczywistych próbek pochodzących od pacjentów onkologicznych. W związku z tym zdecydowano się opracować metodę LC-FL do oznaczania epirubicyny w osoczu i moczu, a następnie ocenić jej przydatność w praktyce klinicznej. Na podstawie danych literaturowych ustalono, że wśród procedur przygotowania prób najczęściej stosowano deproteinizację [69], [73], [74], LLE [68], [72], [73], [76] a także SPE z kolumienkami C2 [74], C8 [77] i C18 [54], [55], [65], [66], [75], [78] oraz HLB [58], [70], [71], [79]. Separację chromatograficzną prowadzono w odwróconym układzie faz, a epirubicynę monitorowano za pomocą detektora UV-VIS [67], [70], FL [68], [69], [72]–[74], [77], [80] bądź MS(MS) [54], [55], [66], [71], [78], [79]. Jednakże, ograniczeniami tych metod był długi czas analizy LC (≥ 14 min) [66], [67], [69], [71]–[76], wysokie wartości LOD [66], [67], [69]–[71], [73]–[76] bądź brak zastosowań do analizy rzeczywistych próbek pochodzących od pacjentów [54], [55], [65], [66], [68], [70], [74]–[77]. Z tego względu rozpoczęto eksperymenty, aby opracować nową metodę LC-FL oznaczania epirubicyny w osoczu i moczu o potwierdzonej użyteczności w praktyce klinicznej.

***Część doświadczalna i wyniki badań***

W ramach optymalizacji warunków analizy chromatograficznej przetestowano sześć kolumn analitycznych o różnicowanych wymiarach zawierających złoża krzemionkowe modyfikowane grupami C18, C12 oraz fenylowymi, a jako fazy ruchome używano mieszanin MeOH oraz ACN z fazą wodną (0,1 % kwasu mrówkowego w wodzie, roztwór 85 % kwasu ortofosforowego wodzie o pH 2,7 oraz 40 mM roztwór buforu fosforanowego o pH 4,1) w różnych proporcjach, przy zachowaniu stałego przepływu fazy ruchomej na poziomie 1 ml/min. Jako potencjalne IS testowano daunorubicynę, doksorubicynę oraz idarubicynę. Ostatecznie ustalono, że najbardziej optymalne wyniki rozdzieleń chromatograficznych epirubicyny techniką LC-FL uzyskano wówczas, gdy separację analitów prowadzono na kolumnie Synergi Hydro-RP 80A, 150 x 4,6, 4 µm w temperaturze 30 oC w warunkach elucji izokratycznej fazy ruchomej składającej się z mieszaniny 40 mM buforu fosforanowego o pH 4,1 oraz ACN (69:31, *v*/*v*). Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min, a objętość nastrzyku 15 µl. Epirubicynę i daunorubicynę jako IS monitorowano przy długość fali wzbudzenia i emisji wynoszącej odpowiednio λ = 497 nm i λ = 557 nm. Całkowity czas analizy wynosił 8 min i był krótszy, niż we wcześniej opublikowanych procedurach chromatograficznych [58], [66], [68]–[76].

W kolejnym etapie optymalizowano proces ekstrakcji wykonując różnorodne procedury deproteinizacji, ekstrakcji LLE oraz SPE dla próbek osocza i moczu o objętości odpowiednio 0,25 i 0,5 ml. Na podstawie otrzymanych wyników potwierdzono m.in., że w przypadku deproteinizacji za pomocą ACN, dodatek siarczanu cynku poprawiał wydajność tego procesu. Z kolei zastosowanie LLE z użyciem mieszaniny DCHM i 2-propanolu (1:1, *v*/*v*) było bardziej efektywne niż DCHM. W przypadku ekstrakcji SPE przeprowadzono najwięcej modyfikacji, które dotyczyły m.in. doboru odpowiedniego złoża do ekstrakcji (C18, HLB), modyfikacji matrycy próbki przed SPE (rozcieńczenie wodą, zakwaszenie 0,1 M HCl lub dodaniu 40% siarczanu cynku w wodzie bądź w roztworze HCl) oraz różne odczynniki służące do elucji badanych związków (MeOH, mieszanina DCHM:2 propanol (1:1 oraz 2:1, *v/v*) a także DCHM:2-propanol:MeOH (2:1:1, *v/v/v*). Przykładowo ustalono, że modyfikacja matrycy próbki przez SPE za pomocą 40% roztworu siarczanu cynku w wodzie jest bardzo efektywna dla próbek moczu (wysoki stopień odzysku analitu i oczyszczenia matrycy z substancji interferujących) ale nie może być użyta dla próbek osocza. Wynika to prawdopodobnie z powodu tworzenia soli z oznaczanym związkiem i/lub strącaniem tego kompleksu z białkami, co powoduje nadmierne straty analitu i obniża jego stopień wiązania się ze złożem SPE. Ostatecznie, spośród wszystkich testowanych procedur, w przypadku próbek osocza najlepsze rezultaty otrzymano po modyfikacji matrycy próbki przez SPE za pomocą 0,1 M kwasu solnego, a w przypadku moczu - 40 % wodnym roztworem siarczanu cynku. Następnie, przeprowadzenie SPE ze złożem HLB, przemyciu złoża wodą oraz zastosowanie mieszaniny DCHM z 2-propanolem i MeOH w proporcji (1:1:1, *v*/*v*/*v*) do elucji analitów ze złoża. Wydajność tego procesu dla epirubicyny wynosiła 100,7 % dla prób osocza, natomiast dla moczu była na poziomie 95,6 %. Po raz pierwszy zaproponowano modyfikację matrycy próbki przed SPE za pomocą 0,1 M HCl (osocze) bądź 40% wodnego roztworu siarczanu cynku, co poniosło efektywność ekstrakcji i pozwoliło zredukować wymaganą objętość próbki do 0,25 ml dla osocza i 0,5 ml dla moczu, które są niższe niż opublikowane dla wcześniej opracowanych procedur przygotowania prób do analizy LC [54], [55], [65], [66], [68], [71]–[74], [76]–[78].

Kolejnym krokiem była walidacja metody analitycznej. W pierwszym etapie potwierdzono selektywność metody (Fig. 1 i 2. w publikacji 2). Liniowość metody dla prób osocza była udowodniona w zakresie 1-1500 ng/ml, a dla moczu 1- 10 000 ng/ml. Wartości LOD oraz LOQ dla epirubicyny w próbkach osocza i moczu wynosiły odpowiednio 0,25 i 0,5 ng/ml (Tabela 1. w publikacji 2). Wartości te było niższe względem parametrów uzyskanych dla wcześniej opublikowanych metod chromatograficznych [65]–[69], [73]–[77], [79], [80]. Z kolei precyzja i dokładność były w granicach wyznaczonych przez kryteria walidacyjne FDA i ICH (Tabela 2. w publikacji 2). Udowodniono także stabilność roztworów wzorcowych oraz próbek zawierających epirubicynę przechowywanych w różnorodnych warunkach eksperymentalnych (Supplementary Data, Tabela S3).

Następnie opracowana metoda została zastosowana do oznaczania stężeń epirubicyny w próbkach osocza i moczu pobranych od 19-letniego pacjenta chorego na RMA, który otrzymywał ten lek w 6 godzinnym wlewie w dawce 150 mg/m2 powierzchni ciała. Od tego pacjenta, próbki pobierano w określonych odstępach czasowych przez 24 h od zakończenia wlewu. Najwyższe stężenie epirubicyny w osoczu oznaczono na koniec wlewu (304,8 ng/ml) (Fig 4. w publikacji 2). Następnie poziom leku malał do 10 h od podania (48,7 ng/ml), minimalnie wzrósł w 12 h (54,1 ng/ml), aby w 24 h od wlewu ukształtować się na poziomie 22,5 ng/ml. Wyznaczony profil stężenia oznaczanego leku w moczu wskazywał, że w pierwszych godzinach od zakończenia wlewu oznaczono najwyższy poziom epirubicyny (9964,3 ng/ml) (Fig. 5. w publikacji 2). Poziom ten w kolejnych przedziałach czasowych obniżył się do 1371,4 ng/ml, natomiast ponownie wzrósł do 2443,6 ng/ml, aby ostatnim badanym przedziale czasowy (26-30 h) osiągnąć wartość na poziomie 1444,2 ng/ml.

Dane, które uzyskano w ramach badań świadczą o fluktuacji stężeń epirubicyny w profilach osocza i moczu, co może świadczyć o indywidualnych różnicach w farmakokinetyce tego leku obserwowanymi pomiędzy pacjentami. Jednakże brak danych literaturowych opisujących rzeczywiste poziomy tego cytostatyku w próbkach otrzymanych od pacjentów, którzy przyjęli ten lek w tej samej dawce uniemożliwią porównanie tych danych (Supplementary Data, Tabela S2). Ponadto poprzednie badania opisywały farmakokinetykę tego leku po podaniu mniejszej dawki (< 150 mg/m2 powierzchni ciała).

Jednakże, na podstawie badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykazano, że poziom stężeń epirubicyny w moczu jest wysoki i narzuca konieczność restrykcyjnego przestrzegania procedur szpitalnych, aby ryzyko ekspozycji na epirubicynę w kontakcie z moczem pacjenta było jak najniższe.

***Wnioski***

Podsumowując, zoptymalizowano warunki izolacji analitu z osocza i moczu ludzkiego z użyciem procedury SPE bazującej na kolumienkach HLB, które gwarantowały wysoki poziom oczyszczenia i izolacji badanych związków (epirubicyny i daunorubicyny jako IS) z testowanych matryc. Dodatkowym atutem opracowanej procedury SPE była mała objętość próby wymagana do jej przeprowadzenia (0,25 ml osocza i 0,5 ml moczu). Relatywnie krótki czas analizy chromatograficznej (8 min) i możliwość wykrywania i oznaczania tego cytostatyku na niższym poziomie LOD i LOQ niż wartości prezentowane we wcześniej opublikowanych metodach zwiększają możliwości aplikacyjne tej metody w praktyce klinicznej. Dodatkowo, jej użyteczność została potwierdzona doświadczalnie w trakcie analizy rzeczywistych próbek pobranych od pacjenta przyjmującego epirubicynę. Jak dotąd, w literaturze nie opisano zastosowania metody oznaczania epirubicyny w obu matrycach, pomimo iż mocz jest jedną z dróg eliminacji tego leku. Zatem, opracowana procedura LC-FL może stanowić alternatywną metodę do badań farmakokinetycznych i klinicznych, które wymagają analizy próbek pochodzących z obu matryc biologicznych. Wykazano także, że poziom epirubicyny w moczu jest znacząco wyższy niż w osoczu, co powinno być uwzględnione przez personel i osoby opiekujące się pacjentem.

## **3.3. Publikacja 3.**

O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, W. Rodzaj, E. Bień, M.A. Krawczyk, A. Plenis, Sensitive Analysis of Idarubicin in Human Urine and Plasma by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: An Application in Drug Monitoring, *Molecules,* **2020** Dec 9;25(24):5799

***Wprowadzenie***

Jak wspomniano we wstępie, idarubicyna to jedyny cytostatyk należący do grupy antybiotyków antracyklinowych, który może być podawany nie tylko dożylnie, ale również doustnie [81]. Jednakże, w literaturze naukowej brakuje aktualnych danych dotyczących monitorowania tego leku w próbkach osocza i moczu pochodzących od pacjentów pomimo ciągłego stosowania tego leku w praktyce onkologicznej. Ze zgromadzonych danych wynikało, iż metodyki, które dotyczyły oznaczania idarubicyny w osoczu wykazywały długi czas analizy (≥15 min) [66], [68], [82], [83], jak również wymagały relatywnie dużej ilości próbki biologicznej [84]. W nie podano także pełnej walidacji metody pomimo prezentowania LOQ na poziomie 0,1 ng/ml [84]. W innych pracach wskazano, że LOQ wyniosło ≥ 0,5 ng/ml, podczas gdy w przypadku doustnego podania leku w niskiej dawce (10 mg), ten poziom może być zbyt wysoki [84], [85]. Dane literaturowe dowodziły także, że w dotychczas opracowane procedury przygotowania prób bazowały na zastosowaniu deproteinizacji [86], LLE [68], [87], [88] bądź SPE z użyciem kolumienek C18 [55], [84], [89]–[92]. Brakowało natomiast doniesień opisujących procedury z zastosowaniem SPE bazującej na innych złożach fazy stacjonarnej, jak również SPME. Tym samym, zainteresowano się tym tematem, aby zaproponować aktualną metodę LC-FL wraz z jej pełną walidacją oraz aplikacją kliniczną do monitorowania idarubicyny w osoczu i moczu ludzkim.

***Część doświadczalna i wyniki badań***

W trakcie optymalizowania warunków rozdzielenia chromatograficznego sprawdzano sześć kolumn analitycznych (Discovery® HS C18 o dwóch różnych długościach (150 i 250 mm), Synergi 4µ Hydro-RP 80A 150, Synergi 4µ MAX-RP 80A 150, InertSustian C18 150 oraz Hypersil BDS C18), jak i zmieniano skład procentowy fazy ruchomej będącej mieszaniną 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie (A) i ACN (B) (A – od 63 do 75 % oraz B – od 37 do 25 %). Temperatura kolumny, podobnie jak w poprzednich pracach, wynosiła 30 oC. Najefektywniejsze rozdzielenie analitów (idarubicyny i daunorubicyny użytej jako IS) oraz kształt ich pików otrzymano po zastosowaniu kolumny Discovery HS C18, 250 x 4.6, 5 µm, gdy jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę A:B w proporcjach 67:33, (*v*/*v*) dla próbek osocza oraz 68:32, (*v*/*v*) dla próbek moczu. Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min, a objętość nastrzyku była na poziomie 20 µl. Anality monitorowano przy długość fali wzbudzenia i emisji wynoszącej odpowiednio λ= 487 nm i λ= 547 nm.

Następnie, podjęto badania dotyczące opracowania protokołu izolacji idarubicyny z osocza i moczu. W pierwszej kolejności zastosowano deproteinizację, w ramach której użyto ACN. Ponadto, przeprowadzono szereg procedur LLE, gdzie zastosowano łącznie 9 rodzajów odczynników. Wśród nich, testowano DCHM oraz mieszaniny Chl z MeOH, 1-propranolem bądź 2-propranolem. Oceniano także wpływ NaOH, jak również buforu fosforanowego (pH 8,5) na wydajność ekstrakcji prowadząc ten proces w dwóch wariantach tj. bez użycia ultradźwięków, jak i w połączeniu z ultradźwiękami w temperaturze 37°C przez 10 min. W przypadku prób osocza oraz moczu, najwyższe wyniki ekstrakcji idarubicyny otrzymano po zastosowaniu mieszaniny Chl: 2-propanol (4:1, *v/v*) bez wspomagania ultradźwiękami. Kolejne eksperymenty dotyczyły ekstrakcji SPE bazującej na złożach C18 (40 mg) oraz HLB (30 mg). Badane próbki przed ekstrakcją zakwaszano 0,1 M kwasem solnym, oceniano zastosowanie buforu fosforanowego (pH 8,5) bądź alkalizacji za pomocą 1 M NaOH, a także wpływ ultradźwięków. Do przemywania złoża używano wody, natomiast do elucji analitów testowano różnorodne odczynniki (MeOH, ACN:MeOH (1:1, *v*/*v*), DCHM:2-propanol (1:1, *v*/*v*). Najwyższą wydajność ekstrakcji idarubicyny osiągnięto stosując kolumienki SPE ze złożem HLB, 0,1 M kwas solny do modyfikacji pH matrycy próby biologicznej, wodę do przemywania złoża oraz MeOH do elucji analitów ze złoża. Dla osocza, efektywność tego procesu wynosiła 99,4 ± 4,0 %, a dla moczu 95,2 ± 3,7 %. Ostatni wariant badań dotyczył eksperymentów opartych na procedurze SPME. Jak bowiem wspomniano, w literaturze brakuje opisu tej techniki w kontekście ekstrakcji idarubicyny z płynów ustrojowych. W tym celu, do izolacji tej antracykliny z próbek biologicznych zastosowano złoże C18, które kondycjonowano w mieszaninie MeOH z wodą w proporcji (1:1, *v*/*v*). Następnie, próbki zakwaszono 0,1 M kwasem solnym i poddano ekstrakcji trwającej 100 min, przemywano wodą (10 s) oraz poddano desorpcji stosując sześć wariantów mieszanin. Najwyższą wydajność dla tej techniki uzyskano, gdy jako rozpuszczalnik desorbujący użyto DCHM:2-propanol (1:1, *v*/*v*). Efektywność tego procesu była wówczas na poziomie 59,2 ± 3,1 % dla prób osocza oraz 58,5 ± 2,7 % dla prób moczu. To oznacza, że SPME jest mniej efektywną procedurą niż SPE, ale może być stosowane do izolacji idarubicyny z próbek pochodzących od pacjentów, dla których ten cytostatyk jest podawany w wyższych dawkach (lek będzie osiągał wówczas wyższe poziomy stężeń).

Podsumowując wyniki badań dotyczące optymalizacji procedury przygotowania prób do analizy LC-FL najbardziej optymalną metodą do ekstrakcji idarubicyny z 1 ml moczu oraz 0,5 ml osocza było SPE ze złożem HLB, zakwaszenie prób 0,1 M kwasem solnym oraz zastosowanie wody do przemywania złoża i MeOH do elucji analitów.

Kolejnym etapem była walidacja opracowanej metody. Potwierdzono selektywność (Fig. 4 i 5. w publikacji 3) i liniowość w zakresie 0,1-50 ng/ml dla prób osocza oraz w zakresie 0,25-200 ng/ml dla prób moczu. LOD oraz LOQ dla prób osocza wynosiło 0,05 i 0,1 ng/ml, gdy dla moczu było na poziomie 0,125 oraz 0,25 ng/ml. Dokładność oraz precyzja mieściły się w granicach wyznaczonych przez kryteria metod analitycznych (Tabela 3. w publikacji 3), a roztwory idarubicyny oraz próbki zawierające ten cytostatyk były stabilne w testowanych warunkach eksperymentalnych (Tabela S2. w Supplementary Data).

Opracowaną i poddaną walidacji metodę zastosowano do oznaczania idarubicyny w materiale biologicznym pobranym od 17-letniego pacjenta chorego na RMA, który otrzymywał idarubicynę doustnie w dawce 10 mg. Lek był przyjmowany 1, 4, 7 oraz 10 dnia terapii zgodnie ze schematem O-TIDA/O-TE (trofosfamid, idarubicyna, etopozyd) według protokołu *Cooperative Weichteilsarkom Study Group* (CWS)-2006. Próbki krwi oraz moczu były pobierane 1 oraz 10 dnia leczenia onkologicznego. W przypadku podania leku pierwszego dnia, w osoczu stężenie leku wzrastało do osiągnięcia maksymalnego poziomu w czwartej godzinie od momentu podania leku i wynosiło 1,44 ng/ml (Fig. 2. w publikacji 3). W kolejnych przedziałach czasowych poziom leku zmniejszał się do wartości 0,31 ng/ml w 24 h od podania leku. Podobny profil zaobserwowano po analizie próbek otrzymanych po podaniu leku 10 dnia terapii. Stężenie Cmax osiągnięto również w 4 h od momentu podania leku i wynosiło 1,81 ng/ml, natomiast w kolejnych godzinach malało do wartości 0,44 ng/ml (24 h). Profile idarubicyny w moczu w pierwszym i dziesiątym dniu leczenia wskazywały, że stężenie w moczu w przedziale 12-20 h od momentu podania leku wzrastało odpowiednio do stężenia 142,33 ng/ml (1 dzień) i 159,91 ng/ml (10 dzień) (Fig. 3. w publikacji 3). Po tym punkcie czasowym, stężenie leku malało.

The dane dowodzą, że uzyskane profile leku w moczu są 100 i 90 razy wyższe niż obliczone dla prób osocza. Ponadto, powyższe badanie wskazuje, że idarubicyna utrzymuje się w osoczu oraz moczu do 24 h po podaniu także w przypadku podania doustnego, gdy dawka leku jest relatywnie niska. Badania te dowodzą także, że niezależnie od formy podania antracykliny, stężenie leku jest zawsze wyższe w moczu niż osoczu.

***Wnioski***

Opracowano nową metodę LC-FL do oznaczania idarubicyny w próbach osocza   
i moczu ludzkiego, w której procedura SPE ze złożem HLB do izolacji idarubicyny z matrycy biologicznej została opisana w literaturze po raz pierwszy. Ponadto, objętość próbki wymaganej do jej przeprowadzenia jest mniejsza w porównaniu do opracowanych dotąd procedur (1 ml moczu oraz 0,5 ml osocza). Dodatkowo czas analizy chromatograficznej jest krótszy niż dotychczasowe metody i wynosi 8 min dla prób osocza i 10 min dla prób moczu. Zaprezentowano także użyteczność nowej metody SPE-LC-FL do oznaczania stężenia idarubicyny w osoczu i moczu pacjenta przyjmującego idarubicynę doustnie w schemacie O-TIDA, O-TE. Ta procedura może być zatem interesującą alternatywną dla dotychczas opublikowanych metod chromatograficznych. Ponadto, po raz pierwszy została opracowano procedura SPME do izolacji idarubicyny, która mogłaby być stosowana do przygotowania prób pacjentów w praktyce klinicznej, gdyby lek podawano pacjentom w wyższych dawkach w formie doustniej bądź we wlewie dożylnym.

## **3.4. Publikacja 4.**

O. Maliszewska, N. Treder, A. Roszkowska, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, A. Plenis, Comparative Study of Various Procedures for Extracting Doxorubicin from Animal Tissue Samples, *Separations* **2023**, *10*, 6

***Wprowadzenie***

Jak już wspominano we wstępie, wprowadzanie nowych substancji leczniczych bądź tych już zarejestrowanych, ale zaprojektowanych w nowych postaciach do podania wiąże się dużą ilością badań i testów klinicznych potwierdzających ich skuteczność terapeutyczną. To wymaga m.in. prowadzenia badań na zwierzętach laboratoryjnych, a zatem konieczne jest zastosowanie odpowiednich metod analitycznych, które pozwolą oznaczyć badane leki w tkankach zwierzęcych. Niestety, ze względu na złożoną matrycę, jaką jest tkanka zwierzęca, izolacja wybranych analitów jest trudna. Z tego względu, stale poszukuje się nowych, efektywnych procedur umożliwiających ekstrakcję substancji czynnych, w tym cytostatyków, z tkanki zwierzęcej, które będą mogły być stosowane w badaniach farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych. Przykładem jest doksorubicyna, dla której testuje się szereg nowych postaci leku, np. liposomalnej, aby zwiększyć efektywność leczenia przy redukcji działań ubocznych. W nawiązaniu do tych potrzeb, tematem czwartej publikacji było rozszerzenie zastosowania wcześniej opracowanej metody oznaczania doksorubicyny w płynach fizjologicznych (publikacja 1) do monitorowania tego leku w tkankach zwierzęcych. Z danych literaturowych wynikało, że wśród technik ekstrakcji popularną techniką była deproteinizacja z użyciem MeOH [93] i ACN [94], acetonu z siarczanem cynku [95], [96], 35 % kwasu nadchlorowego [97] oraz LLE z użyciem mieszaniny Chl z MeOH [98], [99] oraz Chl z izopropanolem [100]. Pomimo pewnych zalet, takich jak łatwość wykonania tych procedury, posiadają one także wady tj. wysokie zużycie szkodliwych odczynników organicznych, wymóg dodatkowych procesów oczyszczania oraz zatężania próbki, a także niska wydajność ekstrakcji [93]–[95], [98] i długi czas przygotowania próbki [59], [95]–[97]. Kolejną stosowaną procedurą było SPE z użyciem złoża C18 (100 mg) [59] bądź SPME, którą użyto do izolacji doksorubicyny z tkankach płuca świni [101]. Niestety, nie opublikowano, z jaką wydajnością ten proces przebiegał. Ponadto, separację chromatograficzną tego cytostatyku najczęściej prowadzono w odwróconym układzie faz z detekcją FL [93][95]–[99] bądź MS(MS) [94], [100]–[102]. Jednakże, dotychczas opracowane metody LC dotyczące oznaczania doksorubicyny w tkankach charakteryzowały się wysokimi wartościami LOD (> 0,01 µg/g) [95], [96], [99] oraz LOQ (> 0,02 µg/g) [93], [95], [96], [98], [99], [101] bądź te parametry nie były publikowane [93], [98], [103]. Dodatkowo, niektóre prace dotyczyły bardzo specyficznego rodzaju tkanki jak np. tkanka oczna królika [59] lub tkanka stawów skokowych szczura [93].

W badaniu realizowanym w ramach pracy doktorskiej skupiono się w głównej mierze na porównywaniu różnych procedur ekstrakcji doksorubicyny z tkanek zwierzęcych (tkanki szczura), a warunki rozdzielenia chromatograficznego dostosowano do potrzeb oznaczeń tego leku w tkankach zwierzęcych bazując na warunkach opisanych w publikacji 1.

***Część doświadczalna oraz wyniki badań***

Jak wspomniano powyżej, warunki analizy chromatograficznej techniką LC-FL zamieszczone w publikacji 1 były adoptowane do oznaczeń doksorubicyny w tkankach szczurzych. Zatem, próbki zawierające doksorubicynę i daunorubicynę użytą jako IS rozdzielano na kolumnie Discovery HS C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) w temperaturze 30 oC. Faza ruchoma składała się z ACN i 0,1 % kwasu mrówkowego w wodzie, przy czym zmieniono proporcje jej składników na 28:72, (*v*/*v*), zachowując przepływ fazy ruchomej na poziomie 1 ml/min. Objętość nastrzyku dla prób ≤ 1 µg/g wynosiła 30 µl, podczas gdy dla prób zawierających ten cytostatyk w zakresie 1-30 µg/g było to 5 µl. Badane anality monitorowano przy długościach fali wzbudzenia λ = 487 nm oraz fali emisji λ = 555 nm.

Podczas etapu optymalizacji ekstrakcji doksorubicyny użyto różnych tkanek szczurzych tj. wątroby, nerek, żołądka, płuc, serca oraz śledziony, które pozyskano z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. W każdym testowanej procedurze z zastosowaniem deproteinizacji, LLE bądź SPE stosowano 200 mg tkanki niezależnie od rodzaju matrycy biologicznej, a izolację analitów rozpoczynano od homogenizacji tkanki z dodatkiem soli fizjologicznej. Spośród odczynników do deproteinizacji stosowano ACN, MeOH, mieszaninę ACN i MeOH (1:1, *v*/*v*) oraz 3 % kwas trichloroctowy (ang. *trichloroacetic acid*, TCA) w ACN. Najwyższą wydajność ekstrakcji doksorubicyny na poziomie 52,8 ± 4,2 % otrzymano po zastosowaniu ACN, jednakże była ona niższa niż w przypadku izolacji tego analitu z próbek osocza i moczu (publikacja 1). Najmniej wydajnym procesem było użycie 3 % TCA (Tabela 1. w publikacji 4). W trakcie testowania protokołów LLE używano octanu etylu, DCHM oraz mieszaniny Chl i MeOH (4:1, *v*/*v*). Najmniej efektywnym odczynnikiem okazał się DCHM, dla którego wydajność izolacji doksorubicyny była na poziomie 2,8 ±1,0 %, podczas gdy najlepsze rezultaty odnotowano dla mieszaniny Chl i MeOH (4:1, *v*/*v*). Jednakże, powyższe procedury nie zapewniały wysokiego oczyszczenia matrycy próbki, co znacząco utrudniało wykazanie selektywności metody. W związku z tym podjęto badania związane ze sprawdzeniem efektywności ekstrakcji SPE bazującej na trzech rodzajach złoża HLB (30 mg), SOLA HRP (10 mg), C18 (40 mg). W każdym przypadku, zastosowano sól fizjologiczną do homogenizacji tkanki oraz wodę i MeOH odpowiednio jako odczynniki do przemywania złoża SPE i elucji analitów. Na podstawie uzyskanych wyników udowodniono, że najmniej wydajnym procesem było użycie złoża HRP SOLO, a najbardziej efektywnym zastosowanie złoża HLB (Tabela 1. w publikacji 4), które to jak dotąd nie stosowano do izolacji tego cytostatyku z tkanek zwierzęcych. Dalsze etapy optymalizacji procedury przygotowania prób dotyczyły doboru odczynnika do modyfikacji matrycy próbki przed SPE (0,9% NaCl, 0,9% NaCl:ACN (9:1, *v/v*), 0,05 M HCl, 0,1 M HCl, 0,1 M HCl:ACN (9:1, *v/v*), 0,2 M HCl, 0,1 M H3PO4), odczynników do przemywania złoża (H2O, ACN:H2O (1:9, *v/v*), MeOH:H2O (1:9, *v/v*), ACN:MeOH:H2O (0,5:0,5:9, *v/v/v*), 0,01 M HCl) oraz elucji analitu. Do tego celu stosowano MeOH, ACN, MeOH:ACN (1:1, *v/v*), a także te trzy rozpuszczalniki po zakwaszeniu do pH 3,5 za pomocą HCl. Spośród testowanych procedur SPE ze złożem HLB, najwyższą wydajność ekstrakcji doksorubicyny otrzymano po zastosowaniu 0,1 M HCl jako środka do homogenizacji tkanki oraz jako modyfikatora pH matrycy próbki przez SPE, wody jako środka przemywającego oraz MeOH do wymywania analitów (Tabela 1. w publikacji 4). Ta procedura gwarantowała ekstrakcję doksorubicyny i IS z tkanki wątrobowej na poziomie 91,6 ± 5,1% oraz 95,4 ± 5,5 %. Dla pozostałych tkanek wydajności ekstrakcji dla doksorubicyny wahały się w granicach od 89,2 ± 6,2 % (śledziona) do 92,8 ± 4,3 % (nerki).

Następnie, najbardziej optymalny protokół SPE z użyciem HLB zastosowano w połączeniu z LC-FL do rozdzielenia oraz ilościowego oznaczenia doksorubicyny w tkankach szczurzych i poddano walidacji, którą przeprowadzano na tkankach wątroby. Potwierdzono selektywność metody (Fig. 2. w publikacji 4) jak również jej liniowość, która mieściła się w granicach 0,1-30 µg/g. Parametry LOD oraz LOQ były na poziomach 0,005 µg/g oraz 0,01 µg/g i były niższe od wcześniej opublikowanych w literaturze[93], [95], [96], [98], [99], [101], [103]. Ponadto, udowodniono, że precyzja i dokładność metody w badanym zakresie stężeń była zgodna z kryteriami FDA i ICH (Tabeli 3. w publikacji 4), a badania stabilności doksorubicyny w różnych warunkach przechowywania roztworów wzorcowych oraz próbek tkanek wzbogaconych dodatkiem tego cytostatyku potwierdziły, że badany związek jest trwały w testowanych warunkach eksperymentalnych (Tabela 4. w publikacji 4).

W celu zademonstrowania przydatności opracowanego protokołu SPE-LC-FL do badań farmakokinetycznych oraz klinicznych zastosowano tę procedurę do analizy próbek tkanek szczurzych (wątroby, nerki, żołądka płuca, serca oraz śledziony) wzbogaconych dodatkiem doksorubicyny oraz daunorubicyny jako IS. W wyniku trzykrotnych powtórzeń danej serii otrzymano wyniki, które spełniały kryteria dokładności i precyzji (Tabela 5. w publikacji 4). Podsumowując, potwierdzono użyteczność opracowanego protokołu SPE-LC-FL jako potencjalnej alternatywy dla dotychczas opublikowanych metod oznaczania doksorubicyny w tkankach do badań farmakokinetycznych oraz klinicznych z udziałem zwierząt laboratoryjnych.

***Wnioski***

Przeprowadzono i porównano różne metody przygotowania prób z zastosowaniem deproteinizacji, LLE oraz SPE do izolacji doksorubicyny z sześciu różnych tkanek szczurzych. Omówiono zalety oraz wady każdego podejścia wraz z oceną ich potencjalnego zastosowania w badaniach klinicznych. Spośród procedur deproteinizacji oraz LLE, najbardziej rokującym wariantem było użycie ACN. Niemniej jednak, wyższe wartości wydajności ekstrakcji doksorubicyny, jak i bardziej efektywne oczyszczenie prób gwarantował protokół SPE ze złożem HLB. Powyższa procedura w połączeniu z LC-FL, została poddana walidacji, a uzyskane wyniki potwierdziły, iż spełnia kryteria FDA i ICH. Tym samym potwierdzono, że proponowany protokół SPE-LC-FL oferuje dokładne oraz precyzyjne oznaczenie doksorubicyny w różnorodnych tkankach zwierzęcych i może być narzędziem do monitorowania dystrybucji leku w organizmie zwierząt laboratoryjnych. Warto również nadmienić, iż złoże HLB jak dotąd nie było stosowane do izolacji doksorubicyny z tkanek zwierzęcych.

## **3.5. Publikacja 5.**

O. Maliszewska, A. Roszkowska, M. Lipiński, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, E. Bień, M. A. Krawczyk, A. Plenis, Profiling Docetaxel in Plasma and Urine Samples from a Pediatric Cancer Patient Using Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with LC–MS/MS, *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1255

***Wprowadzenie***

Docetaksel to cytostatyk dopuszczony do lecznictwa przez FDA w 1996 roku, który jest nadal szeroko stosowany w onkologii [104]–[108]. Jednakże, wiele badań wskazuje na znaczne różnice farmakokinetyczne w przypadku podania pacjentom tego leku [109]–[115], czego konsekwencją może być brak skuteczności leczenia. Jest to szczególnie niebezpieczne w sytuacji rzadkich przypadków nowotworów jakim jest np. naczyniakomięsak serca (AS), którego rozwój przebiega bardzo szybko prowadząc do znacznego obniżenia rokowań u pacjentów [26], [114]. To dotyczy także pacjentów pediatrycznych, dla których jest często późno diagnozowany z uwagi na bardzo rzadkie jego występowanie. Na przestrzeni ostatnich 13 lat opracowano szereg metod pozwalających określić stężenie docetakselu w różnych matrycach biologicznych tj. krew wraz jej frakcjami, ślina, mocz oraz kał. Większość z nich bazowało na technice HPLC [111], [112], [116]–[121], ale opisano także procedury z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej (ang. *Ultra-Performance Liquid Chromatography*, UPLC) [122]. Detekcja tego cytostatyku odbywała się za pomocą UV [116]–[120], ale także MS oraz MS/MS [111]–[113], [121]. Według literatury, najczęściej separację chromatograficzną wykonywano stosując kolumny C18 [111], [113], [116], [117], [120], [121] jak również C8 [118], [119], [121]. Spośród technik ekstrakcji, najczęściej używano klasyczne protokoły oparte na deproteinizacji [113], [118], [119], LLE [116], [117], [121] oraz SPE [111], [112], [120].

Jednakże, pomimo tak szerokiego wyboru metod do oznaczania docetakselu, nadal brakuje metod chromatograficznych poprzedzonych izolacją tego analitu z podłoża biologicznego z wykorzystaniem technikach mikroekstrakcyjnych, co byłby zgodne z założeniami “zielonej chemii”. Podejście to promuje bowiem poszukiwanie nowych rozwiązań analitycznych, które wykorzystują mniejsze ilości szkodliwych odczynników chemicznych, a zatem są przyjazne środowisku naturalnemu. W przypadku badań nad docetakselem zauważono lukę właśnie w tym obszarze, stąd postanowiono opracować nową metodę do oznaczeń stężenia docetakselu w osoczu i moczu ludzkim bazującą na DLLME oraz technice LC-MS/MS, która mogłaby być stosowana w praktyce klinicznej m.in. do monitorowania poziomu leku u pacjentów z rzadkimi schorzeniami nowotworowymi, takich jak AS.

***Część doświadczalna i wyniki badań***

Podczas etapu optymalizacji, spośród dwóch kolumn (Phenomenex C-18 Kinetex 1,7 µM 50 x 2,1 mm oraz Phenomenex Hydro RP 100A Synergi (2,5 µM 50 x 2 mm) wybrano tę pierwszą z uwagi na bardziej efektywne rozdzielenie analitów (ostrzejsze i bardziej symetryczne sygnały). Skład fazy ruchomej testowano w dwóch wariantach stosując jako składnik A: 0,1 % kwas mrówkowy w wodzie, a jako składnik B: 0,1 % kwas mrówkowy w ACN bądź w MeOH, które to wprowadzono na układ w różnych programach gradientowych. Ostatecznie jako optymalny wariant wytypowano zastosowanie gradientowej elucji fazy ruchomej będącej mieszaniną roztworu A oraz 0,1% kwasu mrówkowego w ACN, która przepływała przez kolumnę z prędkością 200 µl/min. Jako IS zastosowano paklitaksel, z uwagi na bardzo zbliżoną budowę chemiczną do docetakselu (Ryc. 2) oraz faktu, iż te leki nigdy nie są jednocześnie podawane podczas chemioterapii. Czas analizy LC-MS/MS wynosił 3,5 min i był krótszy od wcześniej opublikowanych metod chromatograficznych [112], [113], [121].

W trakcie optymalizacji ekstrakcji testowano szereg różnych wariantów dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz wspomaganej ultradźwiękami (ang.*Ultrasound-Associated Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, UA-DLLME), w których używano różnorodne objętości oraz rodzaje rozpuszczalników dyspergujących (Chl, DCHM) i ekstrahujących (ACN, MeOH oraz etanol (EtOH)), jak również czasu trwania procesu izolacji analitu wspomaganego ultradźwiękami. Użyteczność każdej testowanej mieszaniny ekstrahująco-dyspergującej sprawdzono w różnych proporcjach (4:6, 3:7, 2:8, *v*/*v*) stosując jako matrycę próbki buforowaną fosforanem sól fizjologiczną (ang. *Phosphate Buffered Saline*, PBS). Po przeprowadzeniu tych eksperymentów stwierdzono, że w przypadku mieszaniny ACN z testowanymi odczynnikami ekstrahującymi nie utworzyła się kropla. Z kolei, spośród pozostałych wariantów najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku mieszaniny Chl:EtOH (4:6, *v*/*v*) (Tabela 1. w publikacji 5). Kolejnym krokiem było zweryfikowanie dwóch najlepiej rokujących mieszanin (Chl:MeOH, Chl:EtOH) w trzech różnych proporcjach (4:6, 3:7, 2:8, *v*/*v*) do izolacji docetakselu z matrycy biologicznej. Spośród tych mieszanin, najwyższą wydajność ekstrakcji otrzymano po zastosowaniu Chl:EtOH w proporcji (4:6, *v*/*v*). Zatem, ta mieszanina ekstrahująco-dyspergująca została wybrana do dalszych eksperymentów. W trakcie kolejnych badań, sprawdzono, czy włączenie ultradzwięków, jak i czas trwania tego procesu wpłynie na wydajność ekstrakcji docetakselu z próbek biologicznych. Ten parametr testowano w różnych przedziałach czasach (0, 0,5, 1, 2, 5 min) i wykazano, że wydajność ekstrakcji była najwyższa wówczas, gdy zastosowano 0,5 min sonifkację próbki, która po upływnie kolejnych minut znacząco spadała (Fig. 2S. w Supplementary Data), co może świadczyć o degradacji badanej substancji. Zatem, do ostatecznego protokołu przygotowania próbek włączono etap sonifikacji trwający 0,5 min i kontynuowano badania dla próbek moczu. Częścią optymalizacji dla tej matrycy było sprawdzanie wpływu pH (3,0, 7,0, 10,0) na wydajność procesu ekstrakcji docetakselu z tego materiału biologicznego. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że zmiana pH nie wpływa na zwiększenie wydajności ekstrakcji. Zatem, neutralne pH próbki biologicznej przyjęto jako optymalne.

W celu weryfikacji przydatności opracowanej procedury UA-DLLME w połączeniu z LC-MS/MS do oznaczeń docetakselu w osoczu i moczu, poddaną ją walidacji zgodnie z wymaganiami FDA oraz ICH. Potwierdzono jej selektywność (Fig. S1. w Supplementary Data), liniowości w zakresie 2,5-2000 ng/ml dla prób osocza oraz od 5 do 2000 ng/ml dla prób moczu, a także określono i parametry LOQ i LOD, które w przypadku prób osocza wynosiły 1 i 2,5 ng/ml, a dla moczu były na poziomie 2,5 i 5 ng/ml (Tabela 2. w publikacji 5). Ponadto, wyznaczono precyzję i dokładność metody, których wartości nie przekraczały wymaganych kryteriów akceptacji (Tabela 3. w publikacji 5). Dodatkowo, badania stabilności wskazały, że docetaksel jest substancją trwałą w testowanych warunkach eksperymentalnych (Tabela S1. w Supplementary Data).

Po zwalidowaniu opracowanej metody UA-DLLME-LC-MS/MS zastosowano tę procedurę do analizy rzeczywistych próbek osocza i moczu pobranych od 12-letniego pacjenta chorego na AS serca z przerzutami do płuc oraz węzłów chłonnych, który otrzymywał docetaksel w dawce 45 mg (30 mg/m2) w ciągu 1 h wlewu dożylnego co trzy tygodnie. Próbki pobierano przez podaniem, w trakcie, jak i na koniec wlewu, a także do 72 h po podawaniu leku. Mocz pobierano przed podaniem leku, na końcu wlewu oraz do 72 h od podawania tego cytostatyku.

Wynikiem tych analiz było otrzymanie profili stężeń docetakselu w osoczu i moczu pacjenta do 72 h od momentu rozpoczęcia podania leku. Na ich podstawie ustalono, że w przypadku osocza najwyższe stężenie docetakselu odnotowano na zakończenie wlewu (4336,51 ng/ml – 1 h) (Fig. 2. w publikacji 5). W kolejnych punktach czasowych, stężenie leku spadało do 8 h, a następnie minimalnie wzrosło i ponownie spadało do 15 h, aby w 72 h osiągnąć poziom 3,01 ng/ml. W przypadku próbek moczu, Cmax docetakselu oznaczono na koniec wlewu (1347,55 ng/ml – 1 h), które spadało do 10 h, aby ponownie wzrasnąć (22 h) i obniżyć się osiągając poziom 26,08 ng/ml w ostatnim punkcie pomiarowym (72 h). Uzyskany profil potwierdził trójkompartmentowy model farmakokinetyczny docetakselu, który już wcześniej opisano w literaturze [123]. Te dane mogą także wskazywać na dużą zmienność międzyosobniczą bądź możliwość wystąpienia interakcji, gdy ten lek jest podawany w terapii wielolekowej. Ta obserwacja jest spójna z danymi literaturowymi, które także wskazywały, że oznaczone poziomy stężeń docetakselu były bardzo zróżnicowane [111]–[113][114]. W odniesieniu do danych literaturowych dotyczących poziomów docetakselu w moczu, te informacje są bardzo ograniczone, gdyż jedynie w jednej pracy podano, że po doustnym podaniu docetakselu (60 mg), procent dawki leku w moczu wynosił ok. 2,5 % [121]. Niestety, brakuje danych opisujących profil stężeń tego cytostatyku w moczu w określonych przedziałach czasowym po podaniu tego leku. Zatem, zgromadzone dane eksperymentalne mogą rozszerzyć naszą wiedzę w zakresie farmakokinetyki tego taksanu.

***Wnioski***

Opracowano nową metodę UA-DLLME w połączeniu z LC-MS/MS do oznaczania profili stężeń docetakselu w próbkach osocza i moczu ludzkiego, której użyteczność w praktyce klinicznej została potwierdzona w trakcie monitorowania tego cytostatyku w materiale biologicznym uzyskanym od pacjenta pediatrycznego z AS serca. Jej dużą zaletą jest zastosowanie mikroekstrakcji do izolacji docetakselu z próbek biologicznych, które po raz pierwszy zostało zaproponowane dla tego leku, jako alternatywne podejście do klasycznych procedur ekstrakcji. Uzyskane profile docetakselu w testowanych matrycach wskazują, że wyższe stężenie leku oznaczono w próbkach osocza niż moczu, a ponadto świadczą o trójkompartmentowym modelu farmakokinetycznym tego cytostatyku. Opracowana metoda UA-DLLME-LC-MS/MS jest szybka, prosta, dokładna i precyzyjna i może być interesującym narzędziem analitycznym do zastosowań w TDM oraz innych badaniach farmakokinetycznych i klinicznych.

Podsumowanie

* Opracowano metody oznaczania doksorubicyny, epirubicyny i idarubicyny w moczu i osoczu krwi ludzkiej, a dla doksorubicyny także w tkankach zwierzęcych, techniką chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (LC-FL),
* Opracowano skuteczne procedury ekstrakcji powyższych analitów z wyżej wymienionych materiałów biologicznych oparte na ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z użyciem kolumienek HLB,
* Powyższe metody oznaczania doksorubicyny, epirubicyny i idarubicyny w osoczu i moczu techniką SPE-LC-FL zostały zwalidowane zgodnie z wymogami FDA i ICH i z powodzeniem zastosowane do monitorowania leków cytostatycznych u dzieci leczonych onkologicznie,
* Uzyskane profile stężeń odniesiono do wcześniej opublikowanych w literaturze w aspekcie efektywności i bezpieczeństwa stosowania antracyklin dla pacjenta i jego otoczenia,
* Potwierdzono użyteczność opracowanej metody oznaczania doksorubicyny w tkankach szczurzych techniką LC-FL do potencjalnych zastosowań w badaniach klinicznych z udziałem zwierząt laboratoryjnych,
* Opracowano warunki oznaczania docetakselu w moczu i osoczu krwi ludzkiej techniką LC-MS/MS oraz skuteczną procedurę ekstrakcji tego analitu z materiału biologicznego bazującą na UA-DLLME,
* Przeprowadzono walidację opracowanej metody chromatograficznej oznaczania docetakselu techniką UA-DLLME-LC-MS/MS zgodnie z wymaganiami FDA oraz ICH,
* Potwierdzono użyteczność opracowanej metody UA-DLLME-LC-MS/MS w praktyce klinicznej poprzez jej zastosowanie do wyznaczenia profili stężeń docetakselu w próbkach osocza i moczu pobranych od pacjenta poddanego leczeniu onkologicznemu,
* Opracowane metody LC-FL oraz LC-MS/MS stanowią alternatywę dla dotychczas opublikowanych technik LC oznaczania wybranych antracyklin i taksanu jako użytecznych narzędzi analitycznych w badaniach farmaceutycznych.

# **Streszczenie**

Pomimo ciągłego rozwoju współczesnej medycy, choroby nowotworowe są w dalszym ciągu jednym z najczęstszych schorzeń na świecie, które w wielu przypadkach prowadzą do śmierci pacjenta. Z tego względu, opracowanie skutecznej terapii stanowi istotne wyzwanie dla wielu klinicystów i naukowców. Niezmiennie od lat, chemioterapia jest jednym z podstawowych sposobów leczenia onkologicznego, z którą niestety wiąże się także wysokie ryzyko występowania wielu poważnych efektów ubocznych. W związku z poprawą jej skuteczności, a także potrzebą obniżenia skutków niepożądanych sugeruje się stosowanie terapii monitorowanej stężeniem leku (ang. *Therapeutic Drug Monitoring,* TDM) opartej na doborze dawki leku na podstawie wcześniej określonego stężenia oznaczonego w próbkach krwi pacjenta. Takie podejście może stanowić alternatywę dla dotychczasowego sposobu dawkowania leków cytostatycznych w oparciu o masę czy powierzchnię ciała pacjenta. Wymaga to jednak opracowywania metod pozwalających w dokładny i precyzyjny sposób określić poziom leku po jego podaniu w płynach ustrojowych pacjenta (najczęściej osocze, ale także surowica i mocz). Istotnym kierunkiem rozwoju leczenia onkologicznego jest także wprowadzanie nowych substancji o działaniu przeciwnowotworowym bądź projektowanie nowych postaci leku dla cytostatyków już dopuszczonych do lecznictwa, które charakteryzują się wyższą efektywnością terapeutyczną i niższym profilem działań niepożądanych. Jednakże, ich dopuszczenie do obrotu aptecznego wymaga przeprowadzenia szeregu badań klinicznych, w tym z udziałem zwierząt laboratoryjnych. Zatem, istnieje potrzeba opracowania metod analitycznych służących do oznaczania substancji przeciwnowotworowych w tkankach zwierzęcych.

Głównym celem pracy doktorskiej była optymalizacja metod umożliwiających monitorowanie stężenia wybranych leków cytostatycznych z grupy antracyklin (doksorubicyny, epirubicyny, idarubicyny) oraz taksanów (docetakselu) w płynach ustrojowych człowieka (osocze i mocz). Ponadto, celem badań było także rozszerzenie stosowalności metody do oznaczania doksorubicyny w tkankach zwierzęcych.

W związku z powyższym, w ramach pracy doktorskiej przeprowadzono szereg eksperymentów dotyczących opracowania procedur izolacji leków z matryc biologicznych, w trakcie których testowano szereg procedur deproteinizacji, LLE, SPE z użyciem kolumienek C18 i HLB, a także SPME (idarubucyna) i DLLME (docetaksel). Porównano uzyskane wyniki ekstrakcji oraz oceniono każdą z nich wskazując na zalety i wady. Ostatecznie jako najbardziej optymalną do izolacji doksorubicyny, epirubicyny i idarubicyny wytypowano SPE ze złożem HLB. Ponadto, w przypadku idarubicyny zaproponowano procedurę SPME do izolacji tego leku, która mogłaby być stosowana do analizy próbek pacjentów otrzymujących wyższe dawki tego cytostatyku. Po raz pierwszy zaproponowano także protokół UA-DLLME oparty na zastosowaniu etanolu i chloroformu jako rozpuszczalnika dyspergującego i estrahującego do ekstrakcji docetakselu z próbek osocza i moczu.

Ponadto, dla każdego cytostatyku zoptymalizowano warunki analizy chromatograficznej, które w przypadku antracyklin były prowadzone techniką LC-FL w warunkach elucji izokratycznej, podczas gdy do separacji docetakselu użyto LC-MS/MS z elucją gradientową fazy ruchomej. Opracowane protokoły analityczne SPE-LC-FL i UA-DLLME-LC-MS/MS poddano walidacji zgodnie z kryteriami FDA i ICH stosując metodę wzorca wewnętrznego, gdzie jako IS użyto danunorubicynę bądź paklitaksel. Uzyskane wyniki potwierdziły, że wszystkie metody spełniają kryteria precyzji i dokładności oraz liniowości w testowanych zakresach stężeń, a parametry LOD i LOQ są niższe bądź porównywalne w odniesieniu do parametrów określonych dla metod już opublikowanych w literaturze. Następnie, dla potwierdzenia użyteczności opracowanych procedur analitycznych w praktyce klinicznej zastosowano je do oznaczeń cytostatyków w rzeczywistych próbkach materiału biologicznego otrzymanych od pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową, którzy podlegali różnorodnym protokołom chemioterapeutycznym. Wynikiem tych badań było otrzymanie profili stężeń oznaczanych cytostatyków w osoczu i moczu. W przypadku antracyklin, profile w osoczu były porównywalne do wcześniej opublikowanych w literaturze. Ponadto, stężenia tych cytostatyków w moczu były znacząco wyższe, co sugerowało potencjalne ryzyko narażenia personelu medycznego oraz opiekunów pacjenta na działanie antracyklin w kontakcie z moczem pacjenta, szczególnie w trakcie podawania leku i w najbliższych godzinach po zakończeniu jego aplikacji. Wyniki badań potwierdziły także, że uzyskane poziomy docetakselu w osoczu były wyższe niż wcześniej opublikowane w literaturze. To dowodzi, że farmakokinetyka tego leku wykazuje dużą zmienność osobniczą, co już sygnalizowano w literaturze. W przypadku tkanek zwierzęcych użyteczność opracowanej metody SPE-LC-FL potwierdzono pod kątem przydatności do oznaczeń poziomów doksorubicyny w sześciu rodzajach tkanek szczura (wątroba, nerki, żołądek, płuca, serce oraz śledziona). Ta metoda może być z powodzeniem zastosowana do badań farmakokinetycznych i aplikacji klinicznych.

Podsumowując wyniki badań realizowane w ramach pracy doktorskiej, które zaprezentowano w formie cyklu pięciu publikacji oryginalnych można przyjąć, że ich efektem było opracowanie szeregu alternatywnych metod chromatograficznych w porównaniu do już istniejących metodyk oznaczania leków cytostatycznych w materiałach biologicznych. Metody te mogą być z powodzeniem stosowane w praktyce klinicznej, w tym w TDM, umożliwiając dostarczanie cennych informacji podczas prowadzenia badań farmakokinetycznych oraz klinicznych.

# **Summary**

Despite the continuous development of modern medicine, cancers are the one of the most common diseases worldwide, which in many cases lead to the patient’s death. For this reason, determination of an effective therapy poses a very relevant challenge for many clinicists and researchers. For years, chemotherapy has been one of the fundamental methods of oncologic treatment, but unfortunately it is also associated with a high risk of many side effects. In connection with the improvement of its effectiveness and the need to decrease side effects, it is suggested to use the therapeutic drug monitoring (TDM) based on selecting a proper dose of the drug according to the previously determined concentration measured in the patient's blood samples. This approach may be used as an alternative to the currently most common method of anticancer dosage based on patient`s weight or surface area of their body. However, it requires the development of methods which will precisely and accurately show the concentration levels of drug after its administration in biofluids (most often plasma, but also serum and urine). An important direction in the development of oncologic treatment is also the introduction of new substances with anticancer activity, or design of new drug forms for cytostatics that have been already approved for treatment, but in new drug formulation characterise by higher therapeutic effectiveness and a lower incidence of adverse effects. However, admission to pharmacy turnover requires carrying out a wide range of clinical studies including those involving laboratory animals. Hence, there is a need to develop analytical methods which will be used to determine anticancer substances in animal tissues.

The main aim of this dissertation was the optimization of methods which are used for monitoring the concentration levels of selected cytostatic drugs of the anthracycline groups (doxorubicin, epirubicin, idarubicin) and taxanes (docetaxel) in human body fluids (plasma and urine). In addition, the aim of this study was also extension of the method's applicability for the determination of doxorubicin in animal tissues.

Accordingly, a wide range of experiments was carried out within this study which included the optimization of drug isolation procedures from biological matrices, during which different procedures of deproteinization, LLE and SPE with columns of C18 and HLB, as well as SPME (idarubicin) and DLLME (docetaxel) were tested. Then, the obtained results of extraction were compared and each of them was evaluated for advantages and disadvantages. Finally, for the isolation of doxorubicin, epirubicin and idarubicin SPE with HLB cartridges was chosen as the most optimal procedure. Additionally, in the case of idarubicin, SPME procedures were proposed which could be used to analyse samples obtained from patients being administrated a higher dose of this cytostatic. The UA-DLLME protocol, based on using ethanol and chloroform as disperser and extracting solvent, was proposed for the first time for the extraction of docetaxel from plasma and urine samples.

Moreover, for each cytostatic the chromatographic conditions were optimized which in case of anthracycline was based on LC-FL technique with isocratic elution, while for the separation of docetaxel LC-MS/MS with gradient elution was used. The determined analytical protocols SPE-LC-FL and UA-DLLME-LC-MS/MS were validated as required by FDA and ICH criteria using the internal pattern method, where daunorubicin or paclitaxel were used as IS. The obtained results confirmed that all methods fulfilled the criteria within the range of accuracy, precision, linearity in tested concentration ranges, and LOD and LOQ parameters which were lower or comparable in reference to the specified parameters in earlier literature data. Next, to confirm the usability of the developed analytical procedures in clinical practice, they were used for the determination of cytostatic in real samples of biological material obtained from patients diagnosed with cancer, who were subjects to various chemotherapy regimens. The result of these studies provided profiles of the drug concentrations in plasma and urine. In the case of anthracyclines, the profiles in plasma samples were comparable to those previously published in literature. On the other hand, the concentration of these cytostatic in urine were significantly higher, which may suggest the potential risk of exposure of medical personnel and caregivers of patients to anthracyclin activity in contact with patients’ urine, especially during administration of drug and also in the first hours after its application. The results confirmed that obtained levels of docetaxel in plasma were higher than those previously published in literature. This proves that the pharmacokinetics of this drug shows a great variability between patients which was also indicated in the literature. In the case of animal tissue, the usefulness of the developed SPE-LC-FL method was confirmed for determining the levels of doxorubicin in six types of rat tissues (liver, kidneys, stomach, lungs, heart, spleen) in pharmacokinetic and clinical applications.

To summarize the results of the research conducted as part of the doctoral thesis, which were presented in the form of a series of five original publications, it can be concluded that the outcome was the development of a range of alternative chromatographic methods compared to the existing methodologies for the determination of cytostatic drugs in biological materials. These methods could be used in clinical practice, including TDM, enabling the provision of valuable information during pharmacokinetic and clinical studies.

# **Referencje**

[1] International Agency for Research on-World Health Organization, *World CanCer report 2008. Cancer research for cancer prevention*, vol. 199. 2020.

[2] H. Sung J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.

[3] O. P. Wojciechowska U., Barańska K., Michałek I. and M. M., “, Didkowska J. A.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy, Krajowy rejestr nowotworów, 2022, 5-90,” *Nar. Inst. Onkol. im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Inst. Badaw. Kraj. rejestr nowotworów*, pp. 5–90, 2022.

[4] WHO, *World Health Statistics 2022. Monitoring health for the SDGs Sustainable Development Goals*. 2022.

[5] S. Chen, Z. Cao, K. Prettner, M. Kuhn, J. Yang, L. Jiao, Z. Wang, W. Li, P. Geldsetzer, T. Bärnighausen, D. E. Bloom, C. Wang “Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to 2050,” *JAMA Oncol.*, pp. 1–9, 2023, doi: 10.1001/jamaoncol.2022.7826.

[6] P. Anand,A. B. Kunnumakara, C. Sundaram, K. B. Harikumar, S. T. Tharakan, O. S. Lai, B. Sung, B. B. Aggarwal, “Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes,” *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 9, pp. 2097–2116, 2008, doi: 10.1007/s11095-008-9661-9.

[7] R. A. Hiatt and N. Beyeler, “Cancer and climate change,” *Lancet Oncol.*, vol. 21, no. 11, pp. e519–e527, 2020, doi: 10.1016/S1470-2045(20)30448-4.

[8] J. Schüz*,* C. Espina, P. Villain, R. Herrero, M. E. Leon, S. Minozzi, I. Romieu, N. Segnan, J. Wardle, M. Wiseman, F. Belardelli, D. Bettcher, F. Cavalli, G Galea, G. Lenoir, J. M. Martin-Moreno, F. A. Nicula, J. H. Olsen, J. Patnickm, M. Primic-Zakelj, P Puska, F. E. van Leeuwen, O. Wiestler, W. Zatonski; Working Groups of Scientific Experts., “European code against cancer 4th edition: 12 ways to reduce your cancer risk,” *Cancer Epidemiol.*, vol. 39, pp. S1–S10, 2015, doi: 10.1016/j.canep.2015.05.009.

[9] E. K. Walki, *12 Sposobów Na Zdrowie*.

[10] “https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition ,” *data dostępu 07.06.2023*, doi: 10.1016/S0140-6736(02)16666-9.

[11] WHO, “https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\_1,” *World Heal. Organ.*, p. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\_1.

[12] A. Patel, “Benign vs Malignant Tumors,” *JAMA Oncol.*, vol. 6, no. 9, p. 1488, 2020, doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2592.

[13] E. N. Kontomanolis, A. Koutras, A. Syllaios, A. Schizas, D. Mastoraki, A. Garmpis, N. Diakosavvas, M. Angelou, K. Tsatsaris, G. Pagkalos, T. Ntounis,Z. Fasoulakis “Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review,” Anticancer Res., vol. 40, no. 11, pp. 6009–6015, 2020, doi: 10.21873/anticanres.14622.

[14] E. Dickens and S. Ahmed, “Principles of cancer treatment by chemotherapy,” *Surg. (United Kingdom)*, vol. 36, no. 3, pp. 134–138, 2018, doi: 10.1016/j.mpsur.2017.12.002.

[15] J. L. Barnes, M. Zubair, K. John, M. C. Poirier, and F. L. Martin, “Carcinogens and DNA damage,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 46, no. 5, pp. 1213–1224, 2018, doi: 10.1042/BST20180519.

[16] A. Carbone, “Cancer classification at the crossroads,” *Cancers (Basel).*, vol. 12, no. 4, pp. 10–15, 2020, doi: 10.3390/cancers12040980.

[17] M. Sawaki, T. Shien, and H. Iwata, “TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group),” *Jpn. J. Clin. Oncol.*, vol. 49, no. 3, pp. 228–231, 2019, doi: 10.1093/jjco/hyy182.

[18] WHO, “Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych – X Rewizja, Tom I. wydanie 2008,” *Międzynarodowa Stat. Klasyf. Chorób i Probl. Zdrowotnych – X Rewiz. Tom I. Wyd. 2008*, pp. 222–228, 2009, [Online]. Available: https://cez.gov.pl/fileadmin/user\_upload/Wytyczne/statystyka/icd10tomi\_56a8f5a554a18.pdf

[19] J. Huang, W. S. Pang, V. Lok, L. Zhang, D. E. Lucero‑Prisno, W. Xu, Z.‑J. Zheng, E. Elcarte, M. Withers, M. C. S. Wong, NCD Global Health Research Group, Association of Pacific Rim Universities (APRU), “Incidence, mortality, risk factors, and trends for Hodgkin lymphoma: a global data analysis,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01281-9.

[20] K. M. Katarzyna Kryszczyszyn-Musialik1, 2, Grzegorz Słomian1, “Mnogie stany ropne utrudniające rozpoznanie , wikłające przebieg i leczenie chłoniaka Hodgkina u 29-letniego mężczyzny — opis przypadku,” *Via Medica*, no. 3, pp. 280–285, 2019, doi: 10.5603/OCP.2019.0028.Nale.

[21] B. K. Alicja Chybicka, Krystyna Sawicz-Birkowska, “Onkologia i hematologia dziecięca Tom 1,” *PZWL Wydaw. Lek.*, no. wyd. 2, 2021, 2021.

[22] J. Momotow, S. Borchmann, D. A. Eichenauer, A. Engert, and S. Sasse, “Hodgkin lymphoma—review on pathogenesis, diagnosis, current and future treatment approaches for adult patients,” *J. Clin. Med.*, vol. 10, no. 5, pp. 1–17, 2021, doi: 10.3390/jcm10051125.

[23] Z. Kojs, M. Jankiewicz, E. Kojs-Pasińska, and J. Jaszczyński, “Miȩśniakomiȩsak prążkowanokomórkowy o typie pȩcherzykowym okolicy okołocewkowej - Opis przypadku i przegląd literatury,” *Curr. Gynecol. Oncol.*, vol. 13, no. 1, pp. 51–58, 2015, doi: 10.15557/CGO.2015.0006.

[24] S. Miwa, N. Yamamoto, K. Hayashi, A. Takeuchi, K. Igarashi, and H. Tsuchiya, “Recent advances and challenges in the treatment of rhabdomyosarcoma,” *Cancers (Basel).*, vol. 12, no. 7, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3390/cancers12071758.

[25] E. Bien, T. Stachowicz -Stencel, A. Balcerska, J. Godzinski, B. Kazanowska, M. Perek-Polnik, W. Madziara, A. Rybczyńska, A. Kurylak, B. Zalewska-Szewczyk, J. Peregud- Pogorzelski “Angiosarcoma in children still uncontrollable oncological problem. the report of the Polish Paediatric Rare Tumours Study,” *Eur. J. Cancer Care (Engl).*, vol. 18, no. 4, pp. 411–420, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2354.2008.01063.x.

[26] S. Ostrowski, A. Marcinkiewicz, A. Kośmider, and R. Jaszewski, “Sarcomas of the heart as a difficult interdisciplinary problem,” *Arch. Med. Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 135–148, 2014, doi: 10.5114/aoms.2014.40741.

[27] H. H. W. Chen and M. T. Kuo, “Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 37, pp. 62742–62758, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.18409.

[28] J. Warguła, “Outline of the history of drug synthesis with particular emphasis on anticancer and antibacterial drugs,” *Prospect. Pharm. Sci.*, vol. 20, no. 3, pp. 1–10, 2022.

[29] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, and L. Gianni, “Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologie developments in antitumor activity and cardiotoxicity,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 56, no. 2, pp. 185–229, 2004, doi: 10.1124/pr.56.2.6.

[30] M. Gramatyka, “Kardiotoksyczność jako niepożądane działanie w terapii raka piersi \* Cardiotoxicity as undesired side effect in the treatment of breast cancer,” *Postep. hig med dosw*, pp. 483–497, 2014.

[31] A. Pedrycz and A. Kramkowska, “Adriamycin - efficacy and possible adverse effects,” *Curr. Probl. Psychiatry*, vol. 17, no. 1, pp. 38–46, 2016, doi: 10.1515/cpp-2016-0006.

[32] C. Urla *S.* W. Warmann, M. Sparber-Sauer, A. Schuck, I. Leuschner, T. Klingebiel, G. Blumenstock, G. Seitz, E. Koscielniak, J. Fuchs, “Treatment and outcome of the patients with rhabdomyosarcoma of the biliary tree: Experience of the Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS),” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1186/s12885-019-6172-5.

[33] O. Maliszewska, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miekus, E. Bień, M. A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożynska, Tomasz Bączek, “Optimization of LC method for the quantification of doxorubicin in plasma and urine samples in view of pharmacokinetic, biomedical and drug monitoring therapy studies,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 158, pp. 376–385, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2018.06.031.

[34] N. Treder, O. Maliszewska, I. Olędzka, P Kowalski, Natalia Miękus, Tomasz Bączek, Ewa Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożynska, A. Plenis, “Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method with a fluorescence detector for the analysis of epirubicin in human urine and plasma, and its application in drug monitoring,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1136, no. November 2019, p. 121910, 2020, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121910.

[35] O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, Tomasz Bączek, W. Rodzaj, E. Bień, M. A. Krawczyk, A. Plenis, “Sensitive Analysis of Idarubicin in Human Urine and Plasma by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: An Application in Drug Monitoring,” *Molecules*, vol. 25, no. 24, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3390/molecules25245799.

[36] O. Maliszewska A. Roszkowska, M. Lipiński, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Ewa Bień, M. A. Krawczyk, A.Plenis*,* “Profiling Docetaxel in Plasma and Urine Samples from a Pediatric Cancer Patient Using Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with LC–MS/MS,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 4, pp. 1–16, 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15041255.

[37] L. Bodnar, G. Wcisło, M. Miedzińska-maciejewska, and C. Szczylik, “Docetaksel i paklitaksel: porównanie ich budowy, farmakologii oraz mechanizmów oporności. Docetaxel and paclitaxel: comparison of their pharmacology and mechanisms of resistance,” *Współczesna Onkol.*, vol. 8, no. 9, pp. 435–446, 2004, [Online]. Available: http://www.termedia.pl/Czasopismo/Wspolczesna\_Onkologia-3/Streszczenie-2750

[38] S. Tabaczar, A. Koceva-Chył, K. Matczak, and K. Gwoździński, “Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej taksanów. I. Oddziaływanie docetakselu na mikrotubule,” *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 64, pp. 568–581, 2010.

[39] W. Bąk, J. Cabaj, P. Wróblewska-Łuczka, “Antitumour effects of taxanes with particular emphasis on their use in the treatment of melanoma,” *Environ. Med.*, vol. 23, no. 1–4, pp. 9–17, 2021, doi: 10.26444/ms/138611.

[40] S. Martinez-Recio, J. P. Perez-Wert, S. Martinez-Fdez, D. Jimenez-Bou, I. Ruiz-Gutierrez, J. Peña, A. Pertejo, E. Espinosa, A. Pinto, “Comparison of 2-Weekly and 3-Weekly Dosing of Docetaxel in Metastatic Prostate Cancer,” *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 20, no. 4, pp. 363–370, 2022, doi: 10.1016/j.clgc.2022.02.009.

[41] M. E. De Jonge, A. D. R. Huitema, J. H. M. Schellens, S. Rodenhuis, and J. H. Beijnen, “Individualised cancer chemotherapy: Strategies and performance of prospective studies on therapeutic drug monitoring with dose adaptation: A review,” *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 44, no. 2, pp. 147–173, 2005, doi: 10.2165/00003088-200544020-00002.

[42] J. S. Kang and M. H. Lee, “Overview of therapeutic drug monitoring,” *Korean J. Intern. Med.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–10, 2009, doi: 10.3904/kjim.2009.24.1.1.

[43] D. J. Touw, C. Neef, A. H. Thomson, and A. A. Vinks, “Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: A systematic review,” *Ther. Drug Monit.*, vol. 27, no. 1, pp. 10–17, 2005, doi: 10.1097/00007691-200502000-00004.

[44] J. H. Beumer,E. Chu, C. Allegra, Y. Tanigawara, G. Milano, R.Diasio, T. W. Kim, R. H. Mathijssen, L. Zhang, D. Arnold, K. Muneoka, N. Boku, M Joerger, “Therapeutic Drug Monitoring in Oncology: International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Recommendations for 5-Fluorouracil Therapy,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 105, no. 3, pp. 598–613, 2019, doi: 10.1002/cpt.1124.

[45] P. Smita, P. A. Narayan, J. Kumaravel, and P. Gaurav, “Therapeutic drug monitoring for cytotoxic anticancer drugs: Principles and evidence-based practices,” *Front. Oncol.*, vol. 12, no. December, pp. 1–17, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.1015200.

[46] ICH, “ICH Harmonised Guidance:Validation of Analytical Procedures Q2(R2),” *ICH Harmon. Tripart. Guidel.*, vol. 2, no. March, pp. 1–34, 2022, [Online]. Available: https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29 Guideline.pdf

[47] D. R. Barpe, D. D. Rosa, and P. E. Froehlich, “Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 41, no. 3–4, pp. 458–463, 2010, doi: 10.1016/j.ejps.2010.07.015.

[48] X. Yang, F. Qian, L. Xie, X. Yang, X. Cheng, and M. M. F. Choi, “Determination of doxorubicin in plasma by using CE coupled with in-column tapered optic-fiber light-emitting diode induced fluorescence detection,” *Electrophoresis*, vol. 35, no. 5, pp. 762–769, 2014, doi: 10.1002/elps.201300237.

[49] D. Fraier, E. Frigerio, E. Pianezzola, M. Strolin Benedetti, J. Cassidy, and P. Vasey, “A sensitive procedure for the quantitation of free and N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide polymer-bound doxorubicin (PK1) and some of its metabolites, 13-dihydrodoxorubicin, 13-dihydrodoxorubicinone and doxorubicinone, in human plasma and urine by reversed,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 13, no. 4–5, pp. 625–633, 1995, doi: 10.1016/0731-7085(95)01301-Z.

[50] J. S. Pérez-Blanco, M. del M. Fernández de Gatta, J. M. Hernández-Rivas, M. J. García Sánchez, M. L. Sayalero Marinero, and F. González López, “Validation and clinical evaluation of a UHPLC method with fluorescence detector for plasma quantification of doxorubicin and doxorubicinol in haematological patients,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 955–956, no. 1, pp. 93–97, 2014, doi: 10.1016/j.jchromb.2014.02.034.

[51] Q. Zhou and B. Chowbay, “Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: Application to preclinical pharmacokinetic studies,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 30, no. 4, pp. 1063–1074, 2002, doi: 10.1016/S0731-7085(02)00442-9.

[52] W. Ma, J. Wang, Q. Guo, and P. Tu, “Simultaneous determination of doxorubicin and curcumin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 111, pp. 215–221, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.007.

[53] C. Sottani, G. Poggi, F. Melchiorre, B. Montagna, and C. Minoia, “Simultaneous measurement of doxorubicin and reduced metabolite doxorubicinol by UHPLC-MS/MS in human plasma of HCC patients treated with TACE,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 915–916, pp. 71–78, 2013, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.12.012.

[54] Cristina Sottani, Paola Rinaldi, Emanuela Leoni, Guido Poggi, Cristina Teragni and A. D. and C. Minoia, “Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation,” *RAPID Commun. MASS Spectrom.*, vol. 22, pp. 2645–2659, 2008, doi: 10.1002/rcm.

[55] C. Sottani, G. Tranfo, M. Bettinelli, P. Faranda, M. Spagnoli, and C. Minoia, “Trace determination of anthracyclines in urine: A new high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for assessing exposure of hospital personnel,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 18, no. 20, pp. 2426–2436, 2004, doi: 10.1002/rcm.1642.

[56] I. M. Shaikh, K. B. Tan, and G. N. C. Chiu, “Simultaneous determination of doxorubicin and irinotecan in conjunction with their major metabolites by ultra high performance liquid chromatography,” *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 36, no. 7, pp. 914–925, 2013, doi: 10.1080/10826076.2012.678456.

[57] A. Gavenda, J. Ševcík1, J. Psotová, P. Bednár, P. Barták, P. Adamovsky, V. Šimánek, “Determination of anthracycline antibiotics doxorubicin and daunorubicin by capillary electrophoresis with UV absorption detection,” *Electrophoresis*, vol. 22, no. 13, pp. 2782–2785, 2001, doi: 10.1002/1522-2683(200108)22:13<2782::AID-ELPS2782>3.0.CO;2-I.

[58] R. Ricciarello, S. Pichini , R. Pacifici , I. Altieri , M. Pellegrini , A. Fattorossi , P. Zuccaro, “Simultaneous determination of epirubicin, doxorubicin and their principal metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection,” *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 707, no. 1–2, pp. 219–225, 1998, doi: 10.1016/S0378-4347(97)00610-5.

[59] T. Hu, Q. Le, Z. Wu, and W. Wu, “Determination of doxorubicin in rabbit ocular tissues and pharmacokinetics after intravitreal injection of a single dose of doxorubicin-loaded poly-β-hydroxybutyrate microspheres,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 1, pp. 263–269, 2007, doi: 10.1016/j.jpba.2006.06.032.

[60] F. Suzuki, K. Hashimoto, H. Kikuchi, H. Nishikawa, H. Matsumoto, J. Shimada, M. Kawase, K. Sunaga, T. Tsuda, K. Satoh, H. Sakagami, “Induction of tumor-specific cytotoxicity and apoptosis by doxorubicin,” *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 2 A, pp. 887–893, 2005.

[61] C. Ritzmo, S. Söderhäll, J. Karlén, H. Nygren, and S. Eksborg, “Pharmacokinetics of doxorubicin and etoposide in a morbidly obese pediatric patient,” *Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 24, no. 6, pp. 437–445, 2007, doi: 10.1080/08880010701451343.

[62] S. Eksborg, C. Palm, and O. Björk, “A comparative pharmacokinetic study of doxorubicin and 4’-epi-doxorubicin in children with acute lymphocytic leukemia using a limited sampling procedure,” *Anticancer. Drugs*, vol. 11, no. 2, pp. 129–136, 2000, doi: 10.1097/00001813-200002000-00010.

[63] S. Eksborg, H. S. Strandler, F. Edsmyr, I. Näslund, and P. Tahvanainen, “Pharmacokinetic study of IV infusions of adriamycin,” *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 28, no. 2, pp. 205–212, 1985, doi: 10.1007/BF00609693.

[64] M. Krischke, G. Hempel, S. Völler, N. André, M. D’Incalci, G. Bisogno, W. Köpcke, M. Borowski, R. Herold, A. V. Boddy, J. Boos, “Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a ‘European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium’ trial,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 78, no. 6, pp. 1175–1184, 2016, doi: 10.1007/s00280-016-3174-8.

[65] C. M. Camaggi, R. Comparsi, E. Strocchi, F. Testoni, and F. Pannuti, “HPLC analysis of doxorubicin, epirubicin and fluorescent metabolites in biological fluids,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 21, no. 3, pp. 216–220, 1988, doi: 10.1007/BF00262773.

[66] F. Lachâtre, P. Marquet, S. Ragot, J. M. Gaulier, P. Cardot, and J. L. Dupuy, “Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 738, no. 2, pp. 281–291, 2000, doi: 10.1016/S0378-4347(99)00529-0.

[67] S. Bermingham, R. O’Connor, F. Regan, and G. P. McMahon, “Simultaneous determination of anthracyclines and taxanes in human serum using online sample extraction coupled to high performance liquid chromatography with UV detection,” *J. Sep. Sci.*, vol. 33, no. 11, pp. 1571–1579, 2010, doi: 10.1002/jssc.201000026.

[68] S. Fogli*,* R. Danesi, F. Innocenti, A. Di Paolo, G. Bocci, C. Barbara, M. Del Tacca, “An improved HPLC method for therapeutic drug monitoring of daunorubicin, idarubicin, doxorubicin, epirubicin, and their 13-dihydro metabolites in human plasma,” *Ther. Drug Monit.*, vol. 21, no. 3, pp. 367–375, 1999, doi: 10.1097/00007691-199906000-00022.

[69] I. K. Barker, S. M. Crawford, A. F. Fell, “Determination of plasma concentrations of epirubicin and its metabolites by high-performance liquid chromatography during a 96-h infusion in cancer chemotherapy,” *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 681, no. 2, pp. 323–329, 1996, doi: 10.1016/0378-4347(96)00030-8.

[70] R. Li, L. Dong, J. Huang, “Hydrophilic interaction chromatographic determination of epirubicin in human plasma using solid phase extraction for sample clean-up,” *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 30, no. 16, pp. 2409–2418, 2007, doi: 10.1080/10826070701465654.

[71] C. Sottani *E. Leonia, B. Porroa, B. Montagnab, A. Amatub, F. Sottotettib, P. Quarettic, G. Poggib, C. Minoia*, “Validation of an LC-MS/MS method for the determination of epirubicin in human serum of patients undergoing Drug Eluting Microsphere-Transarterial Chemoembolization (DEM-TACE),” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 29, pp. 3543–3548, 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.08.054.

[72] W. I. W. Dodde J. G. Maring, G. Hendriks, F. M. Wachters, H. J. M. Groen, E. G. E. de Vries, D. R. A. Uges, “Determination of epirubicin and its metabolite epirubicinol in saliva and plasma by HPLC,” *Ther. Drug Monit.*, vol. 25, no. 4, pp. 433–440, 2003, doi: 10.1097/00007691-200308000-00003.

[73] K. E. Maudens, C. P. Stove, V. F. J. Cocquyt, H. Denys, and W. E. Lambert, “Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 30, pp. 3907–3915, 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.09.044.

[74] N. A. Dobbs and C. J. Twelves, “Measurement of epidoxorubicin and its metabolites by high-performance liquid chromatography using an advanced automated sample processor,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 572, no. 1–2, pp. 211–217, 1991, doi: 10.1016/0378-4347(91)80485-U.

[75] T. Dine, C. Brunet, M. Luyckx, M. Cazin, P. Gosselin, and J. L. Cazin, “Rapid quantitative determination of epirubicin and its metabolites in plasma using high performance liquid chromatography and fluorescence detection,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 4, no. 1, pp. 20–23, 1990, doi: 10.1002/bmc.1130040103.

[76] R. Wall, G. McMahon, J. Crown, M. Clynes, and R. O’Connor, “Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation of epirubicin and identification of metabolites in biological samples,” *Talanta*, vol. 72, no. 1, pp. 145–154, 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2006.10.010.

[77] G. Nicholls, B. J. Clark, and J. E. Brown, “Solid-phase extraction and optimized separation of doxorubicin, epirubicin and their metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 10, no. 10–12, pp. 949–957, 1992, doi: 10.1016/0731-7085(91)80104-H.

[78] G. Fabrizi, M. Fioretti, and L. Mainero Rocca, “Dispersive solid-phase extraction procedure coupled to UPLC-ESI-MS/MS analysis for the simultaneous determination of thirteen cytotoxic drugs in human urine,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 30, no. 8, pp. 1297–1308, 2016, doi: 10.1002/bmc.3684.

[79] R. Li, L. Dong, and J. Huang, “Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 546, no. 2, pp. 167–173, 2005, doi: 10.1016/j.aca.2005.04.073.

[80] D. H. Shin, S. H. Park, O. S. Kwon, C. W. Park, K. Han, and Y. B. Chung, “Validation of high-performance liqid chromatography method to determine epirubicin and its pharmacokinetics after intravenous bolus administration in rats,” *J. Pharm. Investig.*, vol. 43, no. 3, pp. 243–249, 2013, doi: 10.1007/s40005-013-0076-1.

[81] E. Schleyer, S. Budeus, and C. Rolff, “Idarubicin Pharmacokinetics,” pp. 617–624, 1992.

[82] C. M. Camaggi, P. Carisi, E. Strocchi, and F. Pannuti, “High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Idarubicin and Fluorescent Metabolites in Biological-Fluids,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 30, no. 4, pp. 303–306, 1992.

[83] O. Kuhlmann, S. Hofmann, and M. Weiss, “Determination of idarubicin and idarubicinol in rat plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection.,” *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, vol. 728, no. 2, pp. 279–82, 1999, doi: 10.1016/S0378-4347(99)00107-3.

[84] E. Schleyer *et al.*, “Oral idarubicin pharmacokinetics - Correlation of trough level with idarubicin area under curve,” *Leukemia*, vol. 10, no. 4, pp. 707–712, 1996.

[85] G. Hempel, S. Haberland, P. Schulze-Westhoff, N. Möhling, G. Blaschke, and J. Boos, “Determination of idarubicin and idarubicinol in plasma by capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 698, no. 1–2, pp. 287–292, 1997, doi: 10.1016/S0378-4347(97)00299-5.

[86] O. Kuhlmann, S. Hofmann, and M. Weiss, “Determination of idarubicin and idarubicinol in rat plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 728, no. 2, pp. 279–282, 1999, doi: 10.1016/S0378-4347(99)00107-3.

[87] K. E. Maudens, C. P. Stove, V. F. J. Cocquyt, H. Denys, and W. E. Lambert, “Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 30, pp. 3907–3915, 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.09.044.

[88] M. Looby, R. Linke, and M. Weiss, “Pharmacokinetics and tissue distribution of idarubicin and its active metabolite idarubicinol in the rabbit,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 39, no. 6, pp. 554–556, 1997, doi: 10.1007/s002800050614.

[89] D. J. Stewart, D. Grewaal, R. M. Green, S. Verma, J. A. Maroun, D. Redmond, L. Robillard, and S. Gupta, “Bioavailability and pharmacology of oral idarubicin,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 27, no. 4, pp. 308–314, 1991, doi: 10.1007/BF00685117.

[90] A. Tedeschi *M. Montillo, E. Strocchi, A. M.Cafro, E. Tresoldi, L. Intropido, M. Nichelatti, L. Marbello, C. Baratè, C. M. Camaggi, E, Morra*, “High-dose idarubicin in combination with Ara-C in patients with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: A pharmacokinetic and clinical study,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 59, no. 6, pp. 771–779, 2007, doi: 10.1007/s00280-006-0332-4.

[91] F. Lachâtre, P. Marquet, S. Ragot, J. M. Gaulier, P. Cardot, and J. L. Dupuy, “Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 738, no. 2, pp. 281–291, 2000, doi: 10.1016/S0378-4347(99)00529-0.

[92] C. M. Camaggi, P. Carisi, E. Strocchi, and F. Pannuti, “High-performance liquid chromatographic analysis of idarubicin and fluorescent metabolites in biological fluids,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 30, no. 4, pp. 303–306, 1992, doi: 10.1007/BF00686300.

[93] H. Niu, M. Xu, S. Li, J. Chen, J. Luo, X. Zhao, C. Gao, X. Li*.*, “High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Quantification of Liposome-Delivered Doxorubicin in Arthritic Joints of Collagen-Induced Arthritis Rats,” *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, vol. 23, pp. 150–158, 2017, doi: 10.12659/msmbr.904103.

[94] S. Ibsen Y. Su, J. Norton, E. Zahavy, T. Hayashi, S. Adams, W. Wrasidloc, S. Esener, “Extraction protocol and mass spectrometry method for quantification of doxorubicin released locally from prodrugs in tumor tissue,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 48, no. 7, pp. 768–773, 2013, doi: 10.1002/jms.3221.

[95] S. R. Urva, B. S. Shin, V. C. Yang, and J. P. Balthasar, “Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 8–9, pp. 837–841, 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.02.018.

[96] A. Kümmerle, T. Krueger, M. Dusmet, C. Vallet, Y. Pan , H.B. Ris, Laurent A. Decosterd, “A validated assay for measuring doxorubicin in biological fluids and tissues in an isolated lung perfusion model: Matrix effect and heparin interference strongly influence doxorubicin measurements,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 33, no. 3, pp. 475–494, 2003, doi: 10.1016/S0731-7085(03)00300-5.

[97] R. D. Arnold, J. E. Slack, and R. M. Straubinger, “Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 808, no. 2, pp. 141–152, 2004, doi: 10.1016/j.jchromb.2004.04.030.

[98] K. Alhareth, C. Vauthier, C. Gueutin, G. Ponchel, and F. Moussa, “HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 887–888, pp. 128–132, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.01.025.

[99] C. Zhang, Y. Wu, Y. Dong, H. Xu, and L. Zhao, “Quantification of DOX bioavailability in biological samples of mice by sensitive and precise HPLC assay,” *Pharm. Biol.*, vol. 54, no. 1, pp. 55–61, 2016, doi: 10.3109/13880209.2015.1014918.

[100] S. Mazzucchelli, A. Ravelli, F. Gigli, M. Minoli, F. Corsi, P. Ciuffreda, R. Ottria, “LC–MS/MS method development for quantification of doxorubicin and its metabolite 13-hydroxy doxorubicin in mice biological matrices: Application to a pharmaco-delivery study,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 31, no. 4, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1002/bmc.3863.

[101] A. Roszkowska,M. Tascona, B. Bojko, K. Goryński, P. Reck dos Santosc, M. Cypelc, J. Pawliszyn, “Equilibrium ex vivo calibration of homogenized tissue for in vivo SPME quantitation of doxorubicin in lung tissue,” *Talanta*, vol. 183, no. February, pp. 304–310, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.02.049.

[102] A. M. Al-Abd, N. H. Kim, S. C. Song, S. J. Lee, and H. J. Kuh, “A simple HPLC method for doxorubicin in plasma and tissues of nude mice,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 32, no. 4, pp. 605–611, 2009, doi: 10.1007/s12272-009-1417-5.

[103] R. X. Zhang, T. Zhang, K. Chen, J. Cheng, P. Lai, A. M. Rauth, K. S. Pang, X. Yu Wu, “Sample extraction and simultaneous chromatographic quantitation of doxorubicin and mitomycin C following drug combination delivery in nanoparticles to tumor-bearing mice,” *J. Vis. Exp.*, vol. 2017, no. 128, pp. 1–11, 2017, doi: 10.3791/56159.

[104] J. Baker J. Ajani, F. Scotte´, D. Winther, M. Martin, M. S. Aapro , G. von Minckwitz*.*, “Docetaxel-related side effects and their management,” *Eur. J. Oncol. Nurs.*, vol. 13, no. 1, pp. 49–59, 2009, doi: 10.1016/j.ejon.2008.10.003.

[105] J. A. L. Bong Sup Song, Juhee Seo, Dong Ho Kim, Jung Sub Lim, Ji Young Yoo, “Gemcitabine and Docetaxel for the Treatment of Children and Adolescents with Recurrent or Refractory Osteosarcoma: Korea Cancer Center Hospital Experience,” *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 61, pp. 1376–1381, 2014, doi: 10.1002/pbc.25035.

[106] J. H. Yoon, M. M. Kwon, H. Jin Park, S. Yun Park, K. Young Lim, J. Joo and B.-K. Park, “A study of docetaxel and irinotecan in children and young adults with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumors,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-622.

[107] J. Koo, J. Knight-Perry, C. Galambos, L. P. Browne, and C. R. Cost, “Pediatric metastatic cardiac angiosarcoma successfully treated with multimodal therapy: Case report and review of literature,” *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 43, no. 2, pp. e203–e206, 2021, doi: 10.1097/MPH.0000000000001674.

[108] H. Kenmotsu and Y. Tanigawara, “Pharmacokinetics, dynamics and toxicity of docetaxel: Why the Japanese dose differs from the Western dose,” *Cancer Sci.*, vol. 106, no. 5, pp. 497–504, 2015, doi: 10.1111/cas.12647.

[109] Y. Ma, Q. Lin, Y. Yang, W. Liang, S. J. Salamone, Y. Li, Y.Lin, H. Zhao, Y. Zhao, W. Fang, Y. Huang, L. Zhang, “Clinical pharmacokinetics and drug exposure-toxicity correlation study of docetaxel based chemotherapy in Chinese head and neck cancer patients,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 8, no. 5, pp. 236–236, 2020, doi: 10.21037/atm.2020.01.76.

[110] F. K. Engels, W. J. Loos, J. M. van der Bol1, P. de Bruijn, R. H.J. Mathijssen, J. Verweij, R. A.A. Mathot, “Therapeutic drug monitoring for the individualization of docetaxel dosing: A randomized pharmacokinetic study,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 2, pp. 353–362, 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1636.

[111] G. Corona, C. Elia, B. Casetta, S. Frustaci, and G. Toffoli, “High-throughput plasma docetaxel quantification by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 412, no. 3–4, pp. 358–364, 2011, doi: 10.1016/j.cca.2010.11.010.

[112] A. Navarrete M. P*.* Martínez-Alcázara, I. Duránb, E. Calvob, B. Valenzuelac, C. Barbasa, A. García*.*, “Simultaneous online SPE-HPLC-MS/MS analysis of docetaxel, Temsirolimus and sirolimus in whole blood and human plasma,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 921–922, pp. 35–42, 2013, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.01.017.

[113] H. Yamaguchi A. Fujikawaa, H. Itoa, N. Tanaka, A. Furugena, K. Miyamoria, N. Takahashib, J. Oguraa, M. Kobayashia, T. Yamadac, N. Manod, K. Iseki*.*, “A rapid and sensitive LC/ESI-MS/MS method for quantitative analysis of docetaxel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 893–894, pp. 157–161, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.003.

[114] M. Nakamura-Horigome J. Koyama, T. Eizawa, H. Kasai, S. Kumazaki, H.Tsutsui, K. Koiwai, K. Oguchi, O. Kinoshita, Uichi Ikeda, “Successful treatment of primary cardiac angiosarcoma with docetaxel and radiotherapy,” *Angiology*, vol. 59, no. 3, pp. 368–371, 2008, doi: 10.1177/0003319707308212.

[115] I. E. L. M. Kuppens, M. J. van Maanen, H. Rosing, J. H. M. Schellens, and J. H. Beijnen, “Quantiative analysis of docetaxel in human plasma using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 19, no. 5, pp. 355–361, 2005, doi: 10.1002/bmc.457.

[116] M. Kazemi, J. Emami, F. Hasanzadeh, M. Minaiyan, M. Mirian, and A. Lavasanifar, “Development of a RP-HPLC method for analysis of docetaxel in tumor-bearing mice plasma and tissues following injection of docetaxel-loaded pH responsive targeting polymeric micelles,” *Res. Pharm. Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2020, doi: 10.4103/1735-5362.278710.

[117] E. Ziaei, J. Emami, M. Kazemi, and M. Rezazadeh, “Simultaneous determination of docetaxel and celecoxib in porous microparticles and rat plasma by liquid-liquid extraction and hplc with uv detection: In vitro and in vivo validation and application,” *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 23, no. 1, pp. 289–303, 2020, doi: 10.18433/JPPS30912.

[118] D. W. Kim, *A*. M. Yousaf, D. X. Li, J. O. Kim,C. S. Yong, K. H. Cho, Han-Gon Choi, “Development of RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and curcumin in rat plasma: Validation and stability,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 12, no. 1, pp. 105–113, 2017, doi: 10.1016/j.ajps.2016.08.002.

[119] P. B. Kharkar, S. S. Talkar, and V. B. Patravale, “A rapid and sensitive bio analytical rp-hplc method for detection of docetaxel: Development and validation,” *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 51, no. 4, pp. S729–S734, 2017, doi: 10.5530/ijper.51.4s.105.

[120] Q. Xu, N. Zhang, X. Yin, M. Wang, Y. Shen, S. Xu, L. Zhang, Z. Gu., “Development and validation of a nylon6 nanofibers mat-based SPE coupled with HPLC method for the determination of docetaxel in rabbit plasma and its application to the relative bioavailability study,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 878, no. 26, pp. 2403–2408, 2010, doi: 10.1016/j.jchromb.2010.07.011.

[121] J. J. M. A. Hendrikx, H. Rosing, A. H. Schinkel, J. H. M. Schellens, and J. H. Beijnen, “Combined quantification of paclitaxel, docetaxel and ritonavir in human feces and urine using LC-MS/MS,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 28, no. 2, pp. 302–310, 2013, doi: 10.1002/bmc.3021.

[122] G. H. da Silva, M. A. Fernandes, L. N. F. Trevizan, F. T. de Lima, J. O. Eloy, and M. Chorilli, “A Critical Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Docetaxel in Biological and Pharmaceutical Matrices,” *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 48, no. 6, pp. 517–527, 2018, doi: 10.1080/10408347.2018.1456315.

[123] M. Imran, S. Saleem, A. Chaudhuri, J. Ali, and S. Baboota, “Docetaxel: An update on its molecular mechanisms, therapeutic trajectory and nanotechnology in the treatment of breast, lung and prostate cancer,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 60, no. August, p. 101959, 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101959.

# **Publikacje, które wchodzą w skład rozprawy doktorskiej**