

MONITORIZAREA CROMATOGRAFICĂ A TRATAMENTULUI CU EPIRUBICINĂ LA PACIENȚII CU TUMORI VEZICALE

ZOLTÁN ATTILA MIHÁLY¹, MIUȚA FILIP², VIRGINIA COMAN²,
ORSOLYA MARIA MIHÁLY³, IOAN COMAN¹

¹Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, Spitalul Clinic
Municipal Cluj-Napoca, Secția Urologie

²Institutul de Cercetări în Chimie "Raluca Ripan", Universitatea Babeș-Bolyai,
Cluj-Napoca

³Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj, Secția ATI Ginecologie, Cluj-Napoca

Rezumat

Introducere. Epirubicina este un antibiotic din clasa antraciclinelor cu un puternic efect antitumoral, fiind utilizată în terapia adjuvantă și neoadjuvantă în tumorile vezicale infiltrative, precum și în tratamentul instilațional intravezical al tumorilor vezicale superficiale.

Obiectiv. Evaluarea cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță cu detecție în ultraviolet (HPLC-UV) a epirubicinei din serul pacienților cu tumori superficiale ale vezicii urinare, cărora li s-a administrat citostaticul imediat după rezecția endoscopică, în scopul detectării unei eventuale reabsorbții sistemice a acestuia.

Material și metodă. Măsurătorile au fost efectuate pe ser obținut prin centrifugare din probele sanguine recoltate înainte și la 1, 2, respectiv 10 ore după administrare intravezicală de epirubicină. De asemenea, au fost efectuate măsurători pe ser recoltat de la pacienți tratați cu epirubicină pe cale sistemică pentru cancere vezicale infiltrative sau metastatice. Înregistrările au fost realizate cu ajutorul unui cromatograf de lichide Jasco-980 la 254 nm, utilizând o coloană Luna C18 și faza mobilă acetonitril-apă (55:45, v/v). Cromatogramele și curba de calibrare au fost înregistrate și procesate cu softul ChromPass.

Rezultate. Metoda HPLC-UV elaborată a permis determinarea epirubicinei din serul obținut de la pacienții cu chemoterapie sistemică până la o concentrație minimă de 2 μg/mL a acesteia. În probele prelevate de la pacienții cu administrare intravezicală după rezecția endoscopică epirubicina nu a fost detectată.

Concluzie. Rezultatele obținute demonstrează că metoda HPLC-UV elaborată poate fi aplicată la monitorizarea tratamentului instilațional cu epirubicină la pacienții cu cancer de vezică urinară.

Cuvinte cheie: Epirubicina, HPLC-UV, cancer de vezică urinară, chemoterapie intravezicală.

CHROMATOGRAPHIC MONITORING OF EPIRUBICIN TREATMENT IN PATIENTS WITH BLADDER TUMORS

Abstract

Introduction. Epirubicin is an anthracyclenic antibiotic with a strong antiblastic activity used in the adjuvant and neoadjuvant therapy in muscle invasive bladder cancer, as well as in the postoperative intravesical instillation treatment of superficial in non-muscle invasive bladder tumors.

Objective. The assessment using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) of epirubicin in the serum of patients with superficial

bladder tumors to whom the antiproliferative was immediately administered after the endoscopic resection, in order to detect its possible systemic reabsorption.

Materials and methods. The measurements were done on serum obtained by centrifugation from the sanguine samples collected before and after 1, 2 respectively 10 hours after the intravesical instillation treatment with epirubicin. Also, measurements on serum collected from patients treated with epirubicin on systemic way for the infiltrative or metastatic bladder cancer were carried out. The registrations were performed with a Jasco-980 liquid chromatograph at 254 nm using a Luna C18 column and a mobile phase of acetonitril-water (55:45, v/v). The chromatograms and the calibration curve were recorded and processed by Jasco ChromPass software.

Results. The developed HPLC-UV method allowed the determination of epirubicin in the serum samples obtained from patients with systemic chemotherapy to a minimum concentration of 2 µg/mL of it. In the samples taken from the patients with intravesical instillation of epirubicin after the endoscopic resection, this cytostatic drug was not detected.

Conclusion. The obtained results demonstrate that the developed HPLC-UV method can be applied to monitor the instillation treatment with epirubicin at the patients with bladder cancer.

Keywords: epirubicin, HPLC-UV, urinary bladder cancer, intravesical chemotherapy.

Introducere

Epirubicina (figura 1) este un antibiotic antra-ciclinic nou, cu activitate antiproliferativă și capacitate de penetrare rapidă în citoplasmă, localizare la nivelul nucleului și inhibare a sintezei acizilor nucleici, precum și a activității mitotice [1,2].

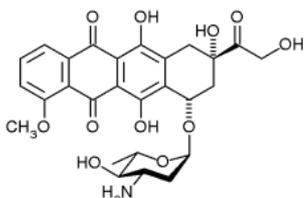


Figura 1. Formula structurală a epirubicinei. Denumirea IUPAC (8R,10S)-10-((2S,4S,5R,6S)-4-amino-5-hidroxi-6-metiltetrahidro-2H-piran-2-il)-6,8,11-trihidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-1-metoksi-7,8,9,10-tetrahidrotetracen-5,12-dionă [1].

Epirubicina este utilizată ca terapie adjuvantă și neoadjuvantă în cancerul vezical infiltrativ, precum și chemoterapie instilațională în tumorile vezicale superficiale [2]. Rezecția endoscopică a tumorilor vezicale (TUR-V) reprezintă primul pas terapeutic la pacienții cu tumori vezicale [3,4]. Se consideră că implantarea tumorală în timpul și imediat după rezecția endoscopică este responsabilă de majoritatea recidivelor tumorale precoce [5]. Astfel s-a implementat utilizarea chemoterapiei intravezicale peroperatorii, recomandare Grad A în Ghidurile Asociației Europene de Urologie [6]. Instilațiile intravezicale cu epirubicină în primele 6 ore postoperatorii conduc la o scădere a ratei de recurență cu până la 56% în cazul tumorilor multiple (LE: 1a) [4,7,8].

Adress for correspondence: mzzattika@yahoo.com

Cu toate că uroteliul nu permite reabsorbția, totuși, la nivelul soluțiilor de continuitate date de rezecție, epirubicina administrată intravezical poate ajunge teoretic în circulația sistemică [2]. În literatura de specialitate există foarte puține referințe care să descrie acest fenomen [2]. Datorită scăderii vârstei de apariție a bolii, există situații speciale (gravide și lăuze) în care pătrunderea acestor substanțe în circulația sistemică nu este permisă. Datele din literatură indică utilizarea cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC) la determinarea epirubicinei și a metaboliților săi din probe biologice [9-17].

Scopul lucrării noastre constă în evaluarea cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță cu detecție în ultraviolet (HPLC-UV) a epirubicinei din serul pacienților cu tumori superficiale ale vezicii urinare, cărora li s-a administrat citostaticul imediat după rezecția endoscopică, în scopul detectării unei eventuale reabsorbții sistemice a acestuia.

Materiale și metodă

Echipamente: Cromatograf de lichide de înaltă performanță Jasco-980 echipat cu: pompă de înaltă presiune (PU-980), unitate cu gradient ternar (LG-980-02), degazor 3-linie (DG-980-50), termostat de coloană (CO-2060 Plus), coloană Luna C18 (100 Å, 5 µm, 25×0,46 cm), detector UV-Vis (UV-980-975), software ChromPass; Echipament de extracție în fază solidă (SPE, Phenomenex) cu 12 canale, pompă de vacuum și cartușe PolySpher RP18-Cat (100 mg); Spectrometru UV-Vis Unicam UV 4 cu detecție cu fotomultiplicator în domeniul 190-900 nm și software Vision.

Materiale: Epirubicina 50 mg, produs liofilizat pentru soluție perfuzabilă, 50 mg clorhidrat de epirubicină și excipienți (lactoză monohidrat și p-hidroxibenzoat de

metil) per un flacon pentru administrare intravenoasă/intravezicală. A fost preparată o soluție stoc (1 mg/mL) de epirubicină (produs liofilizat) în apă (0,9% NaCl; soluție de culoare roșie) care a fost trecută pe filtre de teflon speciale (Serynge filters, PTFE 0,45 μm , Traser) pentru îndepărtarea posibilelor impurități. Solvenții utilizați au fost acetonitril pentru uz HPLC (Merck) și apă ultrapură (Millipore), iar clorura de sodiu de puritate p.a. (Chimopar, București).

Metoda HPLC-UV: Probele etalon și cele biologice au fost eluate în condiții izocratice pe o coloană Luna C18 cu faza mobilă acetonitril-apă (55:45, v/v) la un debit de eluție de 1 mL/min. Detecția UV a fost la 254 nm. Cromatograma obținută pentru epirubicină reprezintă profilul caracteristic al epirubicinei obținută din antibioticul administrat. Picul de la 3,8 min este considerat ca fiind cel atribuit epirubicinei, iar cel de la 2,3 min este atribuit altor componente din matricea antibioticului. Pentru determinarea cantitativă a epirubicinei în probele biologice (ser) a fost necesară trasarea curbei de calibrare. Din soluția stoc de epirubicină, au fost preparate în apă soluțiile de referință pentru liniaritate în intervalul de concentrații 5-80 $\mu\text{g/mL}$.

Prelevarea probelor biologice pentru analiză: După obținerea acordului comisiei de etică a clinicii și a consimțământului informat al pacienților, au fost recoltate probe de sânge de la pacienți aflați sub chemoterapie sistemică și de la pacienți cu chemoterapie instilațională intravezicală. Probele de ser au fost obținute prin centrifugare la 30 minute după recoltare și au fost păstrate la întuneric la temperaturi cuprinse în intervalul 2-8°C până la prelucrare [2]. Pacienții cu administrare sistemică au reprezentat lotul A, iar cei cu administrare intravezicală lotul B.

Lotul A. Au fost efectuate prelevări de sânge de la 10 pacienți cu cancer infiltrativ/metastatic de vezică urinară cărora li s-a administrat soluție perfuzabilă de epirubicină 80 mg/m² astfel: **înainte de administrarea dozei de epirubicină (Proba I), la 1 oră (Proba II) și, respectiv, la 2 ore de la administrarea dozei (Proba III).**

Lotul B. Au fost efectuate prelevări de sânge de la 20 pacienți cu cancer superficial de vezică urinară stadializați pTa-pT1 post TUR-V, cu administrare intravezicală de epirubicină (50 mg/50 mL) și menținerea citostaticului în vezică timp de 2 ore, după cum urmează: **înainte de administrarea dozei de epirubicină (Proba I), la 1 oră (Proba II), la 2 ore (Proba III) și, respectiv, la 10 ore de la administrarea dozei (Proba IV).**

Pregătirea probelor biologice pentru analiză: Probele de ser au fost centrifugate și trecute pe cartușe SPE PolySpher RP18-Cat (100 mg). Cartușele au fost inițial condiționate cu acetonitril. Apoi, s-a trecut prin cartuș un volum de 0,5 mL sau 1 mL din proba de ser, care a fost apoi eluată cu 0,5 mL acetonitril. Înainte de analiza HPLC, pentru eliminarea urmelor de particule solide din soluție, probele obținute prin SPE au fost trecute pe filtre de teflon speciale (Serynge filters, PTFE 0,45 μm , Traser). Probele au fost injectate în cromatograf manual, într-o valvă-inel de 20 μl ,

cu ajutorul unei seringi Hamilton Rheodyne (50 μL). Au fost înregistrate cromatograme în UV la 254 nm, verificându-se reproductibilitatea acestora prin trei-patru injecții.

Rezultate

Studii spectroscopice UV-Vis

Pentru a stabili lungimea de undă optimă necesară detecției epirubicinei prin metoda HPLC, a fost înregistrat spectrul UV-Vis al unei soluții metanolice de epirubicină, în domeniul spectral 190-700 nm. Măsurătorile UV-Vis au fost realizate în soluție metanică, în celule de cuarț cu drum optic de 1 cm. Determinarea poziției maximelor din spectru și a absorbanței acestora s-a efectuat automat prin programul soft Vision al spectrometrului (figura 2).

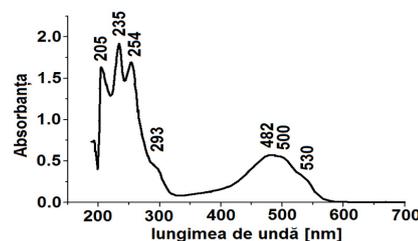


Figura 2. Spectrul UV-Vis al epirubicinei în soluție NaCl 0,9% (celulă cu drum optic de 1 cm).

Banda caracteristică pentru epirubicină este la 254 nm, fiind selectată pentru detecția UV prin metoda HPLC. Benzile de la 204 nm și 235 nm sunt datorate lactozei, respectiv p-hidroxi benzoatului de metil, compuși prezenți în excipient. Banda de absorbție din domeniul vizibil este rezultată din suprapunerea a cel puțin trei benzi și este datorată structurii antraciclinice.

Metoda HPLC-UV

Pentru determinarea cantitativă a epirubicinei din ser a fost trasată curba de calibrare pe baza a 6 puncte, obținându-se un răspuns liniar, coeficientul de corelație fiind de 0,9955 (figura 3). Limita de detecție (LD) obținută a fost ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$. Cromatograma înregistrată a epirubicinei reprezintă profilul caracteristic al epirubicinei obținută din antibioticul administrat. Picul de la 3,8 min este atribuit epirubicinei, iar cel de la 2,3 min altor componente din matricea citostaticului.

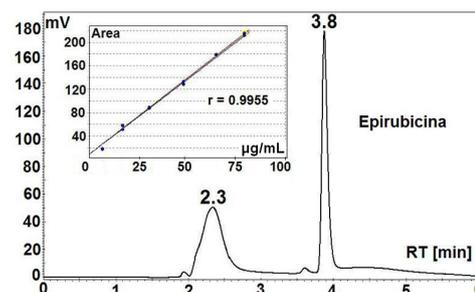


Figura 3. Cromatograma HPLC-UV a epirubicinei ($c = 0,8$ $\mu\text{g/mL}$) și curba de calibrare ($r = 0,9955$); detecție la 254 nm; LD ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$.

Studiul probelor biologice analizate

Din cromatogramele înregistrate în UV la 254 nm și fluorescență reiese că cele mai bune rezultate au fost obținute prin detecție UV. În figurile 4 și 5 sunt prezentate cromatogramele obținute pentru probele biologice analizate. Acestea reprezintă profiluri caracteristice ale probelor evaluate și interpretate datele obținute.

Cromatogramele probelor de ser obținute de la pacienții tratați sistemic indică prezența epirubicinei în serul analizat, observându-se o scădere a concentrației plasmatice la 2 ore după administrare, în timp ce cromatogramele probelor de ser obținute de la pacienții tratați prin administrarea intravezicală a epirubicinei nu indică prezența acesteia în serul analizat la o limită de detecție de 2 $\mu\text{g/mL}$. Ca urmare, nivelul reabsorbției sistemice după administrarea intravezicală a 50 mg/50 mL epirubicină este practic inexistent sau mai mic de 2 $\mu\text{g/mL}$.

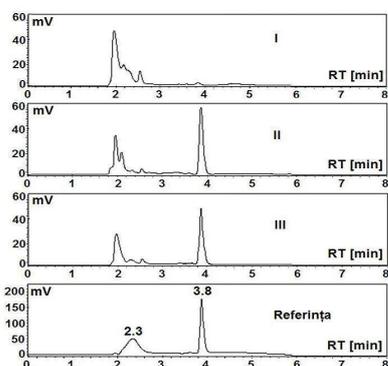


Figura 4. Cromatogramele HPLC-UV ale probelor de ser provenite de la pacienții cu administrare sistemică a epirubicinei: proba I (recoltare înainte de administrare), proba II (recoltare la o oră de la administrare), proba III (recoltare la 2 ore de la administrare) comparativ cu cromatograma epirubicinei referință.

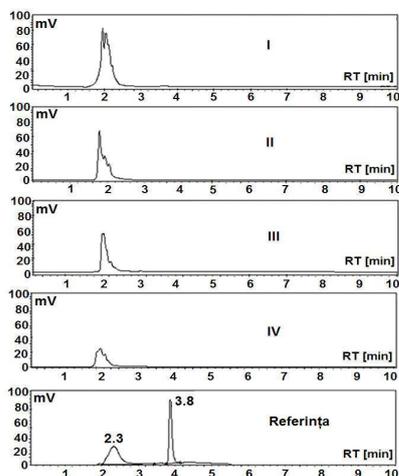


Figura 5. Cromatogramele HPLC-UV ale probelor de ser provenite de la pacienții cu administrare intravezicală a epirubicinei: proba I (recoltare înainte de administrare), proba II (recoltare la o oră de la administrare), proba III (recoltare la 2 ore de la administrare), proba IV (recoltare la 10 ore de la administrare) comparativ cu cromatograma epirubicinei referință.

Discuții

Maessen și colab. [9] au îmbunătățit metoda HPLC de determinare a epidoxorubicinei, utilizând cartușe de extracție C18 Sep-Pak. Domeniul de recuperare a fost de 58% pentru agliconul doxorubicinei și 98% pentru glucuronida 4'-epidoxorubicina. Antraciclinele au fost separate prin metoda HPLC cu fază inversă în 9 minute și măsurate în fluorescență. Shinkai și colab. [10] au utilizat o metodă HPLC cu fază inversă cu detecție în fluorescență pentru determinarea concentrațiilor antracicinelor și a metabolizilor lor din probe biologice. Utilizând extracția pe cartușe C18 Sep-Pack și apoi extracția cu solvenți, limita de detecție a fost mai mică de 1 ng/mL pentru toți compușii de extracție din 0,5 mL de plasmă. Dine și colab. [11] au dezvoltat o metodă HPLC izocratică, rapidă și sensibilă pentru analiza epirubicinei și a trei metabolizi din plasmă. Medicamentul a fost extras pe o coloană Sep-Pak C18, iar recuperarea medie a fost mai mare de 85%. Barker și colab. [12] au utilizat o metodă HPLC de determinare a epirubicinei și a metabolizilor săi din plasmă, în timp de 96 ore de la infuzia de epirubicină la pacienți cu multiple mielome. Metoda a fost validată pentru epirubicină pe domeniul 5-100 ng/mL. Fogli și colab. [13] au validat o metodă HPLC de determinare a daunorubicinei, idarubicinei, doxorubicinei, epirubicinei și a 13 metabolizi dihidro. Curba de calibrare efectuată pe domeniul 0,4-10.000 ng/mL a fost liniară. Limita de detecție și limita de cuantificare au fost de 0,4 ng/mL pentru o probă de 50 mL (40 pg/injecție) pentru toate antraciclinele testate. Utilizând o metodă HPLC, Dodde [14] a determinat epirubicina și metabolitul său epirubicinol din salivă și plasmă. Detecția s-a efectuat spectrofluorimetric cu excitație la 474 nm și emisie la 551 nm, metoda fiind liniară pe domeniul de concentrație 5-1000 $\mu\text{g/L}$ pentru epirubicină și 2-400 $\mu\text{g/L}$ pentru epirubicinol.

Pe baza datelor din literatură am considerat aplicabilă cromatografia HPLC pentru studiul efectuat. Am realizat o metodă HPLC cu detecție UV ($\text{LD} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) pe care am utilizat-o la monitorizarea epirubicinei serice, concentrațiile plasmatice în terapia sistemică fiind de 0,018 mg/mL la o doză administrată de 80 mg/m² [2].

La pacienții cu funcție hepatică și renală normală, după administrarea intravenoasă de 60-150 mg/m² Epirubicină nivelul plasmatic scade după un model triexponențial, cu o primă fază foarte rapidă, fenomen obiectivat și de cromatogramele noastre la două ore de la administrare, urmând o fază terminală lentă cu un timp mediu de înjumătățire de 40 ore [2].

Eficacitatea instilației intravezicale peroperatorii a fost dovedită de numeroase metaanalize prin reducerea ratei de recurență cu 11,7% (de la 48,4% la 36,7%) la tumorile unice, ceea ce implică o reducere a riscului relativ de 24,2%. O îmbunătățire mult mai semnificativă (56%) a fost observată în cazul tumorilor multiple [4,7,8]. Studiile experimentale pe animale sugerează că epirubicina

poate afecta sarcina. Cu toate că epirubicina nu trece de bariera hematoencefalică, nu se cunoaște dacă epirubicina este excretată în laptele matern. Din considerentul că alte antracicline ajung în lapte și au potențiale efecte nocive asupra nou-născuților, alimentația la sân se întrerupe înainte de administrarea epirubicinei. Datorită faptului că am tratat paciente lăuze cu tumori vezicale, am dorit să verificăm dacă epirubicina administrată intravezical ajunge în circulația sistemică. Deși cromatogramele noastre nu au detectat epirubicină plasmatică după administrare intravezicală, epirubicina nu poate fi administrată la mamele care alăptează, fapt susținut și de recomandările producătorului [2,6].

Cu toate că nu am găsit date în literatură despre reabsorbția produsului după administrarea intravezicală, prospectul revizuit în 2011 al medicamentului specifică faptul că “doar o cantitate mică de ingredient activ se reabsoarbe sistemic după administrare intravezicală” [2]. Ca urmare, sunt necesare studii mai aprofundate și mai precise, cu scăderea limitei de detecție și corelarea cu numărul tumorilor rezecate și dimensiunea suprafeței de rezecție.

Concluzii

Metoda HPLC-UV elaborată în această lucrare poate detecta epirubicina din probe biologice până la o concentrație minimă de 2 μg/mL.

Rezultatele obținute demonstrează utilitatea aplicării metodei HPLC-UV la monitorizarea epirubicinei administrată sistemic, ceea ce sugerează utilitatea metodei în ajustarea administrării dozelor de epirubicină la pacienții cu cancer vezical infiltrativ sau metastatic.

Indicată și administrată corect, epirubicina nu a fost detectată prin metoda elaborată în serul obținut de la pacienții cu administrare intravezicală, ceea ce sugerează că metoda HPLC-UV poate constitui un indicator al corectitudinii actului medical.

Mulțumiri

Acest studiu a fost parțial finanțat prin Proiectul de cercetare CEEX, Contract nr. 200/2006-2008, Programul VIASAN.

Bibliografie

1. Epirubicin. From Wikipedia, the free encyclopedia. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Epirubicin>
2. Hospira UK Ltd. Epirubicin Hydrochloride 2 mg/mL Injection summary of product characteristics last updated on the eMC: 01/06/2011. Available from: URL: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/18609#PREGNANCY>
3. Sternberg CN, Pansadoro V, Calabrò F, et al. Can patient selection for bladder preservation be based on response to chemotherapy? *Cancer*, 2003; 97(7):1644-1652.
4. Gudjonsson S, Adell L, Merdasa F et al. Should all patients

with non-muscle-invasive bladder cancer receive early intravesical chemotherapy after transurethral resection? The results of a prospective randomised multicentre study. *Eur Urol*, 2009; 55(4):773-780.

5. Heney NM, Nocks BN, Daly JJ, Blitzer PH, Parkhurst EC. Prognostic factors in carcinoma of the ureter. *J Urol*, 1981; 125(5):632-636.

6. Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 2004; 171(6Pt1):2186-2190.

7. Oddens JR, van der Meijden AP, Sylvester R. One immediate postoperative instillation of chemotherapy in low risk Ta, T1 bladder cancer patients. Is it always safe? *Eur Urol*, 2004; 46(3):336-338.

8. Berrum-Svennung I, Granfors T, Jahnson S, et al. A Single instillation of epirubicin after transurethral resection of bladder tumors prevents only small recurrences. *J Urol*, 2008; 179(1):101-107.

9. Maessen PA, Mross KB, Pinedo HM, van der Vijgh WJ. Improved method for the determination of 4'-epidoxorubicin and seven metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1987; 417:339-346.

10. Shinkai H, Takahashi H, Kikuchi K, Kawai H, Otake N. Determination of the new morpholino anthracycline MX2.HCl and its metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1991; 570(1):203-208.

11. Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Gosselin P, Cazin JL. Rapid quantitative determination of epirubicin and its metabolites in plasma using high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr*, 1990; 4:20-23.

12. Barker IK, Crawford SM, Fell AF. 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*, 1996; 681:323-329.

13. Fogli S, Danesi R, Innocenti F, et al. An improved HPLC method for therapeutic drug monitoring of daunorubicin, idarubicin, doxorubicin, epirubicin, and their 13-dihydro metabolites in human plasma. *Ther Drug Monit*, 1999; 21:367-375.

14. Dodde WI, Maring JG, Hendriks G, et al. Determination of epirubicin and its metabolite epirubicinol in saliva and plasma by HPLC. *Ther Drug Monit*, 2003; 25:433-440.

15. Nxiang H, Ruiping L. Isolation and purification of epirubicin from raw product by preparative chromatography on a silica column with aqueous-rich mobile phase. *J Liq Chromatogr Rel Tech*, 2005; 28:2737-2751.

16. Martel P, Pinguet F, Petit I, Poujol S, Astre C, Fabbro M. Stability of the principal cytostatic agents during storage at unusual temperatures. *International J Pharm*, 1997; 149:37-42.

17. Filip M, Coman V, Avram V, Grecu R, Mihaly Z, Coman I. HPLC monitoring of some chemotherapeutic drugs used in the treatment of bladder cancer. 6th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries (ICOSECS'6), Sofia, Bulgaria, 10-14 septembrie 2008. Book of Abstracts, Academic Publishing House, Editor Union of Chemists in Bulgaria, 4-P12, 216.