

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Edvard Sidoryk

Hodnocení efektivity dekontaminace povrchů od cytostatik pomocí pulzního laseru

Evaluation of the effectiveness of decontamination of surfaces from cytostatics using pulse laser

Diplomová práce

Vedoucí: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.
Konzultant: RNDr. Jakub Širc, PhD.

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne.....

podpis

Děkuji paní profesorce Bosákové za její trpělivost, vstřícnost a neocenitelnou pomoc při vypracování této práce.

Dále děkuji panu doktorovi Šircovi za spolupráci na experimentech s laserem a za metodické vedení v průběhu řešení diplomové práce.

Velmi si cením pomoci pana inženýra Gvoždiaka, který se podílel na přípravě laserového zařízení, praktické realizaci a konzultacích, týkajících se fyzikální podstaty práce.

Obsah

Obsah	4
Seznam zkratk	6
Abstrakt	7
Úvod	8
Teoretická část	9
1. Nádorová onemocnění a studovaná cytostatika	9
1.1. Doxorubicin	10
1.2. Paklitaxel	11
1.3. Vinkristin	11
1.4. Topotekan	13
2. Kontaminace cytostatiky	14
3. Dekontaminace cytostatik	17
4. Laserová ablace	20
4.1. Parametry pulzního laseru	23
4.2. Použitá laserová záření a jejich charakteristiky	24
5. Vysokotlaká kapalinová chromatografie	26
5.1. Výpočet účinnosti dekontaminace	26
5.2. Důležité chromatografické parametry	27
5.3. Rešerše studovaných analytů	28
Experimentální část	32
Použité chemikálie a materiály	32
Referenční cytostatika	32
Reagencie	32
Laboratorní přístroje a detektory	32
Chromatografické kolony	32
Referenční materiály	33
Laserová záření	33
Úvod k experimentální části	33
Optimalizace analytické metody	34
Výběr rozpouštědla	34
Příprava zásobních roztoků a studium stability odezvy	34
Výběr vlnové délky	35

Optimalizace HPLC metodiky	35
Určení kalibrační závilosti	39
Laserová dekontaminace	43
Příprava vzorků na laserové ozařování	43
Laserové parametry	44
Manipulace s laserem	44
CO ₂ laser	46
Zpracování dat a výpočty	47
Výsledky	48
Statistické zpracování výsledků – ukázková studie paklitaxelu na nerezové misce	49
Dekontaminace paklitaxelu	52
Nerezové Petriho misky	52
Skleněné Petriho misky	55
Porcelánové kelímky	56
CO ₂ laser	57
Dekontaminace doxorubicinu	58
Nerezové Petriho misky	58
Skleněné Petriho misky	59
Porcelánové kelímky	59
Dekontaminace vikristinu	60
Dekontaminace topotekanu	61
Teplotní záznam během měření	62
Vizuální změny pozorované na površích	63
Diskuze	64
Závěr	67
Seznam literatury	68

Seznam zkratek

DAD	Detektor diodového pole
LA	Laserová ablace
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MRM	Multiple Reaction Monitoring
RECETOX	Research Centre for Toxic Compounds in the Environment
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzním módu

Abstrakt

Léčba onkologických onemocnění je spojena s aplikací cytostatik - biologicky vysoce účinných látek, které mají řadu nežádoucích účinků na lidský organismus, a to i ve velmi malých dávkách. Vědecká pracoviště a především nemocniční oddělení, kde se s cytostatiky pracuje, jsou často kontaminována těmito látkami. Přestože se jedná o relativně malá množství, jejich dlouhodobé účinky na lidský organismus nejsou zanedbatelné. Odstranění především hydrofobních cytostatik z povrchů běžnými metodami v některých případech selhává. Tato diplomová práce se zabývá ověřením účinnosti dekontaminace povrchů od vybraných cytostatik pomocí pulzního laseru.

Treating oncological diseases involves cytostatics – biologically highly potent substances that have a range of adverse effects on the human body, even at very low doses. Scientific institutions, particularly hospital departments where cytostatics are handled, are often contaminated with these substances. Although the quantities involved are relatively small, their long-term effects on the human organism should not be underestimated. The removal of primarily hydrophobic cytostatics from surfaces using conventional methods sometimes proves ineffective. This thesis will focus on verifying the effectiveness of surface decontamination from selected cytostatics using pulsed laser technology.

Úvod

Současná onkologická farmakoterapie je založena na aplikaci vysoce cytotoxických látek s nízkou terapeutickou dávkou a úzkým terapeutickým oknem. Cytostatika vykazují výraznou afinitu k rychle proliferujícím buňkám díky inhibici mitotických drah, poškození DNA a aktivaci apoptotických signálních kaskád. Mechanismus účinku zahrnuje interkalaci do DNA, inhibici mikrotubulární polymerace či blokaci topoizomeras.

Cytostatika jsou však vysoce persistentní a biologicky aktivní i při velmi nízkých koncentracích. Představují tak závažné riziko i pro neexponované osoby, zejména při chronické expozici kontaminovanému prostředí. Nejčastějšími cestami kontaminace je dermální kontakt a inhalační expozice aerosolům. Stopová množství mohou být detegována na pracovních plochách, rukavicích, podlahách, klikách dveří, osobních ochranných pomůckách a oděvech.

Standardní postupy dekontaminace využívají chemickou oxidaci peroxidem vodíku, alkalickou hydrolýzu nebo prostředky na bázi chloru. Tyto metody jsou často limitovány nízkou efektivitou při degradaci specifických molekulárních struktur cytostatik, časovou náročností, nutností manuální aplikace a rizikem poškození povrchů. Chemická činidla mohou generovat reaktivní vedlejší produkty a zvyšovat environmentální zátěž.

Laserová dekontaminace představuje fyzikálně-chemickou alternativu, využívající interakci pulzního laserového záření s kontaminovaným povrchem. Mechanismus účinku je založen na fototermické a fotoablativní destrukci kontaminantu bez nutnosti chemických reagentů. Absorpce energie v kontaminované vrstvě indukuje rychlou termickou desorpci, přičemž nedochází k významné degradaci povrchů. Krátké pulzy s vysokou intenzitou tak umožňují selektivní odstranění tenkých vrstev organických látek.

Cílem této práce je kvantitativní hodnocení účinnosti pulzního laseru při dekontaminaci definovaných povrchů, kontaminovaných vybranými cytostatiky: doxorubicinem, paklitaxelem, vinkristinem a topotekanem. Experimentální program zahrnuje variabilitu povrchového materiálu (nerezová ocel, keramika, sklo), modifikaci parametrů ozařování a následnou analýzu zbytkové kontaminace pomocí metody HPLC-DAD a HPLC-MS/MS.

Teoretická část

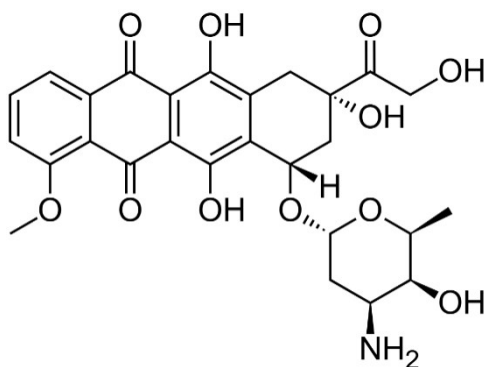
1. Nádorová onemocnění a studovaná cytostatika

Nádorová onemocnění představují heterogenní skupinu chorob, jejichž společným znakem je nekontrolované dělení buněk a narušení homeostáze tkání. Tento patologický proces je důsledkem genetických a epigenetických změn, které vedou k deregulaci signálních drah zodpovědných za proliferaci, apoptózu a diferenciaci buněk [1]. Na základě biologického chování lze nádory rozdělit na benigní, které nevykazují invazivitu a nemetastazují, a maligní, jež jsou schopny invazivního růstu a šíření do vzdálených tkání prostřednictvím metastáz. Vznik nádorového onemocnění je výsledkem procesu označovaného jako karcinogeneze. Tento proces zahrnuje iniciaci – genetickou mutaci v tumor supresorových genech nebo protoonkogenech; propagaci – nekontrolovaný růst transformovaných buněk; a progresi – invazivní růst, angiogenezi a metastázování [2]. Kromě genetických a epigenetických faktorů se na vzniku rakoviny podílejí i environmentální vlivy, mezi které patří chemické karcinogeny, ionizující a ultrafialové záření, chronická infekce nebo zánětlivé procesy. [3]

Léčba nádorových onemocnění je komplexní a zahrnuje různé terapeutické strategie v závislosti na typu nádoru, jeho rozsahu a biologických charakteristikách. Mezi hlavní metody patří chirurgie, radioterapie, cílená léčba, imunoterapie a chemoterapie, přičemž v klinické praxi se metody často kombinují pro maximalizaci léčebného účinku [4]. Zatímco některé modalities, jako je chirurgie a radioterapie, se zaměřují na lokální kontrolu nádoru, systémové terapie, mezi které patří chemoterapie, cílená léčba a imunoterapie, působí na nádorové buňky v celém organismu. Chirurgická léčba je nejstarší a stále nejúčinnější metoda léčby solidních nádorů, pokud jsou lokalizované a resekovatelné. Radioterapie využívá ionizující záření k destrukci nádorových buněk prostřednictvím indukce nevratného poškození DNA. Cílená léčba se zaměřuje na specifické molekulární dráhy, které podporují růst a přežití nádorových buněk. Imunoterapie využívá schopnost imunitního systému rozpoznávat a eliminovat nádorové buňky. Nejdůležitější systémovou metodou zůstává chemoterapie, která využívá cytotoxická léčiva – cytostatika – k inhibici růstu nádorových buněk [5]. V této práci byla použita čtveřice běžných cytostatik: doxorubicin, pakitaxel, vinkristin a topotekan.

1.1. Doxorubicin

Doxorubicin je chemoterapeutikum ze skupiny antracyklinových antibiotik, strukturálně charakterizované planaritou aromatického systému a přítomností chinonové a amino skupiny (obr. 1.1), které umožňují interkalaci do DNA a tvorbu kovalentních i nekovalentních interakcí s cílovými biomolekulami. V klinické praxi je doxorubicin široce používán při léčbě solidních nádorů a hematologických malignit, zejména karcinomu prsu, sarkomů měkkých tkání, Hodgkinova a non-Hodgkinova lymfomu, akutních leukémií, karcinomu ovaria, plic a močového měchýře. Je součástí několika standardizovaných chemoterapeutických režimů, a to jak v konvenční formě, tak ve formě pegylovaných liposomálních derivátů, které zajišťují prodloužený biologický poločas a sníženou orgánovou toxicitu. [6-8]



Obrázek 1.1: Doxorubicin.

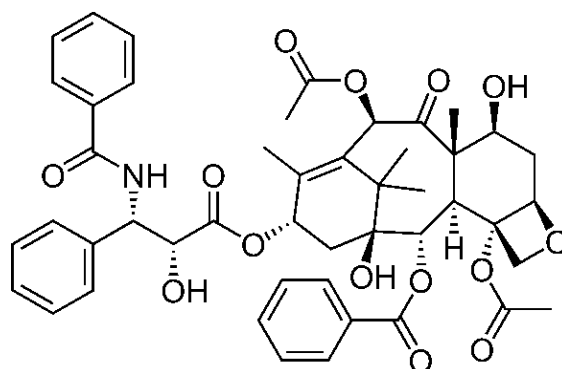
Doxorubicin je červenooranžový krystalický prášek s intenzivní barvou. V klinické praxi se používá zpravidla ve formě hydrochloridu, který je dobře rozpustný ve vodě, omezeně rozpustný v methanolu a ethanolu a velmi málo rozpustný v acetonitrilu. Stabilita doxorubicinu je pH-závislá – při fyziologickém pH dochází k postupné degradaci, zatímco při kyselém pH je stabilní. Je zároveň fotosenzitivní a degraduje při expozici světlu. Spektrálně absorbuje v oblasti viditelného světla s hlavním absorpčním maximem při 480 nm, sekundární maxima v ultrafialové oblasti se nacházejí – v závislosti na rozpuštědle – v rozmezí 230-260 nm. [7]

Z hlediska farmakokinetiky vykazuje doxorubicin rychlou distribuci s vysokou afinitou k tkáním, zejména k myokardu, játrům a nádorovým buňkám. Metabolizuje se převážně v játrech za vzniku aktivního metabolitu doxorubicinolu a vylučuje se biliárně. Plazmatický poločas je relativně dlouhý a vykazuje vícefázový průběh. [8]

Závažnou a dávkou limitující toxicitou je kardiotoxicita, která může být akutní i chronická, a je spojena s kumulativní dávkou. Mezi další časté nežádoucí účinky patří myelosuprese, gastrointestinální toxicita, alopecie, hyperpigmentace kůže, zbarvení moči do oranžova, a v případě úniku doxorubicinu mimo cévy vznik lokálních nekrot. [6, 9-10]

1.2. Paklitaxel

Paklitaxel je cytotoxické léčivo ze skupiny taxanů, izolované původně z kůry tisů krátkolistého. Chemicky se jedná o diterpenový alkaloid se složitou makrocyclickou strukturou zahrnující estery, hydroxylové skupiny a aromatické substituenty (obr. 1.2). Používá se při léčbě karcinomu prsu, ovaria, plic, pankreatu, jícnu, hlavy, krku a močového měchýře. [11-12]



Obrázek 1.2: Paklitaxel.

Paklitaxel je bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, avšak velmi dobře rozpustný v organických rozpouštědlech jako methanol, ethanol a acetonitril. Je relativně stabilní za běžných laboratorních podmínek, avšak citlivý na světlo a extrémní pH. Charakteristické UV absorpční maximum se nachází při 227 nm. [11-13]

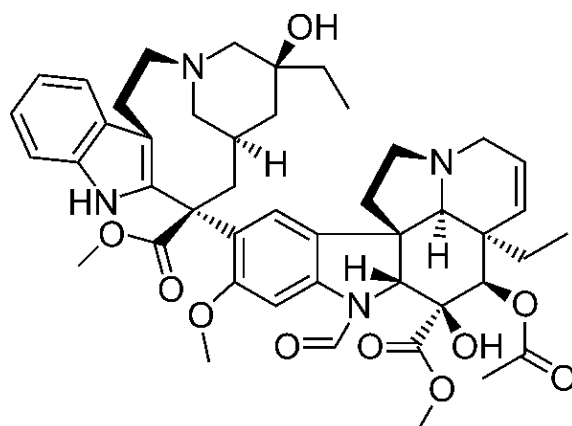
Farmakokineticky se paklitaxel vyznačuje nelineární kinetikou závislou na dávce, s vysokou vazbou na plazmatické proteiny, širokou distribucí do tkání a metabolismem v játrech cytochromy P450. Eliminační poločas se pohybuje mezi 5–20 hodinami. [14]

Hlavními nežádoucími účinky jsou myelosuprese, periferní neuropatie, alopecie, mukozitida, nauzea, zvracení, vyrážky, bolest kloubů a bolest svalstva. Kardiotoxicita je méně častá, ale může se objevit bradykardie, arytmie či hypotenze během infuze. [15]

1.3. Vinkristin

Vinkristin je vinka-alkaloid izolovaný z barvínkovce růžovového, chemicky indolový dimerní alkaloid s komplexní strukturou obsahující indolovou a dihydroindolovou jednotku spojenou přes uhlíkový skelet (obr. 1.3). Patří mezi mitotická cytostatika působící na mikrotubuly, avšak na rozdíl od taxanů jejich polymeraci inhibuje. Používá se primárně v léčbě hematologických malignit – akutní lymfoblastické leukémie, Hodgkinova a non-Hodgkinova lymfomu, mnohočetného

myelomu, dále u některých solidních nádorů. [16]



Obrázek 1.3: Vinkristin.

Vinkristin je bílý až světle žlutý amorfní prášek, velmi dobře rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu a mírně v ethanolu. Rozpustnost v acetonitrilu je nízká. Stabilní je v kyselém až mírně kyselém prostředí (pH 3–5), zatímco při vyšších hodnotách pH dochází k degradaci. Je fotosenzitivní a vysoce citlivý na oxidaci. Spektrum absorpce zahrnuje maximum při 297 nm. [17-19]

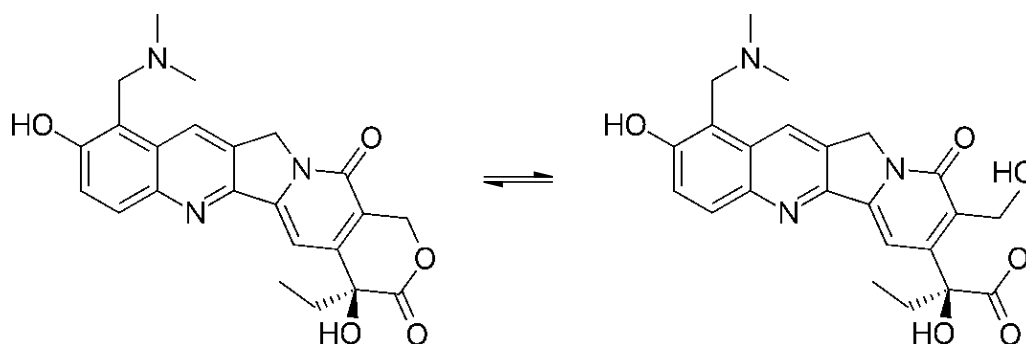
Farmakokinetika je charakterizována rozsáhlou distribucí do tkání, silnou vazbou na tkáňové proteiny a nízkou penetrací přes hematoencefalickou bariéru. Metabolismus probíhá hepatálně, zejména enzymem CYP3A4. Eliminační poločas je relativně dlouhý a exkrece je převážně biliární. [16]

Hlavní a limitující toxicitou je periferní neurotoxicita, projevující se jako motorická neuropatie, parestezie, poruchy chůze, slabost, atrofie svalstva a v těžších případech paralýza kraniálních nervů či střevní neprůchodnost. Neurotoxicita je kumulativní, částečně reverzibilní, a nezávisí na myelosupresi [23]. Naopak myelosupresivní účinky jsou minimální, což umožňuje kombinaci s jinými myelotoxickými cytostatiky [21]. Další vedlejší účinky zahrnují zácpu, mukozitidu, alopecii a lokální nekrózy při úniku vinkristinu mimo cévní systém. [20, 22]

Podává se výhradně intravenózně, ne intratekálně, neboť intratekální aplikace vede k ireverzibilnímu narušení bílé hmoty mozku a téměř vždy k fatálnímu selhání centrální nervové soustavy [23]. Vinkristin je součástí několika standardních režimů, zejména v hematologii. Dávkování je silně omezeno toxicitou, přičemž celková týdenní dávka obvykle nepřekračuje 2 mg, bez ohledu na tělesný objem. [24]

1.4. Topotekan

Topotekan je polosyntetický derivát kamptotekinu, alkaloidu izolovaného ze stromu kamptotéka ostrolistá. Patří mezi inhibitory topoisomerasy I. Strukturně se jedná o pentacyklický alkaloid s laktonovým kruhem, jehož stabilita je pH-závislá – při fyziologickém pH podléhá hydrolyze na inaktivní karboxylát. Laktonová forma je odpovědná za farmakologický účinek, přičemž rovnováha mezi oběma formami ovlivňuje biologickou dostupnost a účinnost léčiva (obr. 1.4). Topotekan je využíván v léčbě recidivujícího karcinomu ovaria, drobnobuněčného karcinomu plic, cervikálního karcinomu a experimentálně i v dalších solidních nádorech včetně nádorů centrální soustavy. [25]



Obrázek 1.4: Topotekan, laktonová a karboxylátová forma.

Topotekan je žlutý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a methanolu, mírně rozpustný v ethanolu a špatně rozpustný v acetonitrilu [27-28]. Rozpustnost je ovlivněna přítomností laktonového kruhu, který je pH-labilní – při pH nad 6 podléhá hydrolyze na inaktivní karboxylát, zatímco při pH 4–5 zůstává stabilní. Je rovněž citlivý na světlo. Absorpční maximum se nachází při 380 nm. [25, 29]

Farmakokinetika topotekanu je lineární, s krátkým eliminačním poločasem, malým distribučním objemem a nízkou vazbou na plazmatické proteiny. Metabolismus probíhá částečně enzymatickou hydrolyzou laktonového kruhu na karboxylát, dále minimálně přes CYP450. Eliminuje se převážně renálně v nezměněné formě, což vyžaduje úpravu dávkování při snížené funkci ledvin. [25-26]

Dominantní toxicitou je myelosuprese, především neutropenie, dále trombocytopenie a anémie. Neutropenie má obvykle kumulativní charakter. Dále toxicita zahrnuje nauzeu, zvracení, průjem, mukozitidu. Alopecie je častá, ale reverzibilní. Jiné nežádoucí účinky zahrnují tělesnou

slabost, horečku, zvýšený rozpad hepatocytů. Neurotoxicita je vzácná. [25-26]

2. Kontaminace cytostatiky

Kontaminace cytostatiky představuje v nemocničním prostředí závažný a dlouhodobě sledovaný problém, zejména ve specializovaných zónách určených pro jejich přípravu, manipulaci a aplikaci [30-32]. Základní legislativní rámec pro přípravu cytostatických léčiv v České republice tvoří vyhláška č. 84/2008 Sb., která stanovuje požadavky na přípravu těchto látek v kontrolovaných čistých prostorách [33]. Příprava musí probíhat v podtlakových boxech s vertikálním laminárním prouděním vzduchu (tzv. izolátorech), jejichž účelem je minimalizovat inhalační a dermální expozici pracovníků. [34]

K roku 2024 bylo v České republice v provozu 46 pracovišť zabývajících se přípravou cytostatik, většinou začleněných do nemocničních lékáren. Ročně je zde připraveno více než půl milionu dávek onkologických léčiv, přičemž celkové náklady na tuto činnost se pohybují okolo 200 milionů korun [35]. Mezi nejvíce exponované skupiny zdravotnického personálu patří farmaceutičtí asistenti a nemocniční farmaceuti, kteří se podílejí na přípravě cytostatik, a zdravotní sestry zajišťující jejich aplikaci [36]. V zájmu snížení rizik se příprava cytostatik soustřeďuje do specializovaných aseptických provozů, často centralizovaných v rámci onkologických center. Nad rámec legislativních požadavků si jednotlivá zdravotnická zařízení stanoví vlastní interní směrnice, které reflektují lokální provozní podmínky. [34, 37]

Tato opatření zahrnují především:

- Zónování pracovišť dle míry rizika kontaminace, což umožňuje striktní oddělení čistých a kontaminovaných prostor, a tím i účinnější kontrolu pohybu osob a materiálu.
- Používání osobních ochranných pracovních prostředků, jako jsou rukavice, ochranné oděvy, obličejové štíty a respirátory. Je však běžné, že sestry používají pouze standardní rukavice, které neposkytují dostatečnou ochranu vůči cytostatikům.
- Pravidelná odborná školení personálu zaměřená na rizika expozice a správné manipulační postupy.
- Zavedení uzavřených systémů pro rekonstituci a aplikaci cytostatik, které významně snižují pravděpodobnost úniku účinné látky do pracovního prostředí.
- Používání infuzních setů s proplachovým režimem a bezpečnostních koncovek, které minimalizují riziko expozice při odpojování pacienta nebo při zbytkových dávkách chemoterapie.

- Implementaci validovaných dekontaminačních protokolů a systematického monitoringu povrchové kontaminace pomocí stěrů z pracovního prostředí. [34, 37]

Expozice cytotoxickým léčivům může nastat prostřednictvím celé řady mechanismů, které jsou výsledkem jak přímého kontaktu s léčivem, tak i sekundárního šíření kontaminace prostředím. Jedním z hlavních zdrojů expozice je přímý únik léčiva při manipulaci. Povrchové koncentrace cytostatik v reálných provozních podmínkách kolísají od hodnot pod limitem detekce až po stovky ng/cm². Byly zdokumentovány extrémní hodnoty, například až 60 556 pg/cm² platiny (z platinových cytostatik) v české nemocnici a 881 812 pg/cm² cytostatika cyklofosfamidu na Slovensku. Ve stacionárních jednotkách nemocnic je frekvence kontaminace povrchů platinovými deriváty a cyklofosfamidem často 78–100 %, přičemž kontaminace je vyšší v aplikačních zónách než v lékárenských pracovištích. [34, 37]

Další významný zdroj představuje kontaminace obalů léčivých přípravků a závažné riziko také představuje nedostatečná funkčnost nebo nesprávné použití bezpečnostních izolátorů. I přes vysoký podíl pracovišť vybavených podtlakovými izolátory byly zaznamenány případy, kdy příprava probíhala v neoddělených prostorech nebo bez odpovídající technické podpory. [40]

Významný faktor kontaminace představuje lidský faktor, konkrétně nedodržování standardních operačních postupů. Studie prokázaly kontaminaci rukavic u 33 % zdravotníků manipulujících s cytostatiky, přičemž ve 43 % pozitivních vzorků šlo o vícečetnou kontaminaci. Výměna rukavic se doporučuje každých 30 minut z důvodu kumulativní propustnosti materiálu.

Při nesprávné manipulaci s infuzními sety může dojít k úniku léčiva do okolního prostředí. Efektivní strategií minimalizace tohoto rizika je používání infuzních setů s proplachovým režimem, které zajišťují kompletní podání dávky a redukci zbytkových objemů. Důležité je rovněž úplné odstranění vzduchu z infuzních vaků. [34, 43]

Sekundární kontaminace prostředí prostřednictvím biologických tekutin pacientů byla potvrzena detekcí cytostatik v domácnostech, včetně koupelen, kuchyní a obytných místností. Cyklofosfamid byl nalezen i devět měsíců po poslední aplikaci. V hospicích a domovech pro seniory byly detegovány zbytky platiny, ifosfamidu nebo methotrexátu u klientů s onkologickou anamnézou. Riziková je i manipulace s kontaminovaným odpadem a textiliemi pacientů. [44]

Od roku 2008 probíhá v České republice a na Slovensku dlouhodobý monitoring kontaminace pracovního prostředí cytostatiky. Tento projekt je výsledkem spolupráce Masarykova onkologického ústavu a Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. Dvakrát ročně jsou prováděny monitorovací kampaně zaměřené na identifikaci a kvantifikaci povrchové kontaminace v nemocnicích a lékárnách. Sleduje se 16 nejčastěji používaných cytostatik, konkrétně: 5-fluorouracil, cyklofosfamid, platina

(zahrnuje cisplatinu, karboplatinu, oxaliplatinu), gemcitabin, ifosfamid, paklitaxel, irinotekan, docetaxel, methotrexát, etoposid, kapecitabin, imatinib, doxorubicin, sunitinib a tři výše zmíněné deriváty platiny samostatně. [40, 45]

Významným výstupem této aktivity je rozsáhlá studie z let 2018–2020, která hodnotila povrchovou kontaminaci na 20 pracovištích v České republice a 4 na Slovensku. Kromě hlavních markerů (5-fluorouracil, cyklofosfamid, platina) se analyzovalo dalších 10 cytostatik. Cílem bylo získat detailní obraz o kontaminaci různých typů prostor (přípravny, aplikační místa, zázemí sester), identifikovat nejvíce kontaminovaná místa, vyhodnotit potenciální rizika pro personál a navrhnout preventivní opatření. Studie potvrdila široký výskyt kontaminace napříč zařízeními, včetně míst mimo přípravné prostory, a poukázala na nutnost důsledného dodržování bezpečnosti práce a pravidelné dekontaminace. [34]

Paralelně probíhá monitoring kontaminace cytostatiky, provozovaný platformou cytostatika.cz, kterou vede tým z RECETOX, Masarykovy univerzity a Masarykova onkologického ústavu. RECETOX (Research Centre for Toxic Compounds in the Environment) je výzkumné centrum při Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, specializované na analýzu toxických látek v prostředí, včetně vývoje citlivých analytických metod, hodnocení expozice a environmentálních rizik. V oblasti zdravotnictví zajišťuje RECETOX validaci a provoz analytických protokolů pro sledování povrchové kontaminace cytostatiky. Program cytostatika.cz poskytuje standardizované měření kontaminace nejčastěji používanými léčivy, zejména cyklofosfamidem, 5-fluorouracilem, paklitaxelem a celkovou platinou, s možností rozšíření o další chemoterapeutika jako gemcitabin, ifosfamid, irinotekan, docetaxel a methotrexát. Výstupem jsou kvantifikované výsledky (v pg/cm^2), reporty pro jednotlivá pracoviště a odborné konzultace k možným nápravným opatřením. Vzorky jsou analyzovány pomocí HPLC-MS/MS a ICP-MS. Program sleduje dlouhodobé trendy až do roku 2025 a výsledky jsou využívány i pro tvorbu evropských doporučení a revizi pracovních standardů. [45-46]

Data z environmentálního monitoringu v České republice jednoznačně ukazují, že klíčovým faktorem ovlivňujícím míru povrchové kontaminace cytostatiky není samotný objem připravovaných dávek, ale především úroveň adherence ke správné laboratorní praxi a míra proškolení zdravotnického personálu. Statistické analýzy neprokázaly korelaci mezi množstvím připravovaných cytostatik a úrovní kontaminace. Bylo potvrzeno, že i pracoviště s relativně nízkým počtem měsíčních příprav mohou vykazovat vysokou míru kontaminace, pokud nejsou důsledně dodržovány standardní operační postupy. Naopak, pravidelný monitoring v kombinaci s implementací nápravných opatření prokazatelně vede ke snižování kontaminace bez ohledu na objem

manipulovaných léčiv. [34]

Monitoring zahrnuje odběry stěrů z vysoce exponovaných povrchů – pracovní plochy bezpečnostní boxy, podlahy, kliky, transportní pomůcky, klávesnice nebo elektronická zařízení. Naměřené hodnoty se vyjadřují jako pg/cm^2 a porovnávají se s doporučenými orientačními limity. Přestože legislativní limity dosud chybí, odborná literatura nabízí referenční hodnoty, např. $10 \text{ ng}/\text{cm}^2$ pro cyklofosfamid nebo takzvané „Threshold Guidance Values“ – $67 \text{ pg}/\text{cm}^2$ pro cyklofosfamid a $12 \text{ pg}/\text{cm}^2$ pro platinu, stanovené z českých dat z let 2006–2010. Tyto hodnoty slouží jako nástroj hodnocení účinnosti ochranných opatření a jako indikátory potřeby intervence [39]. Monitoring v ČR je významný i na mezinárodní úrovni – výsledky byly zahrnuty do evropských směrnic a doporučení. [45]

Biologický monitoring slouží ke stanovení vnitřní expozice zdravotnického personálu cytostatikům, nejčastěji prostřednictvím analýzy moči. Studie opakovaně potvrdily přítomnost cytostatik v moči exponovaných pracovníků, což ukazuje na reálné riziko systémového vstupu těchto látek do organismu. Monitoring ovzduší se uplatňuje selektivně, zejména při práci s práškovými formami léčiv, kde existuje riziko inhalační expozice – používají se aktivní i pasivní vzorkovače. [48]

Z analytických technik se využívá především:

- LC-MS/MS: standardní metoda s vysokou citlivostí pro detekci širokého spektra cytostatik, [37, 49]
- ICP-MS: kvantifikace celkové platiny jako markeru expozice platinovým derivátům, [49-50]
- GC-MS a LC-UV: doplňkové metody pro specifické sloučeniny, méně často používané. [51]

3. Dekontaminace cytostatik

Dekontaminace představuje klíčový prvek přerušení expozičních cest. Účinnost závisí na typu použitého roztoku, aplikaci a době kontaktu. Pro rutinní dekontaminaci se doporučují prostředky na bázi chloru nebo peroxidu vodíku, přičemž chlorové přípravky vykazují vyšší účinnost, ale i vyšší toxicitu. Ani opakovaná aplikace nezaručuje úplné odstranění kontaminace – žádný testovaný prostředek ze studií nezajistil 100% odstranění cytostatik. Účinnost se liší dle typu látky i přípravku – aktivní chlor a detergenty byly účinné na cisplatinu, 5-fluorouracil, paklitaxel a irinotekan; glukoprotamin nebo peroxid vodíku vykazovaly nízkou účinnost zejména vůči cyklofosfamidu. Opakovaná a kombinovaná chemická a mechanická dekontaminace je zásadní. [34, 40]

Mezi základní dekontaminační roztoky patří:

- Voda s detergentem – základní a nezbytný krok pro odstranění hrubé kontaminace. Využívá se jako první fáze čištění před aplikací chemicky aktivních dezinfekčních a dekontaminačních prostředků.
- 70% ethanol nebo isopropanol – běžně používané dezinfekční a dekontaminační látky, které však mohou mobilizovat adsorbované zbytky cytostatik z hlubších vrstev povrchových materiálů, pravděpodobně vlivem narušení ochranné voskové vrstvy a následného uvolnění kontaminace z podkladu. U cyklofosfamidu bylo po třech aplikacích zaznamenáno zvýšení kontaminace až o 315 %.
- 0,5% chlornan sodný s deaktivací thiosíranem sodným po 15 minutách kontaktu – vysoce účinný zejména proti cyklofosfamidu. Studie prokázaly snížení zbytkové kontaminace na 2–24 % v závislosti na podmínkách aplikace. Nevýhodou je dráždivost a potenciální koroze povrchů. V praxi se osvědčilo měsíční použití chlornanu sodného s následnou deaktivací thiosíranem sodným.
- Peroxid vodíku – účinnost závisí na konkrétním cytostatiku. Proti paklitaxelu je účinný, zatímco proti cyklofosfamidu má slabší účinnost (reziduální kontaminace až 37 % po použití některých přípravků). Formulace obsahující peroxid vodíku v kombinaci s kvartérními amoniovými solemi a chloridy dosahují vyšší účinnosti – snižují kontaminaci cyklofosfamidem na přibližně 8 %.
- Speciální komerční prostředky určené k dekontaminaci cytostatik – účinnost závisí na konkrétním složení a cílové látce. Například prostředky Desamox, Incidin A, Incidin R a Incidin E byly účinné proti 5-fluorouracilu (zbytková kontaminace 0–23 %), irinotekanu (1–22 %) a paklitaxelu (11–19 %). Naopak prostředky s glukoprotaminem (Incidin extra N) a peroxidem vodíku (Desamox) vykazovaly nižší účinnost proti cyklofosfamidu (zbytková kontaminace kolem 40 %). [40-41]

Pro zajištění účinné dekontaminace povrchů je nutné postup opakovat, ideálně třikrát v krátkém sledu. Přesto žádný z dostupných prostředků nedokáže zcela odstranit všechny sledované cytotoxické látky. Doporučuje se rotace dekontaminačních přípravků kvůli prevenci mikrobiální rezistence, ačkoli vliv této strategie na účinnost vůči cytostatikům dosud nebyl dostatečně prozkoumán. Výběr dekontaminačního prostředku by měl zohlednit i potenciální zdravotní a materiálová rizika – například dráždivost pro dýchací cesty nebo korozi povrchů. Pro každodenní použití jsou vhodné především prostředky s oxidačními vlastnostmi. V prostředích se zvýšeným rizikem kontaminace, například v přípravě cytostatik, je vhodné zařadit pravidelnou aplikaci

silnějších prostředků, například na bázi aktivního chloru. [40-41]

Dále je pro účinnou dekontaminaci nezbytné legislativní zakotvení monitoringu pracovního prostředí, stanovení bezpečných limitů kontaminace a vytvoření rámce pro jejich vyhodnocování v konkrétních provozech. Potřebný je také výzkum kontaminace v domácím a sociálním prostředí pacientů, například v hospicích nebo domovech pro seniory, kde je riziko šíření podhodnocováno.

Největší přetrvávající problémy dekontaminace povrchů od cytostatik spočívají v nedosažitelnosti úplného odstranění reziduí i po opakovaném čištění. Účinnost jednotlivých přípravků se výrazně liší v závislosti na konkrétní látce. Alkoholové roztoky mohou vést k nechtěné mobilizaci a redistribuci kontaminace, zatímco chlorové přípravky, i když účinné, představují riziko tvorby toxických vedlejších produktů. Celkově chybí dostatečné množství dat o účinnosti běžně používaných dekontaminačních prostředků proti cytostatikům a vliv rotace těchto prostředků není objasněn. Dále chybí výzkum zaměřený na produkty degradace cytostatik a jejich dopad na zdraví exponovaných pracovníků. Významný nedostatek představuje i absence dlouhodobého, standardizovaného monitoringu kontaminace a shody nad metodikou dekontaminace. [31-32, 34, 36-38, 40]

4. Laserová ablace

Laser (z angl. *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) je zařízení, které generuje intenzivní, koherentní, monochromatické a směrově stabilní elektromagnetické záření. Princip jeho činnosti je založen na stimulované emisi – kvantovém jevu, při němž excitovaný elektron po absorpci fotonu s odpovídající energií přechází do nižšího energetického stavu za současného uvolnění dalšího fotonu o identických parametrech (vlnová délka, fáze, směr). Tento kaskádový mechanismus umožňuje amplifikaci (zesílení) záření. [50]

Základní konstrukce laseru zahrnuje tři hlavní prvky: [51]

- Aktivní médium, kde dochází k excitaci elektronů – může jím být například Nd³⁺-dopované optické vlákno, CO₂ plyn nebo různé polovodičové materiály.
- Čerpací zdroj, který dodává energii k excitaci atomů či iontů – bývá optický, elektrický nebo chemický.
- Optický rezonátor, tvořený dvěma zrcadly (jedním zcela odrazivým a druhým částečně propustným), který zajišťuje vícenásobný průchod světla aktivním médiem a jeho zesílení.

Lasery se dělí na dva základní typy podle režimu generace záření:

Spojitý laser vydává nepřetržitý paprsek s konstantní intenzitou. Uplatňuje se v aplikacích, kde je klíčová stabilita výkonu a dlouhodobý energetický přenos, například při svařování kovových materiálů nebo řezání.

Pulzní laser generuje záření ve velmi krátkých, ale intenzivních pulzech, které mohou trvat od femtosekund po milisekundy. Díky vysoké špičkové intenzitě a možnosti přesné časové a prostorové kontroly se využívá v mikroobrábění, laserové ablací, povrchových úpravách a zejména v aplikacích, kde je potřeba minimalizovat tepelné poškození okolního materiálu. [52]

V rámci této diplomové práce byl studován potenciál pulzního laseru jako alternativního a cíleného nástroje pro dekontaminaci povrchů kontaminovaných cytostatiky. Cílem bylo využít lokalizovaného účinku vysokoenergetických pulzů k destrukci nebo odstranění zbytkové kontaminace bez nutnosti použití agresivních chemických činidel.

Pro aplikaci pulzního laseru jako nástroje pro dekontaminaci je klíčové porozumět základním principům interakce laserového záření s pevným materiálem. Tato interakce zahrnuje řadu fyzikálních jevů, jejichž charakter závisí na parametrech záření (vlnová délka, fluence, délka pulzu, tvar a profil paprsku) i vlastnostech materiálu (optické, termomechanické a strukturální). Fluence

(energie na jednotku plochy, vyjádřená v $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) udává, kolik energie dopadne na danou plochu při jednom pulzu – klíčový parametr určující, zda dojde k zahřátí, tavení, ablaci nebo dezintegraci materiálu. [52-53]

Úvodním krokem interakce záření s materiálem je absorpce fotonů, při níž dochází k excitaci elektronů v materiálu. Absorpce závisí na struktuře látky – u kovů dominuje absorpce volnými elektrony, zatímco u dielektrik a organických látek je limitována šířkou zakázaného pásu. Absorbovaná energie je přeměněna na teplo, což vede k lokálnímu ohřevu, tavení, případně k dezintegraci povrchové vrstvy. Při vyšších fluencích dochází k ionizaci a vzniku plazmy, která může absorbovat další energii a vytvořit plazmovou rázovou vlnu, jež zesiluje mechanické efekty. [54-56]

Na základě délky pulzu se rozlišují dva základní mechanismy ablace:

- Tepelná ablace, dominantní při delších pulsech (ns– μ s), je založena na konvenčním ohřevu, tavení a vypaření materiálu.
- Netepelná (fotofyzikální/fotochemická) ablace, typická pro ultrakrátké pulzy (ps–fs), probíhá v časových škálách kratších než doba tepelné relaxace a je řízena přímou excitací elektronové struktury. [56-57]



Obrázek 4.1: Obecné schéma femtosekundové laserové ablace.

Různé typy materiálů reagují specifickými mechanismy:

- **Nerezová ocel** absorbuje infračervené záření velmi dobře, zejména při 1064 nm (oblast Nd³⁺-dopovaných vláknových laserů). Díky vysoké tepelné vodivosti a teplotě tání je vhodná pro tepelnou ablaci. Dochází k lokálnímu tavení, odpaření a odstranění oxidovaných vrstev, účinnost je ovlivněna plazmatickým stíněním a odvodem tepla. [58-59]
- **Sklo** a ostatní dielektrika jsou v infračervené oblasti opticky transparentní, a tedy neabsorbují standardní záření efektivně. Použití ultrakrátkých pulzů s vysokou fluencí umožňuje vícefotonovou absorpci, vznik plazmy a následnou ablační dezintegraci bez výrazného tepelného poškození okolí – netepelnou ablaci. V případě nevhodné volby parametrů hrozí vznik mikrotrhlin a rozbití materiálu. [60]
- **Keramické materiály** vykazují vysokou tvrdost, teplotní stabilitu a různou optickou odezvu. Laserová ablace zde kombinuje tepelné a mechanické efekty. U transparentních keramik lze využít nelineární absorpci, u absorbujících sloučenin je nutné optimalizovat fluenci a délku pulzu pro zamezení praskání a delaminace. [60]
- **Organické materiály a polymery** podléhají nejen tepelným efektům, ale i fotochemickým reakcím (štěpení vazeb, tvorba radikálů, selektivní fotodekompozice). V UV oblasti převažuje fotochemická složka. [61]

Laserová ablace má v dnešní době širokou škálu využití:

Zpracování materiálů: laserová ablace nachází rozsáhlé uplatnění při mikro- a nanostrukturování materiálů, kde umožňuje vytváření přesně definovaných 3D struktur a povrchových textur. Používá se při mikroobrábění, gravírování, řezání i vrtání různých typů materiálů včetně kovů a slitin. Dále je využívána ke svařování, povrchovému tvrzení a cílenému odstraňování materiálu pomocí krátkých pulzů. Významnou aplikací je syntéza nanočástic kovů a oxidů. Dále slouží k výrobě nanostrukturovaných prášků a tenkých filmů, které se využívají ve fotonice, senzorce či jako katalyticky aktivní vrstvy. [62, 64-65]

Chemická analýza: v analytické chemii se laserová ablace uplatňuje jako metoda selektivního odběru materiálu. V kombinaci se spektroskopickými technikami, jako je laserem indukovaná průrazová spektroskopie, umožňuje přímou analýzu elementárního složení. Laserová ablace je rovněž klíčovou součástí hmotnostně spektrometrických metod, jako jsou LA-ICP-MS nebo MALDI, používaných pro analýzu stopových prvků nebo biomolekul. [66]

Biotechnologie a medicína: v biomedicíně je laserová ablace běžně využívána k remodelaci tkání – příkladem je refrakční chirurgie rohovky LASIK a LASEK, endometriální ablace, nebo ablace tkání při léčbě arytmií. Používá se také pro perkutánní ablaci benigních i maligních ložisek u štítné

žlázy a jater nebo při dentálních a cévních zákrocích. [67]

Čištění a dekontaminace povrchů: ablace umožňuje šetrné a efektivní odstranění kontaminačních vrstev z různých povrchů bez použití chemikálií a mechanického kontaktu. Uplatňuje se při čištění kamenných objektů, odstraňování barev, korozních či sulfidových vrstev, a rovněž při dekontaminaci radioaktivně znečištěných materiálů. Laserové čištění se využívá i pro údržbu průmyslových součástí (např. motory, kompresorové lopatky) či obnovu optických vlastností povrchů optických prvků. [60, 63, 68]

4.1. Parametry pulzního laseru

Při laserovém opracování materiálů mají klíčový vliv na účinnost a kvalitu ablace následující parametry: výkon, frekvence pulzů, fluence, rychlost skenování, velikost obrazce a fokus. Každý z těchto faktorů určuje průběh interakce záření s materiálem a míru tepelného či mechanického ovlivnění povrchu.

Výkon laseru (W) udává množství energie dodané za jednotku času. Vyšší výkon obvykle zvyšuje hloubku průniku laserového paprsku a rychlost odstranění materiálu, ale zároveň zvyšuje riziko přehřátí, oxidace či vzniku nežádoucích, teplem ovlivněné zóny. [68]

Frekvence pulzů (Hz), tedy počet pulzů za sekundu, ovlivňuje rychlost procesu a akumulaci tepla. Při vysoké frekvenci může dojít k překryvu efektů jednotlivých pulzů, což zvyšuje tepelný stres materiálu. [71]

Fluence ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) je energie dopadající na jednotku plochy a představuje rozhodující parametr pro překonání prahu ablace. Pod tímto prahem nedochází k materiálové změně, naopak nad ním nastává efektivní odstranění kontaminovaných vrstev. [69]

Rychlost skenování ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$) ovlivňuje dobu expozice paprsku na daném místě. Vyšší rychlost redukuje tepelné efekty a hloubku ablace, zatímco pomalejší skenování zvyšuje účinnost, ale i riziko poškození povrchu. [69]

Velikost obrazce ($\text{mm} \times \text{mm}$), tedy rozsah skenované plochy, určuje rovnoměrnost opracování a jeho celkovou efektivitu. Menší obrazce zajišťují vyšší preciznost, větší naopak vyžadují optimalizaci trajektorie a ohniska paprsku.

Fokus (μm), definovaný jako průměr zaostřeného paprsku, je přímo spojen s plošnou hustotou energie. Čím menší průměr, tím vyšší intenzita záření v místě dopadu a ostřejší, lokalizovanější efekt. Odchylka od optimálního ohniska snižuje účinnost a zvětšuje zónu rozptylu. [70]

4.2. Použitá laserová zařízení a jejich charakteristiky

Pro ilustraci výše popsaných parametrů byly v této práci využity tři laserové systémy, lišící se výkonem, konstrukcí a charakterem záření.

ROD 100 W a **ROD 200 W** jsou pulzní vláknové lasery vyvinuté českou společností Narran, optimalizované pro jemné čisticí aplikace bez poškození povrchu. Oba pracují ve vláknové konfiguraci s možností automatické fokusace a pokročilého řízení parametrů pomocí programovatelného logického automatu (displeje), který zajišťuje stabilní provoz, správu procesních sekvencí a integraci s periferními systémy. Parametry obou zařízení [71-72] jsou uvedeny níže:

- Vlnová délka: ~1064 nm (typické pro Nd³⁺-dopované vláknové lasery)
- Výkon: 100 W a 200 W
- Špičkový výkon: až 10 kW (ROD 100 W); až 232 kW (ROD 200 W)
- Délka pulzu a opakovací frekvence: nastavitelné, typicky v rozmezí ns–μs
- Fokus: ~100–500 μm (dle konfigurace hlav a optiky)
- Režim: pulzní
- Chlazení: vzduch
- Typické aplikace: selektivní odstraňování oxidů, organických nánosů a korozních produktů z kovových a porézních povrchů.



ROD 100 W



ROD 200 W

Obrázek 4.2: Laserové systémy **ROD 100 W** a **ROD 200 W**. Upraveno z [71-72]

Thunder Laser Nova 24 představuje stolní CO₂ laserový systém využitý okrajově pro testování interakce dlouhovlnného záření s organickými látkami. Parametry [73] jsou uvedeny níže:

- Vlnová délka: 10.6 μm
- Výkon: 130 W
- Režim: kontinuální
- Fokus: typicky stovky μm
- Systém vhodný pro gravírování, značení a řezání polymerních a organických povrchů.

Tyto systémy reprezentují dva zásadně odlišné přístupy: vláknové lasery s vysokou hustotou výkonu a krátkými pulzy pro přesnou ablaci a CO₂ laser s dlouhou vlnovou délkou a kontinuálním režimem pro interakci s organickými a nekovovými materiály.



Thunder Laser Nova 24

Obrázek 4.3: Laserový systém **Thunder Laser Nova 24**. Upraveno z [73]

5. Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (dále jen HPLC) je klíčovou separační technikou pro kvalitativní i kvantitativní analýzu organických látek v komplexních matricích, obzvláště při nízkých koncentracích. Použitá metodika byla založena na reverzně-fázové chromatografii (RP-HPLC), která využívá rozdílné interakce analytů s polární mobilní fází a hydrofobní stacionární fází – typicky silikagelem modifikovaným C18 řetězcí. Cytostatika, vzhledem ke své aromatické nebo heterocyklické povaze a přítomnosti polárních funkčních skupin, jsou vhodnou strukturou pro tento typ chromatografie.

Pro separaci všech studovaných analytů byly použity kolony typu C18 s mobilními fázemi na bázi vodných octanových pufrů kombinovaných s organickým rozpouštědlem (methanol nebo acetonitril), optimalizovanými pro každý analyt. Pro jeden z analytů byl použit gradientový elučný režim (při kterém se v čase mění zastoupení složek mobilní fáze) pro zlepšení tvaru píku a tím i citlivosti metody.

Analýzy byly prováděny na systému Agilent 1260 Infinity s detektorem diodového pole DAD G1315D. Tento detektor snímá celé UV/VIS spektrum (190–600 nm) v reálném čase a poskytuje jak kvantitativní chromatografická data, tak spektrální profil eluovaných složek, což je užitečné při identifikaci nečistot, verifikaci analytu nebo detekci fotodegradačních produktů.

Pro porovnání citlivosti a selektivity byla u vybraných měření použita tandemová hmotnostní spektrometrie na systému Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS. Ionizace probíhala pomocí elektrosprejového zdroje, zatímco trojitý kvadrupól umožňoval selektivní detekci cílových iontů i jejich fragmentů generovaných v kolizní cele. Tato konfigurace umožňuje sledovat jak intaktní molekuly, tak produkty případné fotodegradace či ablace, což je užitečné pro hodnocení účinnosti dekontaminace.

5.1. Výpočet účinnosti dekontaminace

Účinnost laserové dekontaminace byla vyjádřena jako procentuální pokles množství analytu po laserovém ozáření vůči kontrolnímu vzorku (neozářený blank), podle rovnice 1:

$$\text{Účinnost [\%]} = (1 - A / A_0) \cdot 100 \quad (1)$$

kde A_0 je průměrná integrační plocha píků neozářených vzorků a A je průměrná integrační plocha píků ozářených vzorků.

Tento výpočet je kvantitativně relevantní za předpokladu splnění několika podmínek:

reprodukovatelná a kvantitativní extrakce z povrchu, ověřená linearita kalibračních křivek, validní stanovení mezí detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), a kontrola interferujících faktorů nesouvisejících s fotonovým působením, jako je volatilita nebo chemický rozklad během aplikace. Meze detekce a kvantifikace byly v této práci získány výpočtem ze šumu základní linie (σ) a směrnice (S) získané pro závislost výšky píku na koncentraci analytu.

Vzorce pro výpočet mezí detekce a kvantifikace na základě kalibrační křivky jsou:

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= (3 \cdot \sigma) / S \\ \text{LOQ} &= (10 \cdot \sigma) / S \end{aligned}$$

kde:

- σ je směrodatná odchylka interceptu (osa y) kalibrační přímky,
- S je směrnice kalibrační křivky.

5.2. Důležité chromatografické parametry

Záznamem průběhu separace je chromatogram, který zobrazuje odezvy detektoru v závislosti na čase. Retenční čas t_R odpovídá době, která uplyne od nástřiku vzorku do maxima píku příslušného analytu. Mrtvý čas t_M představuje dobu průchodu neinteragující látky kolonou – tedy čas, během něhož se složka pohybuje v mobilní fázi bez zdržení ve fázi stacionární. Rozdíl mezi retenčním a mrtvým časem pak udává redukovaný retenční čas t_R' , jenž kvantifikuje dobu, kterou analyt stráví ve stacionární fázi:

$$t_R' = t_R - t_M$$

Jednou z klíčových retenčních veličin je retenční faktor k , který udává poměr doby, po kterou analyt setrvává ve stacionární fázi, k době strávené v mobilní fázi:

$$k = (t_R' / t_M)$$

Vzájemná retence dvou analytů je vyjádřena selektivitou α , definovanou jako:

$$\alpha = (k_2 / k_1)$$

kde k_2 je retenční faktor více zadržovaného analytu a k_1 retenční faktor méně zadržovaného. Rozlišení $R_{1,2}$ popisuje míru separace dvou píků na chromatogramu a vypočítává se podle vztahu:

$$R_{1,2} = (t_{R,2} - t_{R,1} / 0,5 \cdot (w_{b,2} + w_{b,1}))$$

kde

- $t_{R,1}$ je retenční čas méně zadržovaného analytu,
- $t_{R,2}$ je retenční čas více zadržovaného analytu,
- $w_{b,1}$ a $w_{b,2}$ jsou šířky píků těchto dvou analytů při základně.

5.3. Rešerše studovaných analytů

Z hlediska kvantitativní analýzy cytostatik se v odborné literatuře běžně uplatňují validované RP-HPLC metody, přizpůsobené specifickým chemickým vlastnostem jednotlivých látek. Níže jsou shrnuty v literatuře používané chromatografické podmínky pro doxorubicin, paklitaxel, vinkristin a topotekan, včetně složení mobilní fáze, typu stacionární fáze, elučního režimu a detekčních parametrů.

Doxorubicin

Všechny metody využívají UV/Vis nebo DAD detekci, přičemž vlnové délky se pohybují v rozsahu 233–480 nm.

Koncentrační rozsahy pokrývají spektrum od 0,0013 µg/ml až po 120 µg/ml. Nejnížší dosažené limity detekce činí 0,0013 µg/ml a limity kvantifikace sahají až k 0,0044 µg/ml.

Použité stacionární fáze zahrnují:

- Merck C18 (100 × 4,60 mm, 3,5 µm) [74]
- Vydac C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [76]
- LiChroCart® C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [77]
- Hibar RT C18 (150 × 4,60 mm, 3,5 µm) [79]

Průtok mobilní fáze se pohyboval v rozmezí 0,3–1,0 ml/min.

Mobilní fáze byly tvořeny acetonitrilem, vodou, kyselinou octovou, kyselinou fosforečnou, methanolem nebo pufrů.

Použitá složení zahrnovala:

- Acetonitril : voda při pH 3,0 (30:70) [74]
- Acetonitril : 0,02M hydrogenfosforečnan draselný při pH 5,4 (50:50) [75]
- Gradient vody a acetonitrilu, obě složky obsahující 0,1% kyselinu triflouroctovou (TCA) [76]
- Acetonitril : 0,03M hydrogenfosforečnan draselný při pH 6,2 (45:55) [77]
- Vodný roztok kyseliny octové a acetonitrilu [78]
- Směs methanolu, acetonitrilu a vody s přidavkem 20mM octanu amonného [79]

Paklitaxel

Všechny metody využívají UV nebo DAD detekci, přičemž vlnové délky se pohybují v rozsahu 227–230 nm.

Koncentrační rozsahy pokrývají spektrum od 0,005 µg/ml až po 250 µg/ml. Nejnižší dosažené limity detekce činí 0,001 µg/ml a limity kvantifikace sahají až k 0,005 µg/ml.

Použité stacionární fáze zahrnují:

- Zorbax MR54 C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [80]
- Phenomenex C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [81]
- Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4,60 mm, 3,5 µm) [82]
- Hypersil BDS C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [83]
- Phenomenex Luna C-18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [84]
- Inertsil ODS-3 (150 × 4,60 mm, 3,5 µm) [86]
- µ-Bondapak C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [87]
- Venusil RP-C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [88]

Průtok mobilní fáze byl ve všech případech 1,0 ml/min.

Mobilní fáze se skládaly z acetonitrilu, methanolu, vody nebo pufrů.

Použitá složení zahrnovala:

- Deionizovaná voda a acetonitril v gradientovém režimu (34–70 % ACN) [80]
- Voda : acetonitril : methanol (40:30:30) [81]
- Acetonitril : voda (50:50) [82]
- Acetonitril : 10mM dihydrogenfosforečnan draselný při pH 3,5 (55:45) [83]
- Voda s 0,1 % TFA: acetonitril (30:70), pH 5 upraveno kyselinou octovou [84]
- Acetonitril : methanol : voda (4:1:5) + 0,01M octan amonný, pH 5 [85]
- 50% Acetonitril ve vodě [86]
- Acetonitril : 0,01M octan sodný, pH 5 (42:58) [87]

Vinkristin

Všechny metody využívají UV nebo DAD detekci, přičemž vlnové délky se pohybují v rozsahu 220–297 nm.

Koncentrační rozsahy pokrývají spektrum od 0,015 µg/ml až 5 µg/ml. Nejnižší dosažené limity detekce činí 0,015 µg/ml a limity kvantifikace sahají až k 0,05 µg/ml.

Použité stacionární fáze zahrnují:

- Waters Spherisorb ODS C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [88]
- Dikma Diamonsil C18 (200 × 4,60 mm, 5 µm) [89]
- C18 HPLC column (250 × 4,60 mm, 5 µm) [90]
- Hibar LiChrocart RP18 (250 × 4,60 mm, 7 µm) [92]
- Waters Symmetry C18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [93]
- Chromolith Performance RP18 (100 × 4,60 mm, 5 µm) [94]
- Inertsil ODS-3 C18 (150 × 4,60 mm, 3,5 µm) [95]
- Zorbax Eclipse plus C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) [96]

Průtok mobilní fáze se pohyboval v rozmezí 0,5–1,5 ml/min.

Mobilní fáze byly složeny z acetonitrilu, methanolu, vody, kyseliny octové, kyseliny fosforečné, nebo pufrů.

Použitá složení zahrnovala:

- Acetonitril : voda s přidavkem kyseliny fosforečné, pH 3,0 (30:70), [88]
- Acetonitril : 0,02 M fosforečnan sodný, pH 4,7 [89]
- Acetonitril : 0,02M fosforečnan sodný, pH 5,4 (50:50) [91]
- Acetonitril : 0,1M kyselina fosforečná s 0,5% kyselinou mravenčí, pH 3,5 (21:79) [94]
- Methanol : acetonitril : 25mM octan amonný s 0,1% triethylaminem (15:45:40) [96]

Topotekan

Všechny metody využívají UV nebo DAD detekci, přičemž vlnové délky se pohybují v rozsahu 227–280 nm.

Koncentrační rozsahy pokrývají spektrum od 0,023 µg/ml až po 150 µg/ml. Nejnižší dosažené limity detekce činí 0,023 µg/ml a limity kvantifikace sahají až k 0,4 µg/ml.

Použité stacionární fáze zahrnují různé typy kolon:

- Phenomenex Luna C-18 (250 × 4,60 mm, 5 µm) [97]
- Purospher STAR RP-18 (150 × 4,60 mm, 3,5 µm) [98]
- YMC C18 ODS-A RP (250 × 4,60 mm, 5 µm) [99]
- Agilent Zorbax® 300SB-C8 (150 × 4,60 mm, 5 µm) [101]

Průtok mobilní fáze se pohyboval v rozmezí 0,5–1,2 ml/min.

Mobilní fáze obsahovaly acetonitril, methanol, vodu, kyselinu octovou, kyselinu fosforečnou nebo pufry.

Použitá složení zahrnovala:

- Acetonitril : voda s 0,1% TFA (70:30) [97]
- 0,5% Kyselina fosforečná : 0,5% *n*-butylamin v methanolu (60:40) [101]
- 0,1% TFA, acetonitrilu a isopropanolu s gradientem [100]

Experimentální část

Použité chemikálie a materiály

Referenční cytostatika

- doxorubicin hydrochlorid (čistota $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich)
- paklitaxel (čistota $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich)
- vinkristin sulfát (čistota $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich)
- topotekan hydrochlorid (čistota $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich)

Reagencie

- acetonitril (čistota $\geq 99,9\%$, Honeywell, Německo)
- methanol (čistota $\geq 99,9\%$, Honeywell, Německo)
- octan amonný (čistota $\geq 99,9\%$, Lachema, Česká republika)
- deionizovaná voda (vodivost $0,30 \mu\text{S}$)
- kyselina mravenčí (čistota $\geq 98,0\%$, Riedel-de Haën, Německo)

Laboratorní přístroje a detektory

- kapalinový chromatograf Agilent 1260 infinity (Agilent Technologies, Německo)
 - DAD detektor Agilent G1315D 1200 Series (Agilent Technologies, Německo)
- kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Německo)
 - hmotnostní spektrometr Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS System (Agilent Technologies, Německo) s ionizací elektrosprejem
- analytické váhy APX-100 (Denver instrument, USA)
- odsávací svařovací stůl DraftMax Ultra (Plymovent, Nizozemsko)
- termokamera Bosch Gtc 600 C (Bosch, Německo)

Chromatografické kolony

- kolona Kinetec EVO C18 (100 mm \times 3,0 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, USA)
- kolona Symmetry C18 (150 mm \times 4,60 mm, 5 μm) (Waters Corporation, USA)
- kolona SunFire C18 (150 \times 4,6 mm, 5 μm) (Waters Corporation, USA)

- kolona ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 × 100 mm, 1,7 μm) (Waters Corporation, USA)

Referenční materiály

- nerezové Petriho misky s víkem (průměr 71 mm, výška 22 mm)
- porcelánové spalovací kelímky (průměr 30 mm, výška 38 mm)
- skleněné Petriho misky s víkem (průměr 74 mm, výška 12 mm)

Laserová záření

- pulzní vláknový laser ROD 100 W (Narran, Česká republika)
- pulzní vláknový laser ROD 200 W (Narran, Česká republika)
- stolní CO₂ laserový systém Thunder Laser Nova 24 (Thunder laser, Čína)

Úvod k experimentální části

Experimentální část diplomové práce byla rozdělena do dvou hlavních oblastí reflektujících cíle práce – jednak optimalizace analytické metody pro kvantitativní stanovení zvolených cytostatik pomocí RP-HPLC, a jednak samotné ověření účinnosti laserové dekontaminace povrchů kontaminovaných těmito látkami. Bez optimalizované chromatografické metody by nebylo možné jednoznačně a reprodukovatelně vyhodnotit efektivitu dekontaminace.

Optimalizace analytické metody

Výběr rozpouštědla

Výběr vhodného rozpouštědla vycházel z požadavků na dostatečnou rozpustnost všech sledovaných analytů, kompatibilitu s RP-HPLC systémem a rychlého odpaření po aplikaci na povrch referenčního materiálu. Na základě rešeršní analýzy a experimentálního ověření se jako nejvhodnější rozpouštědlo osvědčil methanol. V porovnání s acetonitrem, ethanolem a isopropanolem vykazoval nejrychlejší odpar (20 minut při aplikaci 0,5 ml methanolu na skleněnou Petriho misku) a současně umožňoval reprodukovatelnou přípravu homogenních roztoků cytostatik. Methanol byl proto použit jak pro přípravu zásobních roztoků všech čtyř analytů, tak jako extrakční činidlo při odběru z ozářených povrchů. Zároveň sloužil jako slepý vzorek v HPLC měřeních, čímž byla ověřena nepřítomnost kontaminace systémem (carry-over efekt).

Příprava zásobních roztoků a studium stability odezvy

V rámci ověření stability cytostatik v roztoku byly provedeny testy ukazující výrazný vliv koncentrace na stabilitu signálu. U nenaředeného roztoku doxorubicinu (1 mg/ml) byla absorbance stabilní v čase, bez výraznějších změn. Po ředění v poměru 1:10 (0,1 mg/ml) se již objevovaly drobné poklesy, avšak stále v rámci očekávané variability. Naproti tomu při ředění 1:100 (0,01 mg/ml) došlo k poklesu absorbance o více než 40 % během několika sekund, což naznačuje výraznou nestabilitu v této koncentraci. Tento efekt může být způsoben sorpcí analytu na stěny odměrného skla, případně degradačními procesy v roztoku. Pozorování bylo následně potvrzeno při praktickém použití – zásobní roztoky cytostatik uchovávané v lednici po dobu několika dní vykazovaly pokles signálu až o 80 % oproti dni přípravy. Na základě těchto výsledků bylo přistoupeno k tomu, že zásobní roztoky byly vždy čerstvě připravovány přímo z pevné látky těsně před měřením a nikdy nebyly použity více než jednou.

U každého měření dekontaminace byl zásobní roztok připravován v koncentraci 0,1 mg/ml v methanolu (s výjimkou zásobního roztoku topotekanu, který byl připraven ve směsi methanol: 5mM octanový pufr o pH 4,5 v poměru 1:1), což umožňovalo efektivní práci v rámci limitů kvantifikace použité HPLC metody a zároveň minimalizovalo riziko spojené s expozicí vysokým koncentracím cytotoxických látek. Tento přístup zajišťoval jak analytickou přesnost, tak bezpečnost práce. V průběhu jednoho experimentálního dne se typicky pracovalo s objemem 10 až 20 ml zásobního roztoku, který byl v plném rozsahu spotřebován v rámci dané série měření.

Výběr vlnové délky

Výběr vhodné vlnové délky pro detekci jednotlivých cytostatik byl proveden na základě literární rešerše a následně potvrzen experimentálně pomocí DAD na HPLC systému. Spektrální skenování ukázalo, že maxima absorpance odpovídají těmto hodnotám: doxorubicin – 233 nm, paklitaxel – 227 nm, vinkristin – 225 nm a topotekan – 258 nm. Zvolené vlnové délky vykazovaly nejvyšší intenzitu signálu a tím i nejlepší poměr signál/šum pro kvantitativní analýzu.

Optimalizace HPLC metodiky

Pro každé cytostatikum byla samostatně vyvinuta a optimalizována HPLC metoda s cílem zajistit dostatečné rozlišení, stabilní retenční čas a reprodukovatelnou odezvu. Vývoj metodiky vycházel z rešeršně nalezených podmínek. Optimalizace zahrnovala výběr stacionární fáze, složení mobilní fáze, elučního režimu (gradient/isokratický) a nastavení průtoku. U každého analytu byl sledován tvar píku, reprodukovatelnost a stabilita signálu. Ve všech případech byla využita stacionární fáze typu C18. Při každém měření byla kolona temperována na 32 °C.

Doxorubicin

Optimalizace separační metody pro doxorubicin byla provedena na koloně Kinetex EVO C18 (100 × 3,0 mm, 2,6 μm, 100 Å). Jako mobilní fáze byl v první fázi zkoušen gradient složený z vody a acetonitrilu, s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí do obou složek. Gradient začínal při poměru 85:15 (H₂O:ACN) a během 10 minut klesnul obsah vody na 50 %. Při tomto nastavení však doxorubicin eluoval téměř s mrtvým časem a vykazoval tak nedostatečnou retenci, což znemožnilo kvantitativní analýzu.

Následně byla mobilní fáze upravena na pufrovaný systém s 10 mM octanem amonným jako vodnou složkou. Gradientové nastavení začínalo při 85:15 (pufr:ACN), po 5 minutách klesl podíl pufru na 50 %, následovalo 3minutová izokratická eluce a návrat na výchozí poměr během následujících 3 minut. Celková délka metody činila 14 minut, přičemž doxorubicin vykazoval retenční čas 6,2 min.

Další testování s 5 mM a 15 mM octanem amonným neprokázalo žádné signifikantní zlepšení separace ani posun v retenčním čase. Úprava pH pomocí kyseliny mravenčí nepřinesla žádné zlepšení.

Pokus o náhradu acetonitrilu methanolem vedl ke ztrátě signálu a pravděpodobné sorpci analytu na koloně, bez jeho následné eluce.

Finální podmínky tak zahrnovaly gradientovou eluci 10 mM octan amonný : acetonitril (85:15 → 50:50 v 5 min, 50:50 izokraticky do 8. min, 50:50 → 85:15 do 10. min, ekvilibrace do 12. min) průtok 0,4 ml/min a injektovaný objem 10 µl. Detekce byla provedena s využitím DAD detektoru při 233 nm. Byl dosažen stabilní signál, ostrý, symetrický pík a dobrá linearita. (viz obr. 1)

Paklitaxel

Optimalizace separace pro paklitaxel probíhala na koloně Symmetry C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm). Výchozí mobilní fáze byla složena z vody a acetonitrilu v poměru 50:50 (v/v), bez přídavku pufru. Při průtoku 0,5 ml/min docházelo k eluci hlavního píku až po 15 minutách. Zvýšením průtoku na 1,0 ml/min se retenční čas zkrátil na 7,5 min.

Pro urychlení analýzy byla postupně zvyšována koncentrace acetonitrilu: při 55 % činil retenční čas 5,0 min a při nejvyšším zkoušeném obsahu acetonitrilu – 80 % – klesl na 1,8 min. Pokusy s náhradou acetonitrilu methanolem vedly opět k absenci signálu eluovaného píku.

Na základě předchozí optimalizace u doxorubicinu byl acetonitril kombinován s vodným roztokem 10 mM octanu amonného, aby se zlepšila reprodukovatelnost retenčních časů a stabilita píku, především vzhledem k ionizačním vlastnostem paklitaxelu. Ve směsi 50:50 (pufr:acetonitril) paklitaxel eluoval při 7,4 min, při 60 % ACN ve 3,5 min; při 70 % ve 2,3 min a při 80 % eluoval paklitaxel při 1,8 min. Tato poslední varianta byla vybrána jako finální kvůli krátké době analýzy, vysoké reprodukovatelnosti a přítomnosti pufru, který stabilizuje iontové prostředí.

Změna koncentrace octanu amonného na 5 mM a 15 mM neměla vliv na eluci ani tvar píku. Finální chromatografické podmínky zahrnovaly izokratickou eluci s mobilní fází tvořenou směsí 80:20 (v/v) 10 mM octanu amonného a acetonitrilu, průtok 1,0 ml/min, injektovaný objem 10 µl. Detekce byla nastavena na 227 nm. (viz obr. 1).

Vinkristin

Optimalizace separačních podmínek pro vinkristin byla provedena bezprostředně po optimalizaci paklitaxelu, s využitím shodné kolony Symmetry C18 (5 µm, 4.6 × 150 mm), a to s předpokladem podobného chromatografického chování vzhledem k jejich fyzikálně-chemické podobnosti. Počáteční podmínky zahrnovaly izokratickou eluci směsí acetonitrilu a vody v poměru 50:50 při průtoku 0,5 ml/min. Následně byly podmínky upraveny na 80 % acetonitrilu a 1 ml/min, kdy se pík analytu objevil okolo 3. minuty.

S cílem zvýšit retenci a případně zlepšit tvar píku byla voda nahrazena 10 mM roztokem octanu amonného, čímž se retenční čas mírně zkrátil. Další modifikace mobilní fáze zahrnující

snížení koncentrace pufru na 5 mM, zvýšení na 15 mM, případně acidifikaci 0,1% kyselinou mravenčí nevedly k žádnému výraznému zlepšení chromatografického chování.

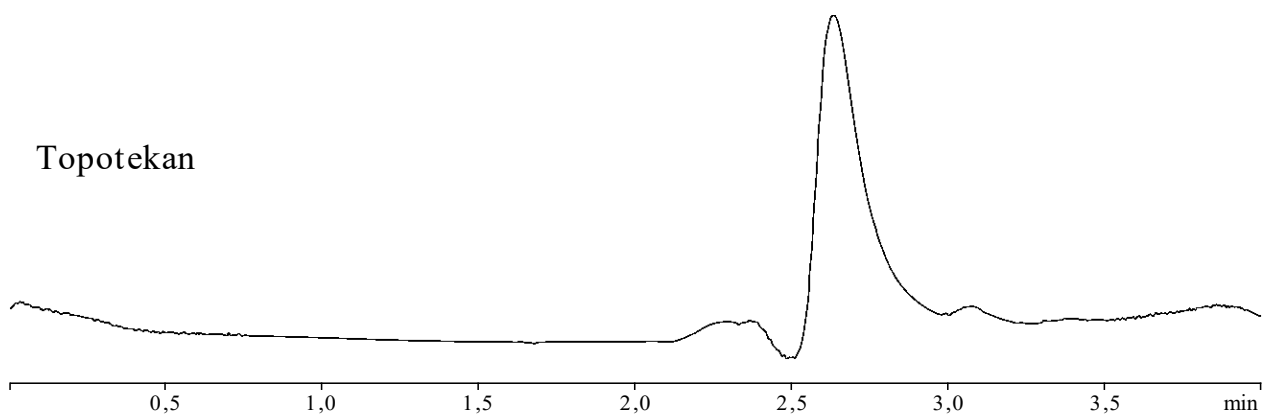
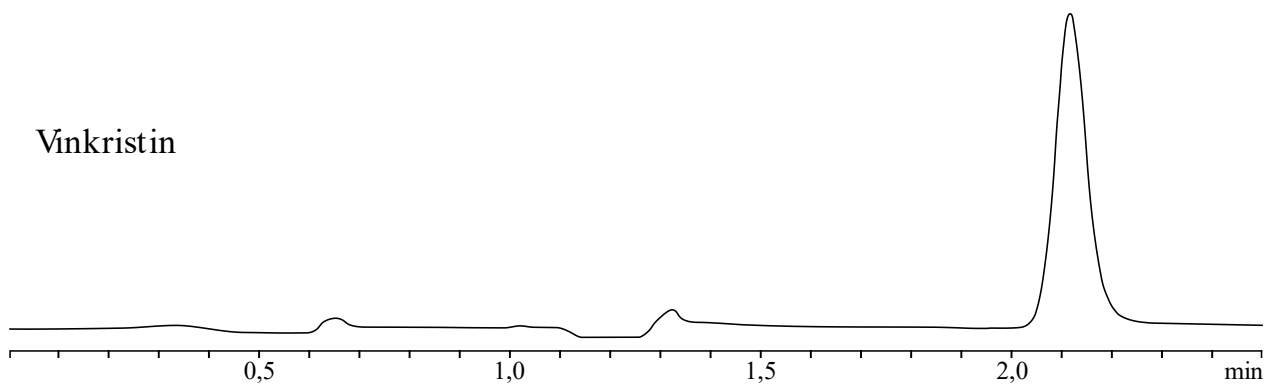
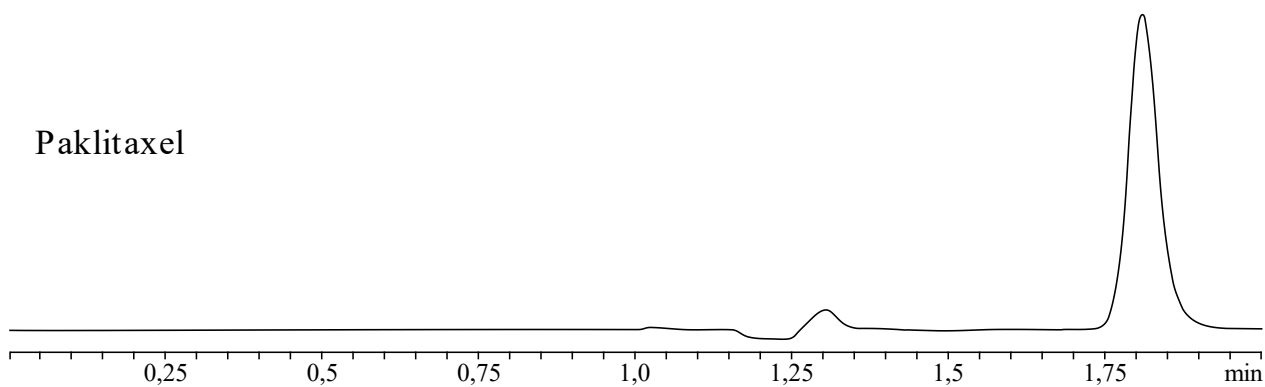
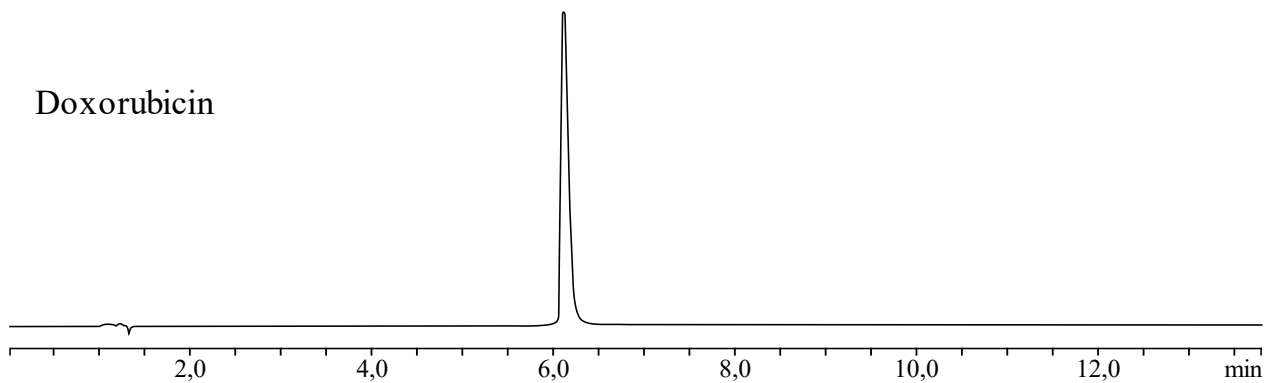
Finálně zvolená metoda zahrnovala použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a 10 mM octanu amonného v poměru 80:20 (v/v), při průtoku 1 ml/min. Detekce probíhala při vlnové délce 225 nm, objem nástřiku činil 10 μ l. Za těchto podmínek eluoval analyt ve 2,1 minutě (viz obr. 1).

Topotekan

Optimalizace separace topotekanu byla zahájena na koloně SunFire C18 (150 \times 4,6 mm, 5 μ m). Počáteční pokusy probíhaly s mobilní fází složenou z methanolu a 5 mM octanu amonného v poměru 40:60, při průtoku 0,5 ml/min. Vzhledem k tomu, že topotekan je laktonový derivát citlivý na pH, byl pufr acidifikován kyselinou mravenčí na pH 4,5 za účelem stabilizace laktonové formy. Při těchto podmínkách byly pozorovány dva signifikantní píky – jeden přibližně ve 3. minutě a druhý v oblasti 5. minuty, což může odpovídat různým formám topotekanu v roztoku (lakton a karboxylát). Během testování se však opakovaně objevovaly problémy s vysokou mírou kontaminace systému (carry-over) a výraznou nestabilitou odezvy. Analyt vykazoval známky degradace, přičemž nebylo možné spolehlivě určit, kolik aktivní formy bylo v dodaném vzorku přítomno.

Z důvodu kontaminace systému bylo přistoupeno k důkladnému proplachu kolony pomocí roztoku amoniaku, což však vedlo k nevratnému poškození stacionární fáze a kolonu se nepodařilo obnovit. Pro další vývoj metody byla použita kolona ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 \times 100 mm, 1,7 μ m), která umožňuje separace i při vysoké hodnotě pH vodné složky mobilní fáze. Vzhledem k velikosti částic (1,7 μ m) však nebylo možné pracovat na HPLC přístroji s DAD detekcí, ale bylo nutné použít UHPLC systém, umožňující DAD detekci za vysokých zpětných tlaků.

Finální mobilní fáze byla tvořena směsí methanolu a 5 mM octanu amonného (pH 4,5), v poměru 60:40 (v/v). Průtok byl nastaven na 0,1 ml/min. Topotekan byl detegován při 258 nm s elučním časem 2,6 min. (viz obr. 1).



Obrázek 1: Chromatogramy čistých cytostatik za optimalizovaných podmínek.

Určení kalibrační závislosti

V této části jsou zpracována data získaná měřeními standardních roztoků různých koncentrací za identických podmínek, jejichž výsledkem je sestavení regresního modelu popisujícího vztah mezi koncentrací a odezvou plochy.

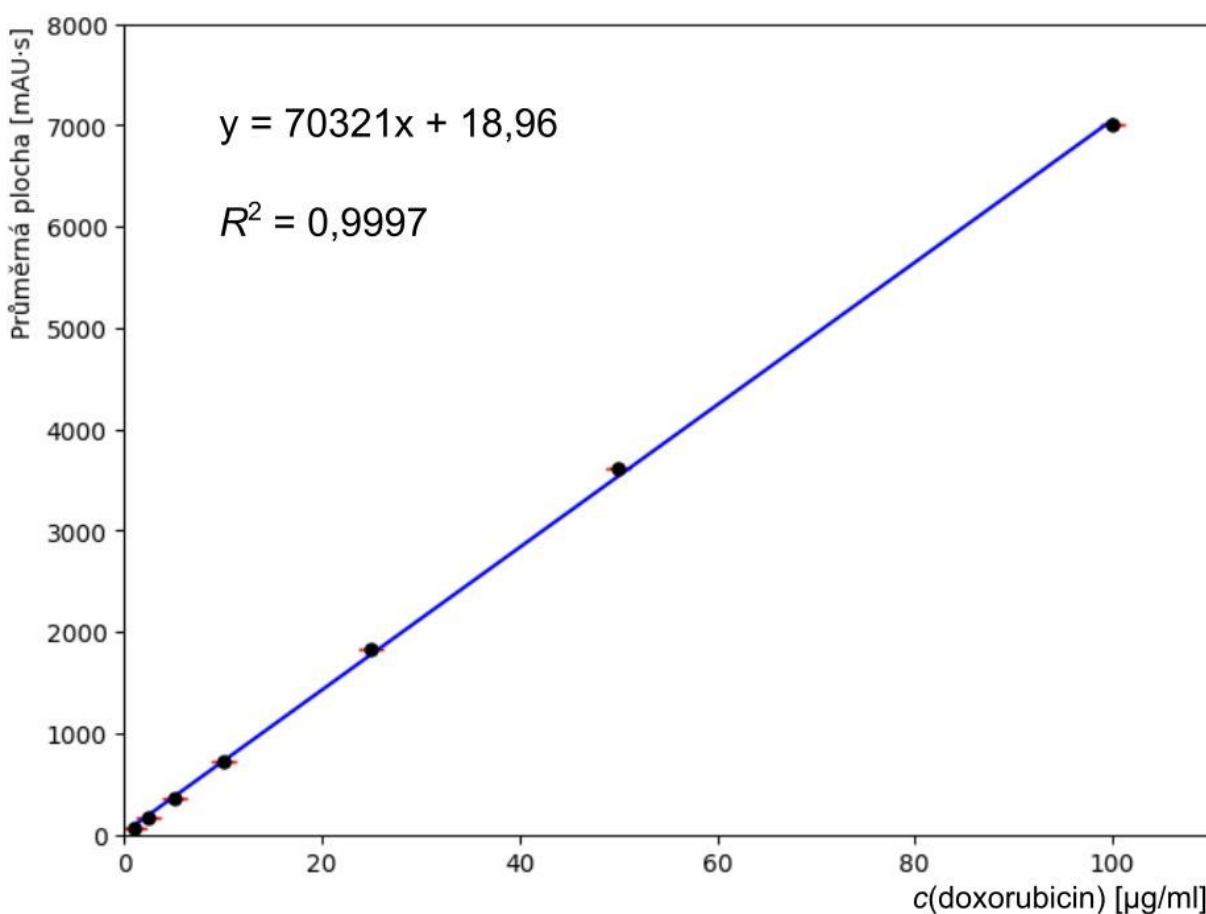
Doxorubicin

Kalibrační závislost doxorubicinu byla změřena na základě závislosti ploch chromatografických pík při 233 nm na koncentraci doxorubicinu (viz obr. 2). Pro konstrukci křivky byla použita série standardních roztoků v rozsahu koncentrací 0,1–100 µg/ml. Každý bod představuje průměr ze tří měření, doplněný o výpočet standardní odchylky.

Získaná data vykazují vysokou linearitu, přičemž regrese plošné odezvy na koncentraci odpovídá rovnici $y = 70321x + 18,96$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9997$.

- LOD = 0,01 µg/ml
- LOQ = 0,03 µg/ml

Tyto hodnoty potvrzují dostatečnou citlivost a přesnost metody v daném rozsahu.



Obrázek 2: Kalibrační závislost pro doxorubicin.

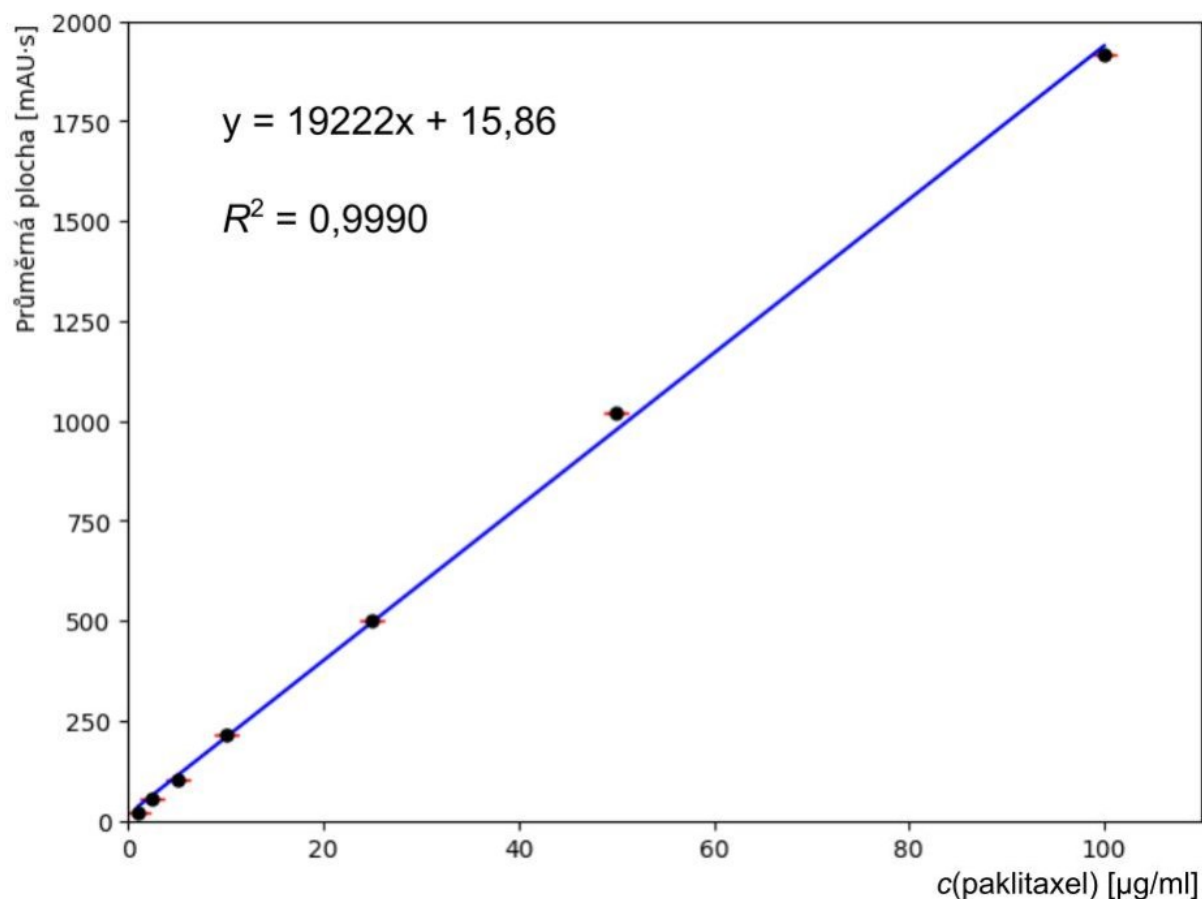
Paklitaxel

Kalibrační závislost paklitaxelu byla získána na základě měření ploch chromatografických píků při 227 nm (viz obr. 3). Pro konstrukci křivky byla použita série standardních roztoků v rozsahu koncentrací 0,1–100 µg/ml. Každý bod představuje průměr ze tří měření, doplněný o výpočet standardní odchylky.

Získaná data vykazují vysokou linearitu, přičemž regrese plošné odezvy na koncentraci odpovídá rovnici $y = 19222x + 15,86$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9990$.

- LOD = 0,08 µg/ml
- LOQ = 0,26 µg/ml

Metoda vykazuje dostatečnou citlivost a spolehlivost v celém rozsahu analyzovaných koncentrací.



Obrázek 3: Kalibrační závislost pro paklitaxel.

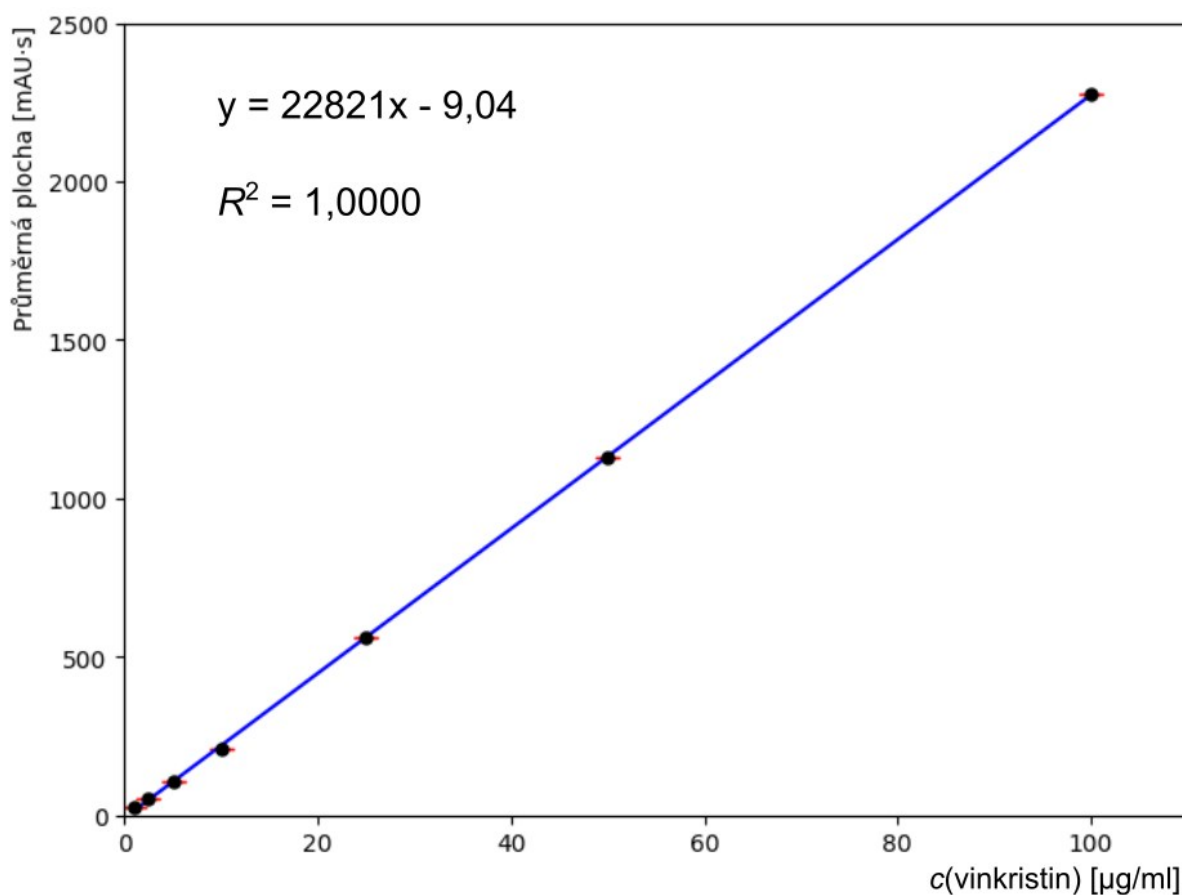
Vinkristin

Kalibrační závislost vinkristinu byla získána na základě měření ploch chromatografických píků při 225 nm (viz obr. 4). Pro konstrukci křivky byla použita série standardních roztoků v rozsahu koncentrací 0,1–100 µg/ml. Každý bod představuje průměr ze tří měření, doplněný o výpočet standardní odchylky.

Získaná data vykazují vysokou linearitu, přičemž regrese plošné odezvy na koncentraci odpovídá rovnici $y = 22821x - 9,04$ s koeficientem determinace $R^2 = 1$.

- LOD = 0,05 µg/ml
- LOQ = 0,16 µg/ml

Metoda vykazuje dostatečnou citlivost a spolehlivost v celém rozsahu analyzovaných koncentrací.



Obrázek 4: Kalibrační závislost pro vinkristin.

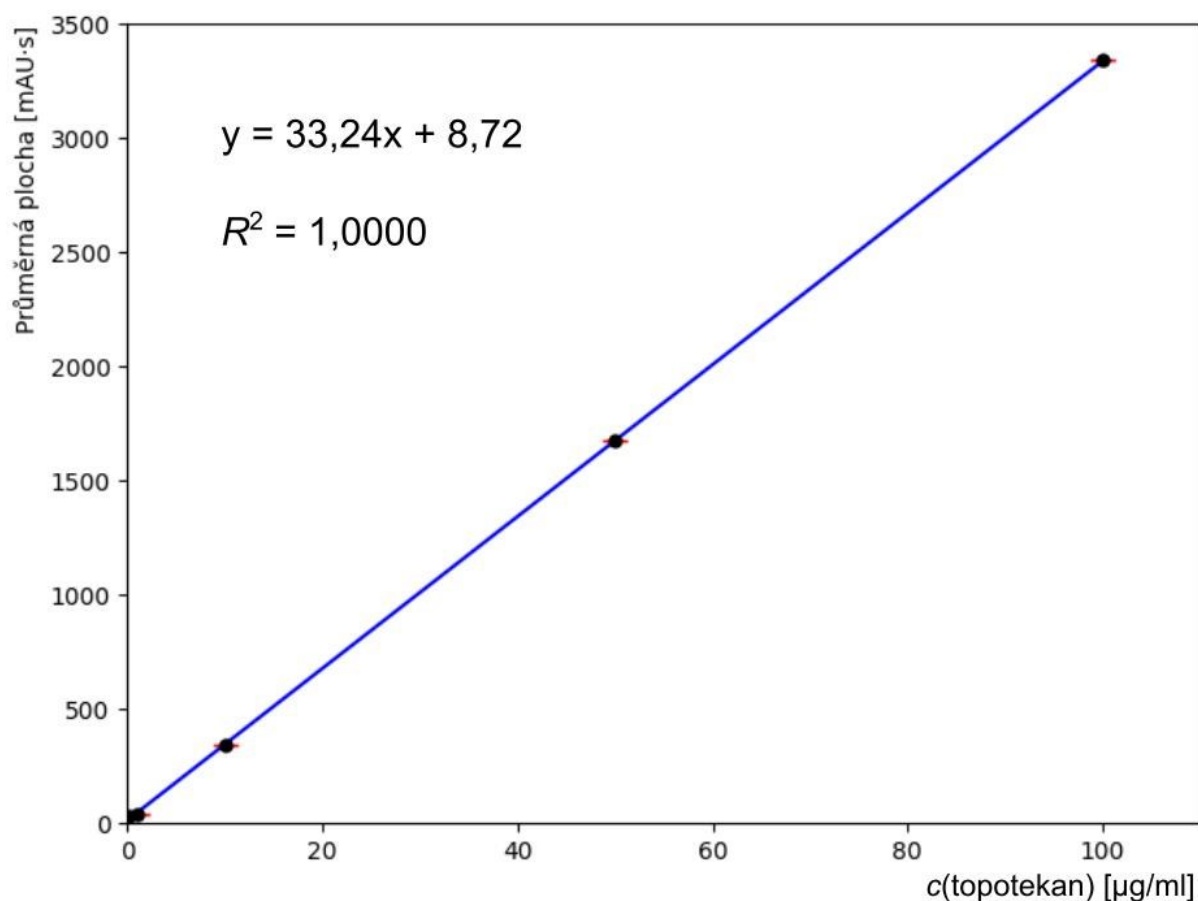
Topotekan

Kalibrační závislost vinkristinu byla získána na základě měření ploch chromatografických píků při 258 nm (viz obr. 5). Pro konstrukci křivky byla použita série standardních roztoků v rozsahu koncentrací 0,1–100 µg/ml. Každý bod představuje průměr ze tří měření, doplněný o výpočet standardní odchylky.

Získaná data vykazují vysokou linearitu, přičemž regrese plošné odezvy na koncentraci odpovídá rovnici $y = 33,24x + 8,72$ s koeficientem determinace $R^2 = 1$.

- LOD = 0,14 µg/ml
- LOQ = 0,42 µg/ml

Tyto hodnoty potvrzují dostatečnou citlivost a přesnost metody v daném rozsahu.



Obrázek 5: Kalibrační závislost pro topotekan.

Laserová dekontaminace

Příprava vzorků na laserové ozařování

Průběh ozařovacího dne zahrnoval přípravu zásobního roztoku cytostatika o koncentraci 0,1 mg/ml v methanolu. Na každý testovaný povrch bylo aplikováno 0,3 ml tohoto roztoku. To odpovídá cca 30 µg aplikovaného cytostatika na misku. Zvolený objem byl optimalizován tak, aby nedocházelo k přetečení roztoku ke stěnám misky a následnému vzlínání, které by vedlo k nerovnoměrné distribuci analytu a znemožnilo konzistentní expozici laserovému záření napříč celou plochou.

Aplikace roztoku byla provedena pipetací s řízenou distribucí – první kapka byla umístěna centrálně, následně bylo dávkování vedeno špičkou pipety po kruhové trajektorii kolem prvotní kapky, aby se vytvořila souvislá tenká vrstva udržující se povrchovým napětím v kompaktní formě. Vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě až do úplného odpaření rozpouštědla na svařovacím stole DraftMax Ultra vybaveném aktivním odsávacím systémem (obr. 6).

Po zaschnutí byly misky rozděleny do tří experimentálních skupin: neozářené kontrolní vzorky (banky), vzorky ozářené po dobu 10 sekund a vzorky ozářené po dobu 30 sekund. Ozáření probíhalo definovaným laserovým paprskem za konstantních parametrů výkonu a geometrie expozice. Po ozáření byla každá miska extrahována přidavkem 2 ml methanolu a intenzivním promýváním po dobu 30 sekund. Extrakty byly následně převedeny do HPLC vialek, ve kterých byly uchovány v temperovaném (4 °C) autosampleru a okamžitě analyzovány metodou HPLC.



Obrázek 6: Vzorky na svařovacím stole před ozářením.

V případě topotekanu byly misky vymývány 2 ml směsí methanolu a 5 mM octanového pufru o pH 4,5 v poměru 1:1, aby byl všečen vymývaný topotekan převeden na laktonovou formu. Vzorky topotekanu byly následně analyzovány metodou UHPLC.

Laserové parametry

Parametry laserového ozáření nebyly nastavovány autorem práce, nýbrž byly zvoleny ve spolupráci s odborníky z oboru laserových technologií. Konkrétní nastavení provedl specialista ze společnosti Narran ve spolupráci s konzultantem práce, jenž disponuje expertizou v oblasti aplikací pulzních laserů. Byl využit vláknový pulzní laser ve dvou výkonových režimech (100 W a 200 W), přičemž oba režimy byly optimalizovány tak, aby pokrývaly rozdílné fluence a dynamiku interakce záření s povrchem.

Režim 100 W byl charakterizován vysokou frekvencí pulzů (200 kHz), rozměrovou expanzí stopy na 225 % a výraznějším rozostřením, což vedlo ke vzniku homogenní stopy s vysokou hustotou impulzů a nižší okamžitou fluencí.

Naproti tomu režim 200 W využíval nízkou frekvenci (20 a 30 kHz), větší stopu (250 %) a nižší míru defokusu, což umožnilo vyšší lokální fluenci a potenciálně intenzivnější ablační efekt. Rychlost skenování činila v obou případech 5000 mm/s, což minimalizovalo akumulaci tepelné zátěže a podpořilo by tak čistě fyzikální dekontaminační mechanismus.

Manipulace s laserem

Manipulace s laserovým systémem byla zajištěna konzultantem práce, který během celého procesu ozáření manuálně fixoval hlavu laseru ve stabilní poloze (obr. 7). Před samotným ozářením byl proveden fokus laserového paprsku na referenční ploše umístěné vedle vzorku, čímž bylo dosaženo konzistence záření po celou dobu ozařování.

Ozařování probíhalo na svařovacím stole DraftMax Ultra vybaveném aktivním odsávacím systémem, který minimalizoval riziko inhalace aerosolizovaných částic cytostatik uvolněných z povrchu misek. Všichni přítomní používali osobní ochranné prostředky, konkrétně ochranné brýle na laser a filtrační respirátory.

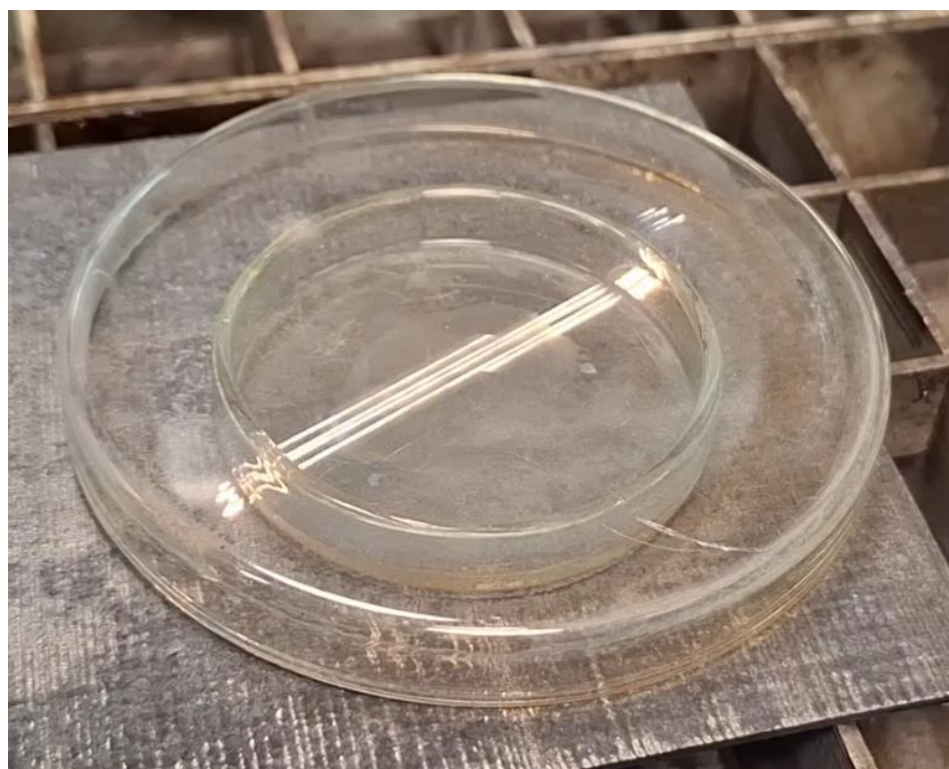
Díky vizuální kontrole dopadající stopy paprsku na povrchu bylo možné přesně určovat trajektorii ozáření a udržovat homogenní pokrytí vzorku (obr. 8). I přes absenci robotického manipulátoru, jenž by umožnil přesně definovanou a reprodukovatelnou trajektorii pohybu, byla manuální manipulace zajištěna s dostatečnou precizností. Automatizovaný systém nebyl během realizace experimentů k dispozici z důvodu technické závady. Tento systém by bez pochyb zvýšil

reprodukovatelnost jednotlivých pokusů, nicméně manuální aplikace se více blíží potenciální dekontaminaci povrchů v praxi.

Během ozáření byla povrchová teplota Petriho misek a porcelánových kelímků kontinuálně monitorována pomocí termokamery Bosch GTC 600 C.



Obrázek 7: Schéma správného držení hlavy laseru během ozařování.



Obrázek 8: Laserový svazek dopadající na skleněnou Petriho misku.

CO₂ laser

V závěrečné fázi experimentů byl doplňkově testován CO₂ laserový systém Thunder Laser Nova 24 (obr. 9), generující záření o vlnové délce 10,6 μm s výkonem 130 W. Tento stolní gravírovací laser je určen primárně pro práci s polymerními a přírodními materiály. Pracuje v kontinuálním nebo pulzním režimu řízeného skenování, s typickým fokusovaným bodem ve stovkách mikrometrů.

Vzorky (sklo, porcelán, kov) byly vkládány přímo do vnitřního prostoru zařízení na pracovní plochu. Fokuse probíhala automaticky, uživatelská obsluha spočívala pouze ve vložení vzorků a aktivaci laseru přes ovládací panel. Během experimentu byly na displeji zařízení nastaveny následující parametry: rychlost skenování 280 mm/s a výkon 80 % (takže 100 W).

Při testech nedošlo ani po opakovaných expozicích k detegovatelné fotodegradaci analyzovaných cytostatik. Naopak, při ozařování skleněných misek delším než 4 sekundy docházelo k jejich destrukci v důsledku nadměrného tepelného stresu. Z těchto důvodů byl CO₂ laser shledán jako nevhodný pro účely bezkontaktní dekontaminace v rámci této práce a nebyl dále využíván.



Obrázek 9: Nerezové Petriho misky uvnitř CO₂ Thunder laseru.

Zpracování dat a výpočty

Zbytkové množství analytu bylo určeno integrací ploch pod příslušnými píky v HPLC chromatogramech. Absolutní kvantifikace nebyla nezbytná, neboť analýzy byly prováděny relativně vůči neozářeným kontrolám (blankům), které představovaly 100 % výchozího množství. Tento přístup je metodicky validní za předpokladu, že blanky byly měřeny za identických podmínek jako ozářené vzorky a že odezva detektoru zůstává lineární v rozsahu naměřených hodnot. Výsledky tak byly vyjádřeny jako procento zbytkového množství vzhledem k průměrné hodnotě blanků.

Statistické zpracování dat vycházelo z experimentálního uspořádání, ve kterém bylo pro každý typ testovaného povrchu (kov, sklo, porcelán) připraveno devět vzorků – tři neozářené (blanky), tři ozářené po dobu 10 sekund a tři ozářené po dobu 30 sekund. Po extrakci byl každý vzorek převeden do vialek a analyzován metodou HPLC/UHPLC.

Každá vialka byla měřena třikrát, přičemž měření byla proložena dávkováním methanolu (methanol – vzorek – methanol – vzorek...), aby se eliminoval případný carry-over a zvýšila spolehlivost odezvy. Tímto způsobem bylo pro každý experimentální stav získáno devět hodnot, na jejichž základě byla provedena statistická analýza.

Výpočet standardní odchylky probíhal ve dvou úrovních. Nejprve byla pro každou jednotlivou miskou vypočítána standardní odchylka z triplikátu měření extraktu z povrchu. Následně byla vypočítána relativní směrodatná odchylka pro stanovení, zahrnující všechny tři misky rámci stejného experimentálního nastavení (takže z 9 hodnot). Standardní odchylka triplikátu sloužila ke kontrole správného a reprodukovatelného ozařování, relativní směrodatná odchylka byla započítána k samotné výsledné účinnosti dekontaminace.

Výsledky

Během diplomové práce došlo k neplánovanému omezení experimentálních možností v důsledku omezené dostupnosti prvně použitého laserového systému ROD o výkonu 200 W. Tento konkrétní model obsahoval laserový filament, který již není součástí nově dostupných ROD 200 W zařízení, což znemožnilo jeho náhradu za jiný kompatibilní systém, aniž by došlo k narušení kontinuity experimentálních podmínek. Vzhledem k tomu byl vinkristin měřen pouze na 100 W laseru.

Tato nejednotnost v experimentálních podmínkách však není pro účely této práce zásadní, protože hlavním cílem bylo porovnat účinnost laserové ablace a dekontaminace, nikoliv provádět detailní kvantitativní analýzu výkonu laseru specificky pro každý analyt.

Výsledky všech měření byly kvantifikovány relativně vůči blankům, což minimalizovalo vliv rozdílů v nastavení výkonu na konečné závěry o účinnosti dekontaminace. Priorita tak byla zachována na porovnání účinnosti laserové dekontaminace.

Statistické zpracování výsledků – ukázková studie paklitaxelu na nerezové misce

Jak již bylo uvedeno v experimentální části, pro každé experimentální nastavení byly připraveny tři samostatné misky, přičemž každá z nich byla měřena třikrát. V této podkapitole je uvedena ilustrační ukáзка výpočtu na základě studie paklitaxelu na nerezových Petriho miskách při použití 100W laseru. Experiment zahrnoval tři blankové, tedy neozářené misky (souhrnně označené jako miska 1), tři misky ozářené po dobu 10 sekund (souhrnně označené jako miska 2) a tři misky ozářené po dobu 30 sekund (souhrnně označené jako miska 3). Celkem tedy bylo analyzováno 9 individuálních misek, což odpovídá 27 hodnotám získaným pomocí HPLC/UHPLC analýzy. V tabulce 1 je výčet všech měření u blankových misek (triplikáty):

Tabulka 1: Plochy píků naměřené pro tři blankové misky.

Miska	Plocha píku [mAU·s]
1a	461,120
1a	461,997
1a	466,749
1b	455,976
1b	458,874
1b	458,075
1c	436,362
1c	432,715
1c	430,748

Pro každou jednotlivou misku byl nejprve spočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka (SD) ze tří měření, čímž vznikly tři průměrné hodnoty reprezentující jednotlivé misky v dané skupině. Blankové vzorky sloužily k určení výchozí hodnoty odpovídající 0 % dekontaminace – 100 % signálu (viz tabulka 2):

Tabulka 2: Průměrné plochy píků blankových misek u měření v triplikátech.

Miska	Průměrná plocha píku [mAU·s]	SD [mAU·s]
1a	463,28	4,60
1b	457,64	0,45
1c	433,27	3,83

Z těchto tří průměrů byl vypočten celkový průměr 451,40. Relativní směrodatná odchylka všech devíti blankových měření z tabulky 1 činí 4,1 %.

Následovala měření vzorků ozářených 10 sekund (viz tabulka 3):

Tabulka 3: Průměrné plochy píků misek ozářených 10 sekund u měření v triplikátech.

Miska	Průměrná plocha píku [mAU·s]	SD [mAU·s]
2a	111,88	1,90
2b	140,38	2,02
2c	151,35	1,11

Z těchto tří průměrů byl vypočten celkový průměr 134,54. Relativní směrodatná odchylka všech devíti měření triplikátů činí 15,0 %.

Účinnost dekontaminace byla zjištěna dosazením do:

$$\text{Účinnost [\%]} = (1 - 134,54 / 451,40) \times 100 = 70,19 \%$$

Celková nejistota byla zjištěna kvadratickým součtem RSD z 10s měření a blanku:

$$\text{Celková relativní směrodatná odchylka [\%]} = \text{sqrt}((15,0\%)^2 + (4,1\%)^2) = 15,6 \%$$

Relativní účinnost dekontaminace při ozařování po dobu 10 sekund činí 70,2 % a celková relativní nejistota byla stanovena na 15,6 %.

Pro přehlednější interpretaci výsledků byla relativní nejistota převedena na absolutní směrodatnou odchylku, což umožňuje vyjádřit účinnost ve formátu 70,2 % ± 11,0 %. Tento způsob

zápisu je vhodnější pro prezentaci výsledků v kontextu reálné účinnosti, neboť poskytuje konkrétní rozsah hodnot, ve kterém se očekávaná účinnost dekontaminace s vysokou pravděpodobností nachází. Stejným způsobem byly počítány vzorky ozářené 30 sekund (viz tabulka 4):

Tabulka 4: Průměrné plochy píků misek ozářených 30 sekund u měření v triplikátech.

Miska	Průměrná plocha píku [mAU·s]	SD [mAU·s]
3a	111,88	0,53
3b	194,31	0,13
3c	143,03	0,33

Z těchto tří průměrů byl vypočten celkový průměr 162,10. Relativní směrodatná odchylka všech devíti měření činí 13,9 %.

Účinnost dekontaminace byla zjištěna dosazením do:

$$\text{Účinnost [\%]} = (1 - 162,10 / 451,40) \times 100 = 64,1 \%$$

Celková nejistota byla zjištěna kvadratickým součtem RSD z 30s měření a blanku:

$$\text{Celková relativní směrodatná odchylka [\%]} = \text{sqrt}((13,9\%)^2 + (4,1\%)^2) = 14,5 \%$$

Relativní účinnost dekontaminace při ozařování po dobu 30 sekund činí 64,1 % a celková relativní nejistota byla stanovena na 14,5 %. Absolutní směrodatná odchylka činí 64,1 % ± 9,3 %.

Tímto způsobem se získá tabulka 5, na které lze srovnat účinnosti dekontaminace při ozařování 10 a 30 sekund:

Tabulka 5: Srovnání účinnosti 100 W laserové dekontaminace paklitaxelu na nerezových miskách.

Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
10	70,2 % ± 11,0 %
30	64,1 % ± 9,3 %

Tímto postupem byla kvantifikována účinnost laserové dekontaminace pro každé experimentální nastavení každého analytu v této práci.

Dekontaminace paklitaxelu

Paklitaxel, díky své rychlé a spolehlivé analýze pomocí HPLC, byl preferovaným analytem pro optimalizaci a testování. Byl jediným cytostatikem, které bylo testováno na všech třech typech laserů: vláknovém laseru o výkonu 100 W, vláknovém laseru o výkonu 200 W a CO₂ laseru. Některé pokusy byly provedeny opakovaně za účelem ověření reprodukovatelnosti.

Nerezové Petriho misky

Nejvyšší účinnosti dekontaminace bylo dosaženo na nerezových Petriho miskách – trend, který byl konzistentní napříč všemi testovanými analyty. V několika případech byla pozorována i 100% účinnost odstranění paklitaxelu. Všechna měření pro nerezové misky jsou shrnuta v tabulce 6. Na vláknovém laseru o výkonu 100 W byla měření provedena třikrát za identických podmínek, na laseru 200 W pak dvakrát. Časové rozestupy mezi těmito měřeními byly v řádu měsíců. Testovala se různá nastavení délky pulzu (30 a 240 ns u 200W laseru) a různé doby expozice (10 a 30 sekund).

Tabulka 6: Celkové výsledky získané při dekontaminaci paklitaxelu na nerezových miskách.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	98,6 % ± 0,3 %
100 W	100	10	91,4 % ± 1,2 %
100 W	100	10	74,7 % ± 1,5 %
100 W	100	30	100,0 % ± 0,0 %
100 W	100	30	80,2 % ± 3,5 %
100 W	100	30	83,2 % ± 2,1 %
200 W	30	10	82,9 % ± 1,8 %
200 W	30	10	96,1 % ± 1,8 %
200 W	30	30	80,5 % ± 1,6 %
200 W	30	30	80,1 % ± 2,3 %
200 W	240	10	59,1 % ± 3,2 %
200 W	240	10	89,9 % ± 1,1 %
200 W	240	30	79,7 % ± 2,1 %
200 W	240	30	96,6 % ± 0,7 %

Ačkoliv účinnosti dekontaminace byly ve většině případů vysoké, i mezi identickými experimenty se objevily odchylky mimo rámec standardní variability. Tyto rozdíly mohou být způsobeny dvěma faktory: jednak skutečností, že ozařování laserem bylo prováděno manuálně, nikoli pomocí robotické manipulace – tedy se zapojením lidského faktoru; a jednak možnou variabilitou v extrakci misky methanolem po ozáření. Tato mírná variabilita mezi měřeními se navíc vyskytovala i u ostatních analyzovaných cytostatik.

Navzdory tomu lze pozorované výsledky na nerezových miskách jednoznačně hodnotit jako úspěšné – účinnost dekontaminace byla opakovaně vysoká.

Všechna měření uvedená v tabulce 6 byla prováděna za laboratorního odtahu, přičemž mezi povrchem nerezové misky a hlavou laseru se nacházel pouze vzduch. Nebyl přítomen žádný materiál (např. sklo nebo filtr), který by mohl ovlivnit průchod laserového paprsku. Během ozáření bylo pozorováno, že dochází k postupnému odlupování vrstvy cytostatika z povrchu misky, a jeho fragmenty byly vlivem tepelného efektu a proudění vzduchu odstraněny z povrchu a odsáty pryč odtahem stolu.

Pro ověření byl proveden doplňkový experiment, při kterém byla nerezová miska uzavřena skleněnou miskou. Po ozáření stejným způsobem jako v předchozích pokusech s 100W vláknovým laserem byla účinnost dekontaminace téměř nulová (viz tabulka 7). Tento výsledek podporuje hypotézu, že dominantním – a pravděpodobně jediným – mechanismem dekontaminace nerezových misek je tepelně indukovaná desorpce cytostatika z kovového povrchu.

Tabulka 7: Výsledky získané pro dekontaminaci paklitaxelu na nerezové misce uzavřené skleněnou miskou.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	4,2 % ± 3,1 %
100 W	100	30	5,8 % ± 4,5 %

Po ozáření v uzavřené konfiguraci dvou misek bylo možné pozorovat vířící bílý aerosol vytvářející vortexy. Tyto proudy byly pravděpodobně výsledkem lokálního ohřevu cytostatika a okolního vzduchu laserovým paprskem, což způsobilo vznik konvekčních proudů. Aerosol zřejmě vznikl odpařením nebo rozptýlením částic z povrchu cytostatika, které se následně vířily vlivem teplotního gradientu mezi miskou a okolním vzduchem. Tento jev dále podporuje hypotézu o dominantní roli tepelné desorpce jako hlavního mechanismu dekontaminace.

Poslední experiment s paklitaxelem byl zaměřen na ověření, zda během laserového ozařování může docházet i k jiným interakčním mechanismům než pouze k tepelnému uvolňování. Do nerezové misky s naneseným filmem cytostatika byl po zaschnutí vložen speciální IR-transparentní filtr – sklo s antireflexní vrstvou, které se používá do optického aparátu čistících laserů a které propouští záření o vlnové délce 1064 nm, odpovídající použitému pulznímu laseru. Filtr pokryl celý povrch kontaminované oblasti.

Po ozáření (identický protokol jako u běžných experimentů s 100W vláknovým laserem) byly extrahovány obě části – miska i filtr – methanolem. HPLC analýza extraktů neodhalila přítomnost žádných dalších UV-aktivních složek ani fragmentů, a pík cytostatika byl chromatograficky totožný s referenčním standardem. Mírný pokles účinnosti dekontaminace (viz tabulka 8) lze přičíst snížené efektivitě extrakce cytostatika ze struktury filtru, kdy bylo nutné extrahovat dvě různé matrice současně.

Tabulka 8: Výsledky získané pro dekontaminaci paklitaxelu na nerezové misce pod IR-transparentním filtrem

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	70,2 % ± 11,0 %
100 W	100	30	64,1 % ± 9,3 %

Skleněné Petriho misky

U skleněných misek byla situace v porovnání s nerezovými zcela opačná – k žádné relevantní dekontaminaci nedocházelo. Ve většině případů nebylo statisticky prokazatelné, že by laserové ozařování mělo na paklitaxel jakýkoliv efekt (viz tabulka 9). Často byla navíc pozorována vysoká standardní odchylka, která v některých případech vedla až k negativním hodnotám účinnosti dekontaminace. Tyto hodnoty jsou fyzikálně nesmyslné a indikují problém s extrakcí cytostatika ze skla methanolem, nikoliv skutečnou interakci laseru.

Tabulka 9: Výsledky měření dekontaminace paklitaxelu na skleněných miskách

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
200 W	30	10	0 %
200 W	30	30	0 %
200 W	240	10	8,9 % ± 2,5 %
200 W	240	30	0 %
100 W	100	10	0 %
100 W	100	30	0 %

Pro ověření této hypotézy byla zopakována konfigurace s přiklopenou skleněnou miskou nad kontaminovaný povrch. Ani v tomto uspořádání však nedošlo k žádné měřitelné dekontaminaci (tabulka 10).

Tabulka 10: Výsledky měření dekontaminace paklitaxelu na skleněné misce uzavřené skleněnou miskou.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	0 %
100 W	100	30	0 %

Porcelánové kelímky

Podobně jako u skla, i u porcelánu byla většinou pozorována statisticky nevýznamná nebo velmi nízká účinnost dekontaminace (tabulka 11). Na rozdíl od skla však bylo možné alespoň naměřit určité zbytky signálu, přestože účinnost byla minimální a doprovázená výraznou variabilitou. Není však možné jednoznačně určit, zda skutečně docházelo k reálné dekontaminaci, nebo zda se jedná pouze o artefakt vzniklý kombinací lidského faktoru, variability v extrakci, a morfologie samotného povrchu. Užší hrdla porcelánových kelímků spolu s jejich drsnějším povrchem mohly přispět ke zvýšené sorpci cytostatika a komplikovanější extrakci.

Tabulka 11: Výsledky získané měřením dekontaminace paklitaxelu na porcelánových kelímcích.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
200 W	30	10	2,5 % ± 2,3 %
200 W	30	10	0 %
200 W	30	30	8,3 % ± 2,1 %
200 W	30	30	27,5 % ± 2,1 %
200 W	240	10	0 %
200 W	240	30	14,3 % ± 3,1 %
100 W	100	10	0 %
100 W	100	30	5,2 % ± 3,8 %

Pro ověření vlivu propustnosti byla opět provedena kontrola, při které bylo ozařování provedeno přes skleněnou překážku. Úbytek byl v tomto případě nulový (tabulka 12).

Tabulka 12: Výsledky měření u porcelánových kelímků uzavřených skleněnou miskou.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	0 %
100 W	100	30	0 %

CO₂ laser

Paklitaxel byl jediným analytem, u něhož byl otestován i kontinuální CO₂ laser (Thunder Laser 24). Cílem experimentu bylo ověřit, zda během ozáření nevznikají detegovatelné produkty fotodegradace a zda by tento typ laseru mohl být potenciálně využit pro dekontaminaci cytostatik, přestože jeho mechanismus účinku se zásadně liší od pulzních laserů (pracuje na principu kontinuálního přenosu tepla, nikoli intenzivních krátkých pulzů). Experiment neprokázal žádnou účinnost ani ve smyslu chemické degradace, ani fyzikální dekontaminace. Naopak, došlo k prasknutí skleněné Petriho misky, pravděpodobně v důsledku nerovnoměrné distribuce tepla. Proto v jejím případě byla snížena doba ozařování z 10 na 3 s. V methanolickém extraktu nebyly pozorovány žádné chromatograficky odlišné produkty, které by svědčily o fragmentaci nebo přeměně paklitaxelu.

Tabulka 13: Výsledky dekontaminace paklitaxelu CO₂ laserem na různých površích.

Povrch	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
Nerezová miska	-*	10	0 %
Skleněná miska	-*	3	0 %
Porcelánový kelímek	-*	10	0 %

*jedná se kontinuální laser.

Z těchto výsledků plyne, že u paklitaxelu nebyly během veškerého laserového ozařování pozorovány žádné produkty fotodegradace. Všechny pozorované účinné dekontaminace lze vysvětlit tepelnou desorpcí cytostatika z povrchu, při které dochází k postupnému odlepení tenkého filmu vlivem lokálního ohřevu a jeho transportu prouděním vzduchu mimo kontaminovanou oblast.

Dekontaminace doxorubicinu

Doxorubicin byl testován s použitím 100W a 200W pulzního laseru.

Nerezové Petriho misky

U nerezových Petriho misek byly opět pozorovány vysoké účinnosti dekontaminace, v některých případech dosahující téměř úplného odstranění cytostatika. Výsledky však vykazovaly známou variabilitu vlivem ručního vedení laserové hlavy a variabilní extrakce methanolem, což je trend opakující se napříč analyty (viz tabulka 14).

Tabulka 14: Výsledky měření dekontaminace doxorubicinu na nerezových miskách.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
200 W	30	10	98,4 % ± 0,8 %
200 W	30	30	87,2 % ± 12,1 %
200 W	240	10	93,5 % ± 3,2 %
200 W	240	30	96,1 % ± 2,9 %
100 W	100	10	89,3 % ± 15,7 %
100 W	100	10	85,4 % ± 1,2 %
100 W	100	30	98,9 % ± 0,6 %
100 W	100	30	94,3 % ± 0,8 %

Vzhledem k intenzivní červenooranžové barvě doxorubicinu bylo možné vizuálně sledovat chování tenkého filmu cytostatika během laserového ozařování. Při aplikaci vyššího objemu zásobního roztoku (1 ml) docházelo na nerezovém povrchu k tvorbě drobných zrněk nebo aglomerátů pevné fáze, které se při ozařování začaly pohybovat a odskakovat z povrchu misky. Tento jev lze připsat prudké lokální desorpci nebo mikroexplozím vlivem rychlého ohřevu a expanze zbytkového rozpouštědla, uzavřeného v pórech nebo pod filmem cytostatika. Část těchto zrněk opustila misku prouděním vzduchu, část zůstala na povrchu a byla následně extrahována do vialek.

Po snížení aplikovaného objemu roztoku na 0,3 ml tento jev již nebyl opticky pozorovatelný, což může mít dva důvody: jednak menší množství analytu nemuselo vést k tvorbě dostatečně velkých pevných aglomerátů, jednak k tvorbě obdobných částic i u jiných cytostatik s nízkou barevností (např. paklitaxel, vinkristin) mohlo také docházet, ale jejich vizuální detekce nebyla možná kvůli bezbarvé

povaze těchto látek. Vznik zrněk je tedy pravděpodobně obecnějším jevem souvisejícím s rychlou termální desorpcí a fázovou transformací analytu, ale díky přirozenému zbarvení byl pozorovatelný pouze u doxorubicinu.

Skleněné Petriho misky

Na skleněném povrchu nebyla u doxorubicinu pozorována žádná účinná dekontaminace (tabulka 15). Hodnoty se pohybovaly v rámci statistické chyby a nelze je považovat za relevantní.

Tabulka 15: Výsledky měření dekontaminace doxorubicinu na skleněných miskách.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	0 %
100 W	100	30	0 %

Porcelánové kelímky

Dekontaminace porcelánového povrchu byla nevýznamná. Statisticky se účinnost pohybovala blízko nuly a nevykazovala žádný konzistentní trend.

Tabulka 16: Výsledky měření dekontaminace doxorubicinu na porcelánových kelímcích.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	12,4 % ± 3,1 %
100 W	100	30	0 %

Dekontaminace vinkristinu

Vinkristin byl studován pouze s použitím 100W pulzního laseru o délce pulzu 100 ns. Jedinou měněnou proměnnou byla délka ozáření. I přes omezenější parametrový prostor se však jeho chování nelišilo od paklitaxelu nebo doxorubicinu.

Na nerezových Petriho miskách byla pozorována vyšší účinnost dekontaminace, pohybující se v rozmezí 80–85 % (viz tabulka 17). Opět zde mohly hrát roli faktory ručního držení laseru a variabilita extrakce, nicméně celkové trendy potvrzují, že kovový povrch jako jediný umožňuje efektivní odstranění cytostatika.

Tabulka 17: Výsledky měření dekontaminace vinkristinu na nerezových miskách.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	80,2 % ± 2,1 %
100 W	100	30	86,4 % ± 1,8 %

Na skle byly sice měřené hodnoty nenulové, avšak vzhledem k velké variabilitě a vysoké standardní odchylce jsou statisticky bezvýznamné (tabulka 18).

Tabulka 18: Výsledky měření dekontaminace vinkristinu na skleněných miskách.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	6,5 % ± 3,1 %
100 W	100	30	4,2 % ± 2,8 %

Podobně i výsledky měření na porcelánu vykazují nízkou účinnost a statistickou nevýznamnost (tabulka 19), což opět potvrzuje trend pozorovaný u ostatních analytů.

Tabulka 19: Výsledky měření dekontaminace vinkristinu na porcelánových kelímcích.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
100 W	100	10	14,3 % ± 12,7 %
100 W	100	30	0 %

Dekontaminace topotekanu

Topotekan byl studován při použití 200W a 100W pulzního laseru. Na rozdíl od ostatních analytů byl testován pouze na nerezových površích, což bylo dáno jeho problémovou a perzistentní povahou jak při přípravě vzorků, tak při chromatografických analýzách (včetně efektu carry over a nutnosti pročištění roztokem amoniaku). Přesto byla provedena měření, která ukázala, že dekontaminace dosahovala podprůměrných hodnot s vysokou standardní odchylkou (tabulka 20). Topotekan dosahoval celkově nejhorších výsledků ze všech studovaných analytů a zároveň představoval nejobtížněji zpracovatelný analyt.

Tabulka 20: Výsledky měření dekontaminace topotekanu na nerezových miskách.

Typ laseru	Délka pulsu [ns]	Doba ozařování [s]	Účinnost dekontaminace
200 W	30	10	32,5 % ± 18,2 %
200 W	30	30	55,8 % ± 12,7 %
200 W	240	10	42,4 % ± 15,9 %
200 W	240	30	28,1 % ± 22,4 %
100 W	100	10	63,9 % ± 9,8 %
100 W	100	30	72,9 % ± 6,3 %

Teplotní záznam během měření

Pomocí termokamery Bosch GTC 600 C byly sledovány teplotní změny jednotlivých materiálů během expozice pulzními a CO₂ lasery. Měření ukázala výrazné rozdíly v teplotních profilech a tepelném chování kovových a nekovových materiálů, které souvisejí s rozdíly v absorpci a tepelné vodivosti.

Při ozáření pulzními lasery nerezová ocel dosahovala maximálních teplot kolem 47,2 °C. Již po 10 sekundách expozice byla teplota přibližně 30 °C a po 30 sekundách stoupala k 45 °C. Nebyly pozorovány žádné makroskopické změny vzhledu ani deformace povrchu.

Porcelán vykazoval výrazně vyšší teploty. Po 10 sekundách expozice překračoval 120 °C a po 15 sekundách byl mimo měřicí rozsah termokamery (177,8 °C). Rychlá akumulace tepla bez jeho účinného odvodu ukazuje na vysokou tepelnou absorpci. Přes vysoké lokální přehřátí nebyly vizuálně pozorovány žádné změny.

U skla byla po 10 sekundách expozice zjištěna teplota kolem 25 °C a po 30 sekundách více než 60 °C. I při těchto teplotách nedocházelo k vizuálním změnám povrchu.

Při použití CO₂ laseru keramika po 10 sekundách dosahovala teplot až 136,8 °C. I přes vysoké teploty nebyla pozorována destrukce ani změny vzhledu.

Nerezová ocel se při CO₂ laseru zahřívala na 56,1 °C, opět bez známek poškození. Vyšší teploty v porovnání s pulzními lasery odpovídají vyšší absorpci záření na vlnové délce CO₂ laseru. U skleněných misek nebylo možné teplotu spolehlivě změřit, protože expozice delší než 3 sekundy vedla k jejich prasknutí. Termokamera nestačila provést měření dříve, než došlo k destrukci materiálu. Nebyly však pozorovány žádné vizuální změny na povrchu před prasknutím.

Vizuální změny pozorované na površích

U nerezových misek, které byly použity při experimentech s překrytím vzorku IR filtrem, byly po ozáření a extrakci pozorovány trvalé vizuální změny na povrchu (viz obrázek 10). Konkrétně se jednalo o bílé až šedé šmouhy lokalizované v místech, kde se nacházel film cytostatika. Tyto stopy přetrvávaly i po několika hodinách expozice v alkalické lázni a nebyly odstranitelné běžnými organickými rozpouštědly na bázi alkoholu.

Přítomnost IR filtru během ozáření mohla ovlivnit lokální podmínky na povrchu testovaného materiálu – zvýšením teploty a omezením odparu došlo pravděpodobně k silnějšímu kontaktu cytostatického filmu s kovovým povrchem. Není vyloučeno, že během desorpce došlo k částečnému mechanickému přenosu materiálu směrem do povrchu, případně ke vzniku mikroskopických změn na pasivační vrstvě oceli, které vedly k retenci zbytkových složek.

Vzhledem k tomu, že nebyla pozorována žádná interferující kontaminace při následném měření, ani opakované uvolňování cytostatika, lze předpokládat, že se jedná o neaktivní zbytky adsorbované nebo mechanicky vtlačené do povrchu bez chemické přeměny původní látky.



Obrázek 10: Vlevo je nerezová miska ihned po extrakci methanolem při experimentu s IR filtry. Mimo samotnou šedou stopu cytostatika, které bylo po 30 sekundách extrahováno a převedeno do HPLC vialky, lze pozorovat i zachovalou kružnici po IR-filtru. Vpravo je stejná miska po pěti hodinách v alkalické lázni a po ošetření čistým ethanolem. Vizuálně nedošlo k žádné změně povrchu a obě dvě stopy zůstávají ve stejné velikosti.

Diskuze

Nejnápudnějším zjištěním během celé série experimentů je skutečnost, že laserová dekontaminace cytostatik byla reprodukovatelně účinná pouze na nerezové oceli. Tento fakt je klíčový, protože vytváří zásadní rozdíl mezi tím, jak laser interaguje s jednotlivými typy materiálů, a určuje tak samotný mechanismus, kterým k odstranění kontaminantu dochází:

Nerezový povrch při laserové expozici umožňuje kombinaci přímé absorpce laserového záření a efektivního vedení tepla směrem k adsorbované vrstvě cytostatika. Nerezová ocel absorbuje IR záření, přičemž výsledný ohřev povrchu může vést buď k přímé desorpci molekul, nebo – v případech s vyšší hustotou energie – k ablaci tenké vrstvy materiálu, která s sebou cytostatikum mechanicky odnese. V obou případech ale hraje zásadní roli možnost, aby uvolněná látka mohla být z místa interakce okamžitě odstraněna – buď proudem vzduchu, nebo expanzí plazmy. V experimentech, kde byl povrch zakrytý IR filtrem nebo skleněným víčkem, bylo pozorováno, že účinek laseru se výrazně snížil nebo zcela vymizel. Nešlo však o to, že by laserový paprsek neinteragoval s povrchem – k zahřátí a pravděpodobně i k desorpci došlo – avšak v uzavřeném prostoru nad povrchem nebyl žádný prostor pro odvod desorbovaných částic; ty tak mohly re-adsorbovat zpět na povrch nebo kondenzovat poblíž místa expozice. To by vysvětlovalo i pozorované zbytky šedých šmouh v místech původní kontaminace – zřejmě se jedná o kondenzovanou látku, která nebyla odvedena z místa během expozice.

Naopak u skla a keramiky se laserová dekontaminace neprojevila vůbec, a to jak z hlediska vizuálních změn, tak z pohledu analytických výsledků. Tento rozdíl lze přičíst velmi odlišným fyzikálním vlastnostem těchto materiálů. Sklo je pro IR záření do značné míry transparentní a vykazuje velmi nízkou absorpci energie, což znamená, že většina laserového záření jím projde bez významné interakce s povrchem. Keramické materiály mají vyšší rozptyl a částečnou absorpci, avšak jejich nízká tepelná vodivost a nepravidelná mikrostruktura způsobují, že se absorbovaná energie nešíří efektivně směrem k tenkému filmu cytostatika. V důsledku toho zde nedochází ani k významnému ohřevu, ani k desorpci. Vzhledem k těmto vlastnostem je laserem indukovaná desorpce cytostatik z těchto povrchů neúčinná.

Rozdíl mezi typy materiálů tedy nespočívá pouze v rozdílné adhezi cytostatik nebo v jejich chemické reaktivitě, ale primárně v rozdílné schopnosti povrchu absorbovat a přenášet energii z laserového pulzu do povrchové vrstvy, a následně v možnosti uvolněné molekuly z místa interakce odtransportovat. U kovů tyto podmínky splněny jsou, u skla a keramiky nikoliv.

Nejpřesvědčivější interpretace jevů pozorovaných při účinné dekontaminaci kovových povrchů laserovým zářením spočívá v kombinaci několika fyzikálních mechanismů, z nichž klíčovou roli sehrává fotoemise elektronů spolu s následnými lokálními elektrostaticko-mechanickými efekty.

Po dopadu pulzního záření vláknového laseru (1064 nm) na kovový povrch dochází k silné absorpci energie díky vysoké hustotě volných elektronů v kovu. Tato energie vede ke kolektivní excitaci elektronového plynu kovu a následně k výstřelu elektronů z povrchu v důsledku vnějšího fotoelektrického jevu. Energie jednotlivého fotonu o vlnové délce 1064 nm odpovídá přibližně 1,17 eV, což je méně než výstupní práce většiny kovů (typicky 4–5 eV). Za běžných podmínek by proto nemohlo dojít k fotoemisi, protože foton nemá dostatečnou energii k uvolnění elektronu z kovového povrchu do vakua. Nicméně při vysoké intenzitě krátkého pulzu (řádově nanosekundy) může docházet k multifotonové fotoemisi, kdy elektron absorbuje více fotonů najednou a získá tak dostatek energie pro opuštění materiálu. Tento nelineární jev je zesílen lokálními efekty na nerovném povrchu kovu a přítomností rezonancí elektronového plynu v kovu, které zvyšují efektivní elektromagnetické pole v místě dopadu. Díky tomu je možné uvolnění elektronů i v případě, že energie jednotlivého fotonu nedosahuje výstupní práce daného kovu.

Tato ztráta elektronů na povrchu kovu vyvolává lokální změnu povrchového náboje, čímž se vytvářejí gradienty elektrického pole, které působí směrem od povrchu materiálu. Společně s lokálním ohřevem povrchu (fototermický efekt) a možnými termoelastickými oscilacemi v kovové mřížce vede toto působení k mechanickému uvolnění organické vrstvy – v našem případě cytostatika. Nejde o termický rozklad ani plazmatickou ablační destrukci, ale o desorpci poháněnou součtem elektrostatických a mechanických sil, které vznikají v důsledku fotoemise.

Výsledkem je aerosolizace cytostatika – částice se uvolní do okolního vzduchu. Dekontaminace byla experimentálně potvrzena jen při otevřeném systému, kde měly uvolněné částice možnost volného rozptylu. Ve scénářích s překrytím (IR filtr, sklo) k tomuto rozptylu nedošlo – desorbované molekuly se mohly readsorbovat zpět nebo kondenzovat poblíž místa dopadu laseru, což vedlo k pozorovaným zbytkům.

Nedochází tedy k rozkladu molekuly jako takové – žádný fotochemický účinek nebo specifické excitace vazeb (např. C–O, C–H) v této konfiguraci experimentálně prokázány nebyly. Účinnost je závislá výhradně na schopnosti materiálu generovat volné elektrony, absorbovat pulz a mechanicky přenášet vzniklou energii k povrchové vrstvě. Absence volných elektronů u dielektrických materiálů (sklo, keramika) vylučuje možnost fotoemise, rezonance elektronového plynu i sekundárních mechanických efektů – a tím pádem i účinné desorpce.

V kontextu všech pozorovaných jevů tedy laserová dekontaminace cytostatik z kovových povrchů probíhá primárně na základě nelineární fotoemise a následného elektrostatického od fouknutí

molekul z povrchu, nikoliv na základě destrukce molekul samotných. Tento závěr je plně konzistentní s experimentálními výsledky a vysvětluje i rozdíly v účinnosti mezi různými konfiguracemi a materiály.

Závěr

Cílem této práce bylo ověřit možnost využití laserových systémů pro dekontaminaci povrchů kontaminovaných cytostatiky, se zaměřením na praktickou aplikaci v nemocničních a laboratorních podmínkách. V rámci experimentální části byly optimalizovány HPLC metody pro kvantitativní stanovení vybraných cytostatik a byly navrženy laboratorní postupy pro hodnocení účinnosti jejich dekontaminace.

Byla provedena laserová expozice modelových povrchů s nanesenými cytostatiky pomocí pulzních laserů o výkonech 100 W a 200 W, a také pomocí CO₂ laseru, přičemž byly testovány různé doby ozařování, pulzní režimy a typy referenčních materiálů (kov, sklo, keramika). Výsledky ukazují, že účinná dekontaminace je dosažitelná pouze na kovových površích, a to díky fyzikálním jevům spojeným s fotoemisí a následnou aerosolizací kontaminantu. Na nevodivých materiálech, jako je sklo nebo keramika, k účinné dekontaminaci nedochází.

Naměřená data ukázala, že přístroj s nominálním výkonem 100 W dosahuje srovnatelné, nebo dokonce vyšší účinnosti. To přináší řadu výhod pro vývoj čistícího laseru do čistých prostor – menší rozměry, snazší transport, a také nižší vliv na proudění vzduchu a víření prachových částic způsobené chlazením přístroje.

Důležitým zjištěním experimentální práce je objasnění mechanismu dekontaminace, přičemž nedochází k degradaci cytostatik a tím ke snížení jejich biologické účinnosti, ale k jejich uvolnění do okolí čistěného povrchu. Nedílnou součástí přístroje tak musí být účinné odsávací zařízení a součástí dekontaminačního procesu musí být také finální likvidace kontaminovaných filtrů.

Seznam literatury

- [1] Gabriel, J.: *The Biology of Cancer*; John Wiley & Sons: Chichester, England ; Hoboken, Nj, 2007. s. 5-30.
- [2] Gabriel, J.: *The Biology of Cancer*; John Wiley & Sons: Chichester, England ; Hoboken, Nj, 2007. s. 67-103.
- [3] Gabriel, J.: *The Biology of Cancer*; John Wiley & Sons: Chichester, England ; Hoboken, Nj, 2007. s. 6-7.
- [4] Gabriel, J.: *The Biology of Cancer*; John Wiley & Sons: Chichester, England ; Hoboken, Nj, 2007. s. 28.
- [5] Liu, B.; Zhou, H.; Tan, L.; Siu, K. T. H.; Guan, X.-Y. Exploring Treatment Options in Cancer: Tumor Treatment Strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2024**, *9* (1), 1–44.
- [6] Carvalho, C.; Santos, R.; Cardoso, S.; Correia, S.; Oliveira, P.; Santos, M.; Moreira, P. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16* (25), 3267–3285.
- [7] Vigevani; Williamson, M. J. Doxorubicin. *Analytical profiles of drug substances* **1981**, 245–274.
- [8] Mross, K.; Maessen, P.; van der Vijgh, W. J.; Gall, H.; Boven, E.; Pinedo, H. M. Pharmacokinetics and Metabolism of EpiDoxorubicin and Doxorubicin in Humans. *Journal of Clinical Oncology* **1988**, *6* (3), 517–526.
- [9] Olson, R. D.; Mushlin, P. S. Doxorubicin Cardiotoxicity: Analysis of Prevailing Hypotheses. *The FASEB Journal* **1990**, *4* (13), 3076–3086.
- [10] Pugazhendhi, A.; Edison, T. N. J. I.; Velmurugan, B. K.; Jacob, J. A.; Karuppusamy, I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to Different Experimental Organ Systems. *Life Sciences* **2018**, *200*, 26–30.
- [11] Alves, R. C.; Fernandes, R. P.; Eloy, J. O.; Salgado, H. R. N.; Chorilli, M. Characteristics, Properties and Analytical Methods of Paclitaxel: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2018**, *48* (2), 110–118.
- [12] Panchagnula, R. Pharmaceutical Aspects of Paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *172* (1), 1–15.
- [13] Sonnichsen, D. S.; Relling, M. V. Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel. *Clinical Pharmacokinetics* **1994**, *27* (4), 256–269.
- [14] Stage, T. B.; Bergmann, T. K.; Kroetz, D. L. Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel

- Monotherapy: An Updated Literature Review. *Clinical Pharmacokinetics* **2018**, *57* (1), 7–19.
- [15] Kohler, D. R.; Goldspiel, B. R. Paclitaxel (Taxol). *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **1994**, *14* (1), 3–34.
- [16] Awosika AO, Below J, Das JM. *Vincristine*. [Updated 2023 Oct 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537122/>
- [17] Rodrigues, A. S.; Lopes, A. R.; Leao, A.; A. Couceiro; Ribeiro, S.; Ramos, F.; da, N.; de, R. Development of an Analytical Methodology for Simultaneous Determination of Vincristine and Doxorubicin in Pharmaceutical Preparations for Oncology by HPLC--UV. *Journal of Chromatographic Science* **2009**, *47* (5), 387–391.
- [18] CAYMAN CHEMICAL. <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/11764.pdf> (citováno 2025-04-18).
- [19] *Vincristine Datasheet*. Selleckchem.com. <https://www.selleckchem.com/datasheet/vincristine-S955503-DataSheet.html> (citováno 2025-04-18).
- [20] Ghaffary, S.; Gholami, N.; Samankan, S.; Pourkarim, F. Delayed Presentation of Vincristine Extravasation. *Journal of Oncology Pharmacy Practice: Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners* **2023**, *29* (8), 2023–2026.
- [21] Škubník, J.; Pavlíčková, V. S.; Ruml, T.; Rimpelová, S. Vincristine in Combination Therapy of Cancer: Emerging Trends in Clinics. *Biology* **2021**, *10* (9), 849.
- [22] Moore, A.; Pinkerton, R. Vincristine: Can Its Therapeutic Index Be Enhanced? *Pediatric Blood & Cancer* **2009**, *53* (7), 1180–1187.
- [23] ROSENTHAL, S. Vincristine Neurotoxicity. *Annals of Internal Medicine* **1974**, *80* (6), 733.
- [24] CARBONE, P. P.; BONO, V.; FREI, E.; BRINDLEY, C. O. Clinical Studies with Vincristine. *Blood* **1963**, *21* (5), 640–647.
- [25] Kollmannsberger, C.; Mross, K.; Jakob, A.; Kanz, L.; Bokemeyer, C. Topotecan – a Novel Topoisomerase I Inhibitor: Pharmacology and Clinical Experience. *Oncology* **1999**, *56* (1), 1–12.
- [26] Virginie M.M. Herben; ten, W.; Beijnen, J. H. Clinical Pharmacokinetics of Topotecan. *Clinical Pharmacokinetics* **1996**, *31* (2), 85–102.
- [27] *Topotecan . hydrochloride*. Enzo. <https://www.enzo.com/product/topotecan->

- hydrochloride-2/ (citováno 2025-04-18).
- [28] *AYMAN CHEMICAL*. <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/14129.pdf> (citováno 2025-04-18).
- [29] *Topotecan Actavis* | *European Medicines Agency (EMA)*. European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/topotecan-actavis> (citováno 2025-04-18).
- [30] Odráška, P.; Gorná, L.; Doležalová, L.; Oravec, M.; Kuta, J.; Bláha, L. Monitoring of surface cytotoxic drugs in the environment of hospital pharmacies in the Czech Republic. *Čes. slov. Farm.* **2009**, *58*, 225–229.
- [31] Doležalová, L.: Šíření, hladiny a rizika cytostatik v prostředí nemocnic a lékáren a v domácnostech onkologických pacientů [Dizertační práce]. Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta, Brno, **2022**.
- [32] Doležalová, L.; Bláhová, L.; Kuta, J.; Tereza Hojdarová; Šárka Kozáková; Luděk Bláha. The Effectiveness of Widely Used Disinfectants in Removing Contamination with Cytotoxic Drugs. *Hygiena* **2022**, *67* (1), 20–27.
- [33] AION CS - info@aion.cz. 84/2008 Sb. *Vyhláška o správné lékařské praxi, bližších podmínkách zacházení s léčivy v lékárnách, zdravotnick... Zákony pro lidi*. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-84> (citováno 2025-04-18).
- [34] Blahova, L.; Lenka Dolezalova; Kuta, J.; Sarka Kozakova; Blaha, L. Hospitals and Pharmacies as Sources of Contamination by Cytostatic Pharmaceuticals: Long-Term Monitoring in the Czech Republic. *Springer eBooks* **2020**, 57–70.
- [35] *Dnes je Světový den nemocniční farmacie. Její úloha je v nemocničním prostředí klíčová.* | *Česká lékárnická komora*. Česká lékárnická komora. <https://lekarnici.cz/dnes-je-svetovy-den-nemocnicni-farmacie-jeji-uloha-je-v-nemocnicnim-prostredi-klicova/> (citováno 2025-04-18).
- [36] Dolezalova. L.; L. Blahova; Kuta, J.; S. Kozakova; Blaha, L. CN22 Occupational Risks of Health Care Personnel Administering Antineoplastic Drugs. Results of the Large-Scale Monitoring in Czech and Slovak Hospitals. *Annals of Oncology* **2020**, *31*, S1131–S1131.
- [37] Doležalová, L.; Bláhová, L.; Kuta, J.; Hojdarová, T.; Kozáková, Š.; Bláha, L. Levels and Risks of Surface Contamination by Thirteen Antineoplastic Drugs in the Czech and Slovak Hospitals and Pharmacies. *Environmental Science and Pollution Research* **2021**, *29* (18), 26810–26819.
- [38] Bláhová, L.; Luděk Bláha; Lenka Doležalová; Kuta, J.; Tereza Hojdarová. Proposals of

- Guidance Values for Surface Contamination by Antineoplastic Drugs Based on Long Term Monitoring in Czech and Slovak Hospitals and Pharmacies. *Frontiers in Public Health* **2023**, *11*.
- [39] Cytostatika.cz. *Výstupy* - *Cytostatika.cz.* Cytostatika.cz. <https://www.cytostatika.cz/index.php?pg=pro-odborniky--monitoring-kontaminace-pracovniho-prostredi--vystupy> (accessed 2025-04-18).
- [40] Doležalová, L.; Bláhová, L.; Kuta, J.; Tereza Hojdarová; Šárka Kozáková; Luděk Bláha. The Effectiveness of Widely Used Disinfectants in Removing Contamination with Cytotoxic Drugs. *Hygiena* **2022**, *67* (1), 20–27.
- [41] Bláhová, L.; Kuta, J.; Lenka Doležalová; Šárka Kozáková; Tereza Krovová; Luděk Bláha. The Efficiency of Antineoplastic Drug Contamination Removal by Widely Used Disinfectants–Laboratory and Hospital Studies. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **2021**, *94* (7), 1687–1702.
- [42] José Ángel Lema-Atán; Lendoiro, E.; Lucía Paniagua-González; Cruz, A.; López-Rivadulla, M.; de-Castro-Ríos, A. LC–MS-MS Determination of Cytostatic Drugs on Surfaces and in Urine to Assess Occupational Exposure. *Journal of Analytical Toxicology* **2022**, *46* (9), e248–e255.
- [43] Dugheri, S.; Squillaci, D.; Cappelli, G.; Saccomando, V.; Niccolò Fanfani; Ceccarelli, J.; Mucci, N.; Arcangeli, G. Evaluation of the Risk of Occupational Exposure to Antineoplastic Drugs in Healthcare Sector: Part I – Medical Gloves. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* **2023**, *74* (3), 187–197.
- [44] Masarykova univerzita. *Monitoring expozice cytotoxickým léčivům u pracovníků ve zdravotnictví a rodinných příslušníků onkologických pacientů, analýza rizik, zpracování doporučených postupů* | Masarykova univerzita. Masarykova univerzita. <https://www.muni.cz/vyzkum/projekty/41186> (citováno 2025-04-18).
- [45] Bláhová, L. Regular Monitoring of Cytotoxic Drugs - 2024 [Zpráva]. Masaryk Cancer Institute, Brno, 2024. Available at: <https://www.cytostatika.cz/res/file/monitoring/cyto-monitoring-podzim-2024.pdf> [citováno 18.4. 2025].
- [46] Cytostatika.cz. *Monitoring kontaminace pracovního prostředí* - *Cytostatika.cz.* Cytostatika.cz. <https://www.cytostatika.cz/index.php?pg=pro-odborniky--monitoring-kontaminace-pracovniho-prostredi> (citováno 2025-04-18).
- [47] Ensslin, A. S.; Huber, R.; Pethran, A.; Römmelt, H.; Schierl, R.; Kulka, U.; Fruhmann, G. Biological Monitoring of Hospital Pharmacy Personnel Occupationally Exposed to Cytostatic Drugs: Urinary Excretion and Cytogenetics Studies. *International Archives of*

- Occupational and Environmental Health* **1997**, 70 (3), 205–208.
- [48] Blahová, L.; Kuta, J.; Lenka Doležalová; Šárka Kozáková; Tereza Hojdarová; Luděk Bláha. Levels and Risks of Antineoplastic Drugs in Households of Oncology Patients, Hospices and Retirement Homes. *Environmental Sciences Europe* **2021**, 33 (1).
- [49] Francisca Portilha-Cunha, M.; Alves, A.; Mónica S.F. Santos. Cytostatics in Indoor Environment: An Update of Analytical Methods. *Pharmaceuticals* **2021**, 14 (6), 574–574.
- [50] Breck Hitz; Ewing, J. J.; Hecht, J. Introduction to Laser Technology; Wiley-Ieee Press: Hoboken, N.J., 2012. s. 57-99
- [51] Breck Hitz; Ewing, J. J.; Hecht, J. Introduction to Laser Technology; Wiley-Ieee Press: Hoboken, N.J., 2012. s. 89-98
- [52] Biswas, D. J. *A Beginner's Guide to Lasers and Their Applications, Part I*; Springer Nature, 2023, str 135-143
- [53] Mihai Stafe; Marcu, A.; Puscas, N. N. *Pulsed Laser Ablation of Solids*; Springer Science & Business Media, 2013. s. 53-123.
- [54] Black, S. E. Laser Ablation: Effects and Applications (Lasers and Electro-optics Research and Technology). UK ed.; Nova Science Pub Inc: 2011. s. 143-163.
- [55] Yao, Y. L.; Chen, H.; Zhang, W. Time Scale Effects in Laser Material Removal: A Review. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* **2004**, 26 (5-6), 598–608.
- [56] Shirk, M. D.; Molian, P. A. A Review of Ultrashort Pulsed Laser Ablation of Materials. *Journal of Laser Applications* **1998**, 10 (1), 18–28.
- [57] Black, S. E. Laser Ablation: Effects and Applications (Lasers and Electro-optics Research and Technology). UK ed.; Nova Science Pub Inc: 2011. s. 99-127.
- [58] Greifzu, G.; Kahl, T.; Herrmann, M.; Lippmann, W.; Hurtado, A. Laser-Based Decontamination of Metal Surfaces. *Optics & Laser Technology* **2019**, 117, 293–298.
- [59] Black, S. E. Laser Ablation: Effects and Applications (Lasers and Electro-optics Research and Technology). UK ed.; Nova Science Pub Inc: 2011. s. 143-153.
- [60] Zhou, Z.; Sun, W.; Wu, J.; Chen, H.; Zhang, F.; Wang, S. The Fundamental Mechanisms of Laser Cleaning Technology and Its Typical Applications in Industry. *Processes* **2023**, 11 (5), 1445.
- [61] Black, S. E. Laser Ablation: Effects and Applications (Lasers and Electro-optics Research and Technology). UK ed.; Nova Science Pub Inc: 2011. s. 163-227.
- [62] Ahmed, N.; Darwish, S.; Alahmari, A. M. Laser Ablation and Laser-Hybrid Ablation

- Processes: A Review. *Materials and Manufacturing Processes* **2015**, 31 (9), 1121–1142.
- [63] Black, S. E. Laser Ablation: Effects and Applications (Lasers and Electro-optics Research and Technology). UK ed.; Nova Science Pub Inc: 2011. s. 45-56.
- [64] Rink, K.; Delacrétaz, G.; Salathé, R. P. Fragmentation Process of Current Laser Lithotriptors. *Lasers in Surgery and Medicine* **1995**, 16 (2), 134–146.
- [65] Leontyev, A. Laser Decontamination and Cleaning of Metal Surfaces : Modelling and Experimental Studies. *Hal.science* **2011**. <https://theses.hal.science/tel-00661695>.
- [66] Jesús, A.; Lamas, J.; J.S. Pozo-Antonio; Rivas, T.; Ramil, A. Development of Processing Strategies for 3D Controlled Laser Ablation: Application to the Cleaning of Stonework Surfaces. *Optics and Lasers in Engineering* **2020**, 126, 105897–105897.
- [67] Westphäling, T. Pulsed Fiber Lasers from Ns to Ms Range and Their Applications. *Physics Procedia* **2010**, 5, 125–136.
- [68] Mihai Stafe; Marcu, A.; Puscas, N. N. *Pulsed Laser Ablation of Solids*; Springer Science & Business Media, 2013. s. 54-59.
- [69] Byskov-Nielsen, J.; Savolainen, J.-M.; Christensen, M. S.; Balling, P. Ultra-Short Pulse Laser Ablation of Metals: Threshold Fluence, Incubation Coefficient and Ablation Rates. *Applied Physics A* **2010**, 101 (1), 97–101.
- [70] Biswas, D. J. *A Beginner's Guide to Lasers and Their Applications, Part I*; Springer Nature, 2023., Part 1. s. 73-84, 101-133, 163-187.
- [71] *Mobilní čistící laser ROD 200 W - Narran*. Narran. <https://narran.cz/produkty/rod-200/> (citováno 2025-04-18).
- [72] *Pulzní vláknový čistící laser ROD 100 W - Narran*. Narran. <https://narran.cz/produkty/pulzni-cistici-vlaknovy-laser-100w/> (citováno 2025-04-18).
- [73] *Thunder Laser Nova 24 * CO2 Laser, gravírka, řezačka*. Thunder Laser. <https://thunder-laser.cz/portfolio/thunder-laser-nova-24/> (citováno 2025-04-18).
- [74] Dharmalingam, S.; Ramamurthy, S.; Chidambaram, K.; S Nadaraju. A Simple HPLC Bioanalytical Method for the Determination of Doxorubicin Hydrochloride in Rat Plasma: Application to Pharmacokinetic Studies. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **2014**, 13 (3), 409–409.
- [75] King, D. T.; Venkateshwaran, T. G.; Stewart, J. T. HPLC Determination of a Vincristine, Doxorubicin, and Ondansetron Mixture in 0.9% Sodium Chloride Injection. *Journal of Liquid Chromatography* **1994**, 17 (6), 1399–1411.

- [76] Configliacchi, E.; Razzano, G.; Rizzo, V.; Vigevani, A. HPLC Methods for the Determination of Bound and Free Doxorubicin, and of Bound and Free Galactosamine, in Methacrylamide Polymer-Drug Conjugates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1996**, *15* (1), 123–129.
- [77] Mistiran, A. F.; Abu Dzarr Abdullah; Siew Hua Gan. HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Detection of Arabinoside-C and Doxorubicin. *Toxicology Mechanisms and Methods* **2010**, *20* (8), 472–481.
- [78] Pradhan, N.; Hiyashree Rajkhowa; Giri, H.; Shrestha, B. Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Moxifloxacin Hydrochloride and Doxorubicin Hydrochloride. *ResearchGate* **2015**, *7* (11), 21–26.
- [79] Hang, H.; Ye, L.; Stewart, J. T. HPLC Determinations of Doxorubicin with Selected Medications in 0.9% Sodium Chloride Injection USP. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1998**, *21* (15), 2375–2385.
- [80] Sanogo, S.; Silimbani, P.; Gaggeri, R.; Masini, C. Development and Validation of an HPLC-DAD Method for the Simultaneous Identification and Quantification of Topotecan, Irinotecan, Etoposide, Doxorubicin and Epirubicin. *Arabian Journal of Chemistry* **2021**, *14* (1), 102896.
- [81] Rajender, G. Sensitive and Validated HPLC Method for Determination of Paclitaxel in Human Serum. *Indian Journal of Science and Technology* **2009**, *2* (5), 52–54.
- [82] Bernabeu, E.; Flor, S.; Hocht, C.; Taira, C.; Chiappetta, D.; Tripodi, V.; Lucangioli, S. *Development and Validation of a Highly Sensitive HPLC Method for ...: Ingenta Connect*. Ingentaconnect.com.
<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpa/2014/00000010/00000003/art00005#Refs> (ocitováno 2025-04-18).
- [83] Choudhury, H.; Gorain, B.; Karmakar, S.; Pal, T. K. Development and Validation of RP-HPLC Method: Scope of Application in the Determination of Oil Solubility of Paclitaxel. *Journal of Chromatographic Science* **2013**, *52* (1), 68–74.
- [84] Jain, A.; Gulbake, A.; Jain, A.; Shilpi, S.; Hurkat, P.; Kashaw, S.; Jain, S. K. Development and Validation of the HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paclitaxel and Topotecan. *Journal of Chromatographic Science* **2013**, *52* (7), 697–703.
- [85] Willey, T. A.; Bekos, E. J.; Gaver, R. C.; Duncan, G. F.; Tay, L. K.; Beijnen, J. H.; Farmen, R. H. High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Quantitative Determination of Paclitaxel (Taxol®) in Human Plasma. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* **1993**, *621* (2), 231–238.

- [86] Yonemoto, H.; Ogino, S.; Nakashima, M. N.; Wada, M.; Nakashima, K. Determination of Paclitaxel in Human and Rat Blood Samples after Administration of Low Dose Paclitaxel by HPLC-UV Detection. *Biomedical Chromatography* **2007**, *21* (3), 310–317.
- [87] Chen, W.; Shen, Y.; Rong, H.; Lei, L.; Guo, S. Development and Application of a Validated Gradient Elution HPLC Method for Simultaneous Determination of 5-Fluorouracil and Paclitaxel in Dissolution Samples of 5-Fluorouracil/Paclitaxel-Co-Eluting Stents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, *59*, 179–183.
- [88] Rodrigues, A. S.; Lopes, A. R.; Leao, A.; A. Couceiro; Ribeiro, S.; Ramos, F.; da, N.; de, R. Development of an Analytical Methodology for Simultaneous Determination of Vincristine and Doxorubicin in Pharmaceutical Preparations for Oncology by HPLC--UV. *Journal of Chromatographic Science* **2009**, *47* (5), 387–391.
- [89] Dine, T.; M. Luyckx; Cazin, J. C.; Brunet, C.; Cazin, M.; F. Goudaliez; M.L. Mallevais. Stability and Compatibility Studies of Vinblastine, Vincristine, Vindesine and Vinorelbine with PVC Infusion Bags. *International Journal of Pharmaceutics* **1991**, *77* (2-3), 279–285.
- [90] Yang, F.; Wang, H.; Liu, M.; Hu, P.; Jiang, J. Determination of Free and Total Vincristine in Human Plasma after Intravenous Administration of Vincristine Sulfate Liposome Injection Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1275*, 61–69.
- [91] King, D. T.; Venkateshwaran, T. G.; Stewart, J. T. HPLC Determination of a Vincristine, Doxorubicin, and Ondansetron Mixture in 0.9% Sodium Chloride Injection. *Journal of Liquid Chromatography* **1994**, *17* (6), 1399–1411.
- [92] Tassin, J. P.; Dubois, J.; Atassi, G.; M. Hanocq. Simultaneous Determination of Cytotoxic (Adriamycin, Vincristine) and Modulator of Resistance (Verapamil, S 9788) Drugs in Human Cells by High-Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* **1997**, *691* (2), 449–456.
- [93] Embree, L.; Gelmon, K. A.; Tolcher, A. W.; Hudon, N. J.; Heggie, J. R.; Dedhar, C.; Webb, M. S.; Bally, M. B.; Mayer, L. D. Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Assay Method for Quantification of Total Vincristine Sulfate in Human Plasma Following Administration of Vincristine Sulfate Liposome Injection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1997**, *16* (4), 675–687.
- [94] Gupta, M. M.; Singh, D. V.; Tripathi, A. K.; Pandey, R.; Verma, R. K.; Singh, S.; Shasany, A. K.; Khanuja, S. P. S. Simultaneous Determination of Vincristine, Vinblastine,

- Catharanthine, and Vindoline in Leaves of *Catharanthus Roseus* by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **2005**, *43* (9), 450–453.
- [95] Khalil, H. A.; El-Yazbi, A. F.; Belal, T. S.; Hamdy, D. A. High Performance Liquid Chromatographic Assay for the Simultaneous Determination of Posaconazole and Vincristine in Rat Plasma. *International Journal of Analytical Chemistry* **2015**, *2015*, 1–6.
- [96] Romain Guilhaumou; Solas, C.; Rome, A.; Giocanti, M.; Andre, N.; Lacarelle, B. Validation of an Electrospray Ionization LC/MS/MS Method for Quantitative Analysis of Vincristine in Human Plasma Samples. *Journal of Chromatography B* **2009**, *878* (3-4), 423–427.
- [97] Vries, N. A. de; Ouwehand, M.; Buckle, T.; Beijnen, J. H.; van Tellingen, O. Determination of Topotecan in Human and Mouse Plasma and in Mouse Tissue Homogenates by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Biomedical Chromatography* **2007**, *21* (11), 1191–1200.
- [98] Jain, A.; Gulbake, A.; Jain, A.; Shilpi, S.; Hurkat, P.; Kashaw, S.; Jain, S. K. Development and Validation of the HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paclitaxel and Topotecan. *Journal of Chromatographic Science* **2013**, *52* (7), 697–703.
- [99] Sanogo, S.; Silimbani, P.; Gaggeri, R.; Masini, C. Development and Validation of an HPLC-DAD Method for the Simultaneous Identification and Quantification of Topotecan, Irinotecan, Etoposide, Doxorubicin and Epirubicin. *Arabian Journal of Chemistry* **2021**, *14* (1), 102896.
- [100] Luiza, A.; Cláudia, A.; Emílio Ramos Cintra; Natália Noronha Ferreira; Silva; Tácio Gonçalves Hayasaki; Guimarães, D.; Eliana Martins Lima. Development and Validation of a Rapid RP-HPLC Method for Simultaneous Quantification of Paclitaxel and Cetuximab in Immunoliposomes. *Talanta* **2021**, *225*, 121988–121988.
- [101] Li, Y.; Gu, P.; Wei, Y.; Zhu, J. *RP-HPLC Determination of Content and Related Substances of Topotecan*. *Ingenta Connect*. <https://www.ingentaconnect.com/content/jpa/cjpa/2005/00000025/00000007/art00017> (citováno 2025-04-18).