Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа

по результатам выполнения индивидуальных заданий учебной практики
«Профильная учебная практика по биохимии»

на тему:

«Применение метода ИФА для терапевтического лекарственного мониторинга»

Выполнили:
студенты 3 курса 2 группы
Медико-биологического факультета
Направления подготовки Биология
Профиль Биохимия
Макарова Ксения Евгеньевна
Шахова Анастасия Евгеньевна
Старухина Анна Олеговна
Меликова Саран Кызы
Проверил:
Доцент кафедры фундаментальной
медицины и биологии
Толкачев Борис Евгеньевич

Хорошо (76 баллов)
см. замечания в
тексте работы
Ф.т. (Толкачев)
20.07.2016

Волгоград 2016

Содержание

1. Список сокращений 3
2. Введение 4
3. Методы анализа лекарственных средств 6
4. Иммуноферментный анализ в ТЛМ 7
5. ИФА диагностика теофиллина 9
6. ИФА диагностика дигоксина 11
7. ИФА диагностика карбамазепина 12
8. Список литературы 14

Список сокращений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛС – лекарственное средство

ТЛМ - терапевтический лекарственный мониторинг

Введение

Одной из основных задач, стоящих перед клинической фармакокинетикой, является поддержание оптимальной концентрации лекарства в месте действия - оптимизации фармакотерапии. Особенно это касается препаратов, имеющих узкий терапевтический коридор (некоторых антибиотиков, антиаритмиков, циклоспоринов, антиконвульсантов и др.). Эта задача решается с помощью терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ). Для целого ряда лекарственных препаратов назначение так называемых средних доз без учета знания концентрации препарата в крови может приводить к непредсказуемым последствиям.

Первые сообщения об успешном применении ТЛМ у больных эпилепсией возникли ещё в начале 70-х годов. Исследователи назначали, по их мнению, адекватную дозу препарата, однако обнаруживали большие индивидуальные вариации концентрации ЛС в крови. В работе предположили взаимосвязь данного феномена с особенностями абсорбции, распределения, метаболизма и элиминации препарата у разных пациентов. Следствием этого было обнаружение субтерапевтических и токсических значений концентрации противоэпилептических препаратов в крови у больных исследуемых групп.

После введения препарата в организм его молекулы в месте действия должны находиться в равновесии с молекулами этого препарата в крови. Это означает, что оптимальному терапевтическому эффекту должна соответствовать некая средняя концентрация (или средний диапазон концентраций) препарата в крови пациента. На стадии разработки новых лекарственных препаратов проводятся обязательные фармакокинетические исследования, позволяющие выяснить оптимальный "терапевтический коридор" для многих лекарств, который можно сформулировать как диапазон концентраций препарата в крови, в пределах которого существует достаточно высокая вероятность получения положительного эффекта и достаточно

низкая вероятность появления нежелательных побочных и токсических эффектов.

При назначении лекарства врач должен решить две основные задачи безопасной фармакотерапии: достижение положительного эффекта и избежание отрицательных последствий при приеме назначаемого препарата.

Потребность в ТЛМ возникает в ситуациях, когда:

• ЛС обладает узкой терапевтической широтой;

• невозможно достичь терапевтического эффекта, используя известные схемы дозирования препарата;

• эффективность и безопасность препарата сложно оценить клиническими методами;

• содержание ЛС в крови достоверно коррелирует с эффектами препарата или способствует риску возникновения нежелательных лекарственных реакций;

• под влиянием индивидуальных особенностей пациента или патологии изменена фармакокинетика ЛС, снижена эффективность лечения или повышен риск нежелательных лекарственных реакций;

• препарат назначают длительный период времени.

Знание терапевтических границ по многих случаях облегчает задачи врача в выборе оптимальных схем применения лекарственного средства. Однако простое измерение значений концентраций в крови пациента не всегда обеспечивает успешный результат, даже если речь идет о препарате, терапевтические рамки которого хорошо известны и можно по двум-трем измерениям рассчитать необходимую дозировку и интервалы дозирования. Использование современных подходов с применением определенного программного обеспечения дает возможность значительно продвинуться в оптимизации фармакотерапии.

Методы анализа лекарственных средств

Исследование биологического материала включает измерение массы (объема) пробы, высвобождение препарата (метаболитов) из клеток пробы, отделение целых клеток (например, при анализе крови) или частей клеток (при анализе гомогенатов тканей), добавление внутреннего стандарта, отделение белков, очистку пробы (центрифугирование, фильтрация), процедуры экстракции, реэкстракции, концентрирования и превращения исследуемых веществ в удобные для анализа производные, основные процедуры обработки проб крови и мочи соответственно

«Идеальный» аналитический метод измерения концентрации ЛВ должен обладать высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью, возможностью работы с малыми объемами, простотой подготовки материала, дешевизной и легкостью обслуживания оборудования, надежностью и возможностью автоматизации, простотой работы персонала и универсальностью (возможность анализа различных классов ЛВ). Для получения достоверных данных необходимо делать поправку на стабильность действующего вещества и/или продукта (продуктов), а также степень его биотрансформации в анализируемых биологических средах.

Валидация метода должна проводиться с учетом его предполагаемого применения, при калибровке следует учитывать диапазон концентраций исследуемого образца. Категорически не рекомендуется применять два или более метода анализа проб в одном и том же материале со сходным диапазоном калибровочных значений. Существует большое число методов определения концентрации ЛВ в биологических жидкостях: хроматографические, микробиологические, спектрофотометрические, полярографические, иммунологические (радиоиммунные, иммуноэнзимные), радиоизотопные и другие методы. Критическими параметрами метода являются чувствительность, скорость, точность, возможность работы с

малым объемом биоматериала и стоимость. В таблице 1 сравниваются аналитические методы анализа ЛС.

Таблица 1

Сравнительная характеристика методов анализа лекарственных средств

Методы	Абсолютная чувствительность, г	Чувствительность, баллы	Сложность, баллы	Избирательность, баллы	Универсальность	Суммарная оценка, баллы
Жидкостная хроматография:						
УФ-детектор	10^{-7}	3	-3	4	4	8
флуоресцентный детектор	$10^{-8} - 10^{-9}$	4	-3	5	2	8
масс-спектрометрический детектор	$10^{-11} - 10^{-12}$	5	-5	5	4	9
Иммунологические	$10^{-10} - 10^{-11}$	5	-1	4	1	9
Газовая хроматография:						
электронозахватный детектор	10^{-10}	5	-4	4	2	7
пламенно-ионизационный детектор	$10^{-8} - 10^{-9}$	4	-3	2	4	7

Наиболее широко (до 95% исследований) на практике применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными видами детекции. Преимуществами ВЭЖХ по сравнению, например, с методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) являются отсутствие ограничений по термостабильности анализируемых препаратов, возможность работы с водными растворами и летучими соединениями, использования вариантов «нормальнофазной» и «обращеннофазной» хроматографии. Многие из видов детекции являются неразрушающими; методы детекции, используемые в ВЭЖХ, обладают более высокой специфичностью.

Иммуноферментный анализ в ТКМ

Несмотря на то, что существует большое число методов определения концентраций лекарственных веществ в биологических жидкостях, в терапевтическом лекарственном мониторинге применяются только два основных подхода: это иммунологические (иммуноферментные) и хроматографические методы анализа.

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) предложен в начале 70-х годов прошлого столетия. Принцип ИФА заключается во взаимодействии специфических белковых антител с анализируемым веществом, выступающим в роли антигена. Чем выше концентрация вещества-антигена, тем больше образуется комплексов антиген-антитело. Для количественного анализа комплексообразования применяют два подхода – с предварительным отделением комплекса (гетерогенные методы) или без его отделения (гомогенные методы). В том и другом случае пробу с неизвестной концентрацией анализируемого вещества добавляют к сыворотке, в которой антитело связано в комплекс с меченным аналогом исследуемого вещества, и вещество из анализируемой пробы вытесняется из комплекса. Количество вытесненного меченого аналога пропорционально концентрации вещества в пробе. Определив, сколько меченого аналога оказалось вытеснено из комплекса (или, напротив, осталось связанным), можно рассчитать искомый уровень вещества в пробе.

Предварительно проводится калибровка с использованием стандартных растворов (со стандартными концентрациями тестируемого вещества). Выпускаются наборы реактивов – так называемые диагностикумы (антисыворотка, соединенный с препаратом фермент, субстрат, кофактор, стандартные растворы для калибровки), рассчитанные на 50 - 200 анализов. Для анализа обычно достаточно 0,05-0,2 мл сыворотки крови больного.

Иммуноэнзимные методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Диагностикумы сравнительно дешевые и имеют более продолжительные сроки годности, чем наборы для радиоиммунных методов. При использовании ИФА устраняется необходимость отделения комплекса антиген-антитело – достаточно сложной процедуры, с относительно высоким риском ошибки.

Иммуноэнзимный метод может выполняться в любой больничной или поликлинической лаборатории; разработаны приборы, обеспечивающие полную автоматизацию анализа. Простота анализа, высокая

чувствительность, точность, воспроизводимость, умеренная цена аппаратуры и реактивов – все это создает перспективу для широкого внедрения иммунологических методов в медицинскую практику.

Иммуноферментные методы показали свою высокую эффективность для рутинных анализов наиболее известных противоэпилептических средств. Однако они имеют ряд ограничений. Прежде всего, иммуноферментные методы привязывают аналитика к определенному производителю тестовых наборов. Кроме того, недостатком этого подхода является то, что иммуноферментные методы разработаны для очень узкой линейки лекарственных препаратов. Также эти методы могут давать большие погрешности в измерениях, в случае перекрестной аффинности антител по отношению к метаболиту препарата (иммунологический тест показывает большее значение по сравнению с реальным уровнем препарата). Совокупность этих ограничений делает невозможным применение иммунологических подходов для научно-исследовательских задач, оставляя их в арсенале коммерческих тестовых лабораторий.

ИФА диагностика теофиллина

Теофиллин – это производное метилксантина, широко применяемое при лечении астмы, обструктивных болезней легких и неонатальной асфиксии.

Существует тесная корреляция между действием теофиллина и концентрацией лекарства в сыворотке; терапевтический диапазон теофиллина составляет от 10 до 20 мкг/мл для взрослых и от 5 до 10 мкг/мл для новорожденных при лечении асфиксии. Токсичность теофиллина обычно проявляется при концентрациях выше 20 мкг/мл у взрослых, хотя слабые симптомы могут появиться при концентрациях выше 15 мкг/мл. К числу побочных эффектов относятся анорексия, тошнота, рвота, головные боли и нервозность. Такие тяжелые побочные эффекты, как учащение ЧСС, аритмия, эпилептические припадки, остановка дыхания или остановка

сердца, обычно происходят при концентрациях выше 40 мкг/мл, однако они также могут произойти и при более низких концентрациях.

Мониторинг концентраций теофиллина в сыворотке необходим из-за индивидуальных различий в скорости клиренса теофиллина. Выведение теофиллина замедлено у пациентов, страдающих ожирением, пациентов с заболеваниями печени и у тех, кто сидит на диете с большим содержанием углеводов и низким содержанием белков. У недоношенных детей младшего возраста также очень низкая скорость выведения теофиллина. Напротив, выведение теофиллина происходит быстрее у курильщиков сигарет. В совокупности с другими клиническими данными мониторинг уровней теофиллина в сыворотке может снабдить врача полезной информацией, которую тот может использовать при корректировке дозы пациента для достижения оптимального терапевтического эффекта, избегая при этом токсичности лекарства.

В основе теста лежит бактериальный фермент b-галактозидаза, который с помощью генной инженерии был разделен на два неактивных фрагмента. Эти фрагменты спонтанно связываются вновь, образуя действующий фермент, который в формате теста расщепляет субстрат, что приводит к изменению цвета, которое можно измерить методом спектрофотометрии.

В ходе анализа анализируемое вещество в образце конкурирует с анализируемым веществом, сопряженным с одним неактивным фрагментом b-галактозидазы за место связывания антитела. Если в образце присутствует анализируемое вещество, оно связывается с антителом, при этом неактивные фрагменты фермента свободно сопрягаются, образуя активный фермент. Если в образце анализируемого вещества нет, антитело связывается с анализируемым веществом, сопряженным с неактивным фрагментом, подавляя повторное соединение неактивных фрагментов b-галактозидазы, при этом не происходит образования активного фермента.

Количество образованного активного фермента и вызванное этим изменение абсорбции прямо пропорциональны содержанию анализируемого вещества в образце.

Отсутствие ссылки на литературные источники

ИФА диагностика дигоксина

Дигоксин широко используется для лечения застойной сердечной недостаточности и различных форм аритмии. Терапевтическое использование дигоксина повышает силу сокращений миокарда, в результате чего увеличивается систолический объём крови, уменьшается размер сердца, снижается венозное давление и объем крови. Терапевтическое использование дигоксина также стабилизирует и замедляет желудочковый ритм.

По результатам исследований, до 25% от общего числа госпитализированных пациентов, получавших дигоксин, в той или иной степени испытывали токсическое действие, и уровень смертности среди этих пациентов более чем вдвое превышал уровень смертности среди пациентов, которые не испытывали токсического действия препарата. Концентрация дигоксина от 0,9 до 2,0 нг/мл в сыворотке или в плазме обычно считается терапевтической[4]. Как правило, симптомы токсичности для человека наблюдаются при концентрации свыше 2,0 нг/мл; однако для отдельных пациентов даже концентрация 1,4 нг/мл является токсичной.

В сочетании с другими клиническими данными, мониторинг концентрации дигоксина в сыворотке или в плазме может дать врачу полезную информацию для корректировки индивидуальной дозировки, достижения оптимального терапевтического эффекта и для предотвращения как концентрации препарата, не дающей терапевтического эффекта, так и вредной токсичной концентрации.

В ИФА тесте дигоксина применена технология рекомбинатной ДНК (патент США №4708929) для получения уникальной системы гомогенного иммуноферментного анализа.

В основе теста лежит бактериальный фермент b-галактозидаза, который с помощью генной инженерии был разделен на два неактивных фрагмента. Эти фрагменты спонтанно связываются вновь, образуя действующий фермент, который в формате теста расщепляет субстрат, что приводит к изменению цвета, которое можно измерить методом спектрофотометрии.

В ходе теста, анализируемое вещество в образце конкурирует за место связывания антитела с анализируемым веществом, сопряженным с одним неактивным фрагментом b-галактозидазы. Если в образце присутствует анализируемое вещество, оно связывается с антителами, при этом неактивные фрагменты фермента свободно объединяются, образуя активный фермент. Если в образце отсутствует анализируемое вещество, антитело связывается с анализируемым веществом, сопряженным с неактивным фрагментом, подавляя повторное соединение неактивных фрагментов b-галактозидазы, при этом не происходит образования активного фермента.

Количество образованного активного фермента и вызванное этим изменение коэффициента поглощения прямо пропорциональны содержанию анализируемого вещества в образце.

ИФА диагностика карбамазепина

Карбамазепин является противосудорожным средством, используемым, в частности, для лечения невралгии троичного нерва, всех форм парциальных судорожных эпилепсий, генерализованных тонико-клонических припадков, а также простых и сложных парциальных припадков. Эффективная концентрация карбамазепина в сыворотке существенна для прекращения припадка. Однако концентрация карбамазепина в сыворотке лишь в некоторой степени зависит от дозы вследствие индивидуальных различий в абсорбции, метаболизме и выведении лекарства. Более того, одновременный прием других противоэпилептических средств может значительно повысить уровень карбамазепина в сыворотке.

Токсичность карбамазепина, связанная с терапией, может зависеть от дозы, но может и не зависеть от дозы. Однако симптомы расстройства центральной нервной системы, такие как вертиго, головокружение, двоение в глазах, зависят от дозы при продолжительном лечении. В совокупности с другой клинической информацией, мониторинг уровней карбамазепина даст врачам эффективное средство помощи в подборе дозировки и достижении оптимального терапевтического эффекта, и позволит избежать как недостаточных (субтерапевтических), так и токсичных уровней лекарства.

В ИФА тесте карбамазепина применена технология рекомбинатной ДНК (Патент США №4708929) для получения уникальной системы гомогенного иммуноферментного анализа.

В основе теста лежит бактериальный фермент b-галактозидаза, который с помощью генной инженерии был разделен на два неактивных фрагмента. Эти фрагменты спонтанно связываются вновь, образуя действующий фермент, который в формате теста расщепляет субстрат, что приводит к изменению цвета, которое можно измерить методом спектрофотометрии.

В ходе теста анализируемое вещество в образце конкурирует с анализируемым веществом, сопряженным с одним неактивным фрагментом b-галактозидазы, за место связывания антитела.

Если анализируемое вещество присутствует в образце, оно связывается с антителом, оставляя неактивные фрагменты фермента свободными для образования активного фермента. Если анализируемое вещество отсутствует в образце, антитело связывается с анализируемым веществом, сопряженным с неактивным фрагментом, препятствуя повторному соединению неактивных фрагментов b-галактозидазы, и при этом не происходит образования активного фермента. Количество образованного активного фермента и вызванное этим изменение абсорбции прямо пропорциональны количеству лекарства, присутствующего в образце.

Список литературы

1. Абаимов Д.А. Современные технологии в терапевтическом лекарственном мониторинге / Д.А. Абаимов, А.К. Сариев, Т.Ю. Носкова и др. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2013. – Т. 5 №2 – С. 31 – 41.

2. Клиническая фармакокинетика: теоретические, прикладные и аналитические аспекты: руководство / Под ред. В.Г. Кукеса. - 2009. - 432 с.

3. Соколов А.В. Терапевтический лекарственный мониторинг / А.В.Соколов // Качественная клиническая практика. – 2002. – № 1.

4. Судиловская Н.Н. Терапевтический лекарственный мониторинг – оптимизация терапии противосудорожными препаратами / Н.Н. Судиловская, А.С. Андреева // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – № 3 – с. 91-91

5. Холодов Л.Е., Яковлев В.П. Клиническая фармакокинетика. – М.: Медицина, 1985. – 463 с

6. Conference report on analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies // J. Pharmac. sci. – 1992. – Vol.81. – P. 309-312.

7. Fletcher C.V. Zidovudine triphosphate and lamivudine triphosphate concentration-response relationships in HIV infected persons / C.V. Fletcher, S.P. Kawle, T.N. Kakuda et al. // AIDS. - 2000. - Vol. 29. - 14(14). - P. 2137-2144.

8. Hiemke C. Therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: does it hold its promises? / C. Hiemke // Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci. 2008; 258 Suppl 1: 21-27.

9. Sadler B.M. Pharmacokinetic study of human immunodeficiency virus protease inhibitors used in combination with amprenavir / B.M. Sadler, C. Gillotin, Y. Lou et al. // Antimicrob. Agents Chemother. - 2001. - Vol. 45. - P. 3663-3668.

10. http://medirent.ru