

Nowe strategie pobierania próbek z przeznaczeniem do terapeutycznego monitorowania leków

New sample collecting strategies for therapeutic drug monitoring

Kornel Pawlak, Julia Kerner, Zuzanna Sołtysiak, Michał Smuszkiewicz, Marta Karaźniewicz-Łada

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Terapeutyczne monitorowanie leków (TDM) jest szczególnie istotne w przypadku leków o wąskim indeksie terapeutycznym, dużej międzyosobniczej odpowiedzi na leczenie lub nieliniowej farmakokinetyce. W ramach TDM stężenia leków oznaczane są najczęściej w surowicy lub osoczu, jednak pobranie krwi jest niekomfortowe oraz czasochłonne, a ponadto może prowadzić do infekcji. Z tego powodu poszukuje się alternatywnych metod pobierania próbek i nowych matryc pozwalających na zwiększenie komfortu i bezpieczeństwa pobrania oraz poprawę stabilności badanych związków i redukcji kosztów analizy. W niniejszej pracy zebrano aktualne informacje na temat alternatywnych metod pobierania próbek krwi oraz wykorzystania do TDM nowych matryc takich jak: pot, łzy, włosy, płyn mózgowo-rdzeniowy oraz krew pępowinowa. Na podstawie zestawienia ich korzyści i ograniczeń stwierdzono, że metoda suchej kropli krwi i moczu oraz ślina mogłyby w wielu przypadkach zastąpić rutynowe pobranie krwi w ramach TDM. Największym wyzwaniem w przypadku stosowania alternatywnych matryc biologicznych jest opracowanie prostej i selektywnej metodyki analizy leków, umożliwiającej jej zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej. (*Farm Współ* 2024; 17: 33-42) doi: 10.53139/FW.20241701

Słowa kluczowe: metoda suchej kropli krwi, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, pot, ślina

Abstract

Therapeutic drug monitoring (TDM) is crucial for drugs with a narrow therapeutic index, large inter-individual response to treatment, or nonlinear pharmacokinetics. As part of TDM, drug concentrations are most often measured in serum or plasma, but blood sampling is uncomfortable, time-consuming, and can lead to infection. For this reason, alternative sampling methods and new matrices are being sought to increase the comfort and safety of sampling, improve the stability of the tested compounds, and reduce the analysis costs. This paper collects up-to-date information on alternative blood sampling methods and new matrices such as sweat, tears, hair, cerebrospinal fluid, and umbilical cord blood for TDM. Based on a comparison of benefits and limitations, it was found that dried blood, urine spots, and saliva could possibly replace routine blood collection for TDM. The biggest challenge when using alternative biological matrices is to develop a simple and selective methodology for drug analysis that can be used in everyday clinical practice. (*Farm Współ* 2024; 17: 33-42) doi: 10.53139/FW.20241701

Keywords: dried blood spot method, urine, cerebrospinal fluid, sweat, saliva

Wstęp

W związku ze zmienną odpowiedzią pacjentów na terapię, poważnymi działaniami niepożądanymi lub nieliniową farmakokinetyką niektórych leków,

zasadne jest wprowadzenie terapeutycznego monitorowania leku (TDM). TDM pozwala zindywidualizować dawkowanie leku, a tym samym zapewnić jego skuteczność i bezpieczeństwo. Procedura pobrania

krwi żyłnej może być jednak problematyczna. Wymaga zaangażowania odpowiednio wykwalifikowanego personelu medycznego, zachowania odpowiednich warunków zarówno w trakcie pobrania krwi jak i jej przechowywania. Stanowi ona również obciążenie dla pacjenta, który musi stawić się w miejscu, w którym próbka zostanie pobrana oraz wiąże się z dyskomfortem w trakcie pobrania. Zarówno krew, mocz jak i ślina są najbardziej dostępnymi i łatwym do pobrania materiałem w celu analizy stężeń leku, jego metabolitów oraz związków endogennych, co przekłada się na ich ogromne znaczenie w terapii monitorowanej. TDM z wykorzystaniem krwi jako matrycy wiąże się z koniecznością częstego pobierania próbek, które jest bolesne, niekomfortowe oraz czasochłonne, a ponadto może prowadzić do anemii lub infekcji. Próbkę takie mogą być ponadto niestabilne co utrudnia ich przechowywanie i transport [1]. TDM oprócz zapewnienia bezpieczeństwa i skuteczności terapii ma zastosowanie również w racjonalnym wykorzystaniu dostępnych substancji leczniczych. Podejście to nabiera znaczenia zwłaszcza w przypadku antybiotykoterapii, w przypadku której obserwujemy coraz większą oporność i tym samym mniejszą skuteczność. TDM dla stosowanych antybiotyków mogłoby skutecznie zmniejszyć ryzyko nadużywania leków z tej grupy i ograniczyć rozwój oporności. Wprowadzenie TDM wymagałoby jednak opracowania taniej, prostej i komfortowej dla pacjenta metody. Z tych i wielu innych powodów poszukuje się innych, alternatywnych sposobów na pobranie i analizę próbek uzyskanych od pacjentów. Rozwijane są zarówno metody polegające na pobraniu jak najmniejszej ilości materiału (mikropróbki) jak i badania pozwalające na wykorzystanie nowych, niestosowanych wcześniej matryc. Do pierwszego przypadku można zaliczyć metody tak zwanej suchej kropli, np. metodę suchej kropli krwi (ang. *dried blood spot*, DBS), suchej kropli osocza (ang. *dried plasma spot*, DPS), suchej kropli moczu (ang. *dried urine spot*, DUS) lub suchej kropli śliny (ang. *dried saliva spot*, DSS), które już w chwili obecnej są szeroko wykorzystywane w praktyce klinicznej [2,3]. Zmniejszenie ilości matrycy pobieranej od pacjenta i rozwijanie metod umożliwiających ich wykorzystanie w TDM jest szczególnie istotne, gdy pobranie większej ilości krwi jest niewskazane (np. w przypadku noworodków) lub wiąże się ze zwiększonym ryzykiem infekcji (np. u pacjentów poddanych terapii immunosupresyjnej). Oprócz zmniejszenia ilości pobieranej próbki

wciąż poszukuje się nowych matryc, które pozwolą na analizę stężeń leku i realne przełożenie tych obserwacji na wynik terapii. Jako przykład można tu podać leki, dla których występuje duża zmienność między stężeniami obserwowanymi we krwi a np. w płynie mózgowo rdzeniowym lub zależność ta wcale nie występuje. Uniemożliwia to prawidłowe określenie ryzyka wystąpienia działań niepożądanych lub stwierdzenie czy stężenie leku w miejscu docelowym mieści się w przedziale terapeutycznym, co jest widoczne np. w przypadku terapii wankomycyną.

Technika suchej kropli krwi

Metoda suchej kropli krwi (ang. *dried blood spot*, DBS) w ostatnich latach stale zyskuje na popularności. Jest szeroko stosowana w badaniach przesiewowych m.in. u noworodków. Procedura polega na nakłuciu opuszki palca lub stopy i naniesieniu kropli krwi włósczkowej na specjalnie przeznaczoną do tego kartę. Pobrana próbka jest następnie suszona i przechowywana w temperaturze pokojowej do kilku tygodni.

DBS wciąż zyskuje na znaczeniu w TDM np. w monitorowaniu: antybiotykoterapii (np. gentamycyny, wankomycyny), leków przeciwpsychotycznych (np. aripiprazolu, klozapiny), leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej (np. palbocyklib, ribocyklib, letrozol), terapii lekami przeciwpadaczkowymi (np. karbamazepiny) lub terapii przeciwdepresyjnej (np. amitryptylina, nortryptylina, imipramina) i związków endogennych [2,4–6].

Jedną z wielu zalet metody DBS jest jej prostota. Zestawy dostępne komercyjnie mogłyby posłużyć pacjentom do samodzielnego zbierania próbek w domu, a następnie po wysuszeniu wysłania ich pocztą do ośrodka, w którym poddane zostałyby analizie. Jak donosi Girardin i wsp. rozwiązanie takie jest mniej kosztowne w porównaniu do standardowej procedury pobrania krwi żyłnej [7]. Dodatkowo zwiększa to dostępność badań dla pacjentów mieszkających daleko od miejsca poboru krwi lub mających trudności w przemieszczaniu się. Ograniczony kontakt z pracownikami służby zdrowia zyskuje na znaczeniu w okresie zwiększonego zachorowania np. na gripę, SARS-CoV2, ponieważ zmniejsza ryzyko kontaktu pacjenta z osobą chorą. Metoda ta jest bezpieczna również w odniesieniu do niektórych chorób wirusowych, jako że istnieje mniejsze ryzyko zakażenia niż w przypadku krwi żyłnej [8]. Za wykorzystaniem metody DBS przemawia również jej duże bezpieczeństwo oraz niewielka

ilość pobranego materiału, co pozwala posłużyć się nią w przypadku pacjentów, u których niemożliwe jest pobranie większej ilości krwi (np. u niemowląt). Próbkę pozyskiwaną metodą DBS są mniej uciążliwe w trakcie transportu. Nie wymagają one przechowywania w ujemnych temperaturach i są kompaktowych rozmiarów. Dobra stabilność próbek, pozyskanych metodą DBS, w temperaturze pokojowej została potwierdzona m.in. w badaniach Adam i wsp. [9].

Pomimo wielu zalet, metoda DBS może mieć pewne ograniczenia. W przypadku niektórych leków obserwuje się różnice pomiędzy stężeniami we krwi żyłnej i włosniczkowej. Mohammed i wsp. [10] zwrócili uwagę na rozbieżności w stężeniach paracetamolu oznaczonych w obu tych matrycach. Rozwiązaniem tego problemu, może być określenie współczynnika korekcyjnego, pozwalającego oszacować stężenia leku we krwi żyłnej na podstawie stężeń oznaczonych we krwi włosniczkowej pobranej metodą DBS [10]. Pomimo potwierdzonej stabilności DBS, próbka nadal narażona jest na czynniki takie jak: światło, wilgotność, zmienna temperatura, które mogą przyczynić się do jej szybszej degradacji [9]. W związku z tym przechowywanie DBS nadal wymaga zapewnienia odpowiednich warunków np. zastosowania środków osuszających. Samodzielne zebranie próbek przez pacjenta wiąże się również z ryzykiem jej zanieczyszczenia, co może mieć wpływ na późniejszą analizę. Dodatkowym utrudnieniem jest wpływ hematokrytu na lepkość krwi. U osoby z wysokim hematokrytem plamka krwi będzie w mniejszym stopniu rozchodzić się na karcie [11]. Nie bez znaczenia jest również konieczność ekstrakcji badanego związku z karty co potencjalnie przedłuża analizę i generuje dodatkowe koszty.

TDM z wykorzystaniem śliny jako matrycy

Alternatywną dla próbek krwi i osocza w przypadku TDM może być również ślina pacjenta. Do chwili obecnej, ślina jest wykorzystywana do diagnozy schorzeń, analizy stężeń leku we krwi lub osoczu oraz w badaniach metabolicznych [1]. Substancje czynne lub ich metabolity mogą przenikać do śliny poprzez bierną dyfuzję, transport aktywny lub pinocytozę.

Pobranie próbek odbywa się poprzez zebranie śliny bezpośrednio do próbki lub za pomocą bawełnianego lub polistyrenowego tamponu umieszczonego bezpośrednio przy policzku lub pod językiem przez określony czas. Niektóre metody obejmują możliwość stymulacji produkcji śliny poprzez np. użycie kwasu

cytrynowego lub delikatne żucie. Po zebraniu śliny za pomocą powyższych metod, próbki są odwirowywane [1,12,13]. Ślina jako matryca wykorzystywana jest również w metodzie DSS (ang. *dried saliva spot*), która polega na umieszczeniu próbki na specjalnie do tego przeznaczonej karcie, analogicznie jak w metodzie DBS. W tym przypadku możliwe jest zastosowanie materiału wskazującego położenie próbki poprzez zmianę barwy, jako że ślinę w porównaniu do krwi cechuje znacznie gorsza widoczność. Po zebraniu próbki na kartę, pozostawia się ją do wyschnięcia i przechowuje w temperaturze pokojowej. Następnie próbka jest ekstrahowana i przygotowana do analizy [1]. Sankovski i wsp. opracowali metodę pozwalającą na terapeutyczne monitorowanie stężeń teriflunomidu, będącego aktywnym metabolitem leflunomidu. W swoim badaniu wykorzystali próbki pobrane od 15 pacjentów przyjmujących 15-20 mg leflunomidu i dowiedli korelacji między stężeniami obserwowanymi w ślinie i osoczu pacjentów [12]. Użyteczność śliny w TDM potwierdzono również na przykładzie linezolidu. W swojej pracy Van Den Elsen i wsp. po 14 dniach leczenia linezolidem i moksyfloksacyną pobrali próbki śliny, osocza (moksyfloksacyna) i surowicy (linezolid) od pacjentów chorych na gruźlicę. Wykazali przy tym, że istnieje korelacja stężeń linezolidu w osoczu i ślinie [13].

Za klasycznym pobieraniem próbek śliny oraz metodą DSS przemawiają ich liczne zalety. Pobranie nie wymaga przzerwania ciągłości skóry, dzięki czemu może być przeprowadzona przez każdą odpowiednio przeszkoloną do tego osobę. Nieinwazyjność zwiększa również komfort i bezpieczeństwo dla pacjenta i personelu. Istnieje mniejsze ryzyko zakażenia, a ponadto można uniknąć infekcji w miejscu wkłucia. Wykorzystanie śliny jako matrycy może również zredukować koszt i przyspieszyć proces zbierania próbek. W przypadku DSS, próbka może zostać pobrana w domu co jest istotne np. w przypadku dzieci, osób niepełnosprawnych oraz osób cierpiących na zaburzenia lękowe. Niewątpliwą zaletą śliny jako matrycy, jest to, że stężenia leku w niej obserwowane odpowiadają stężeniu frakcji leku niezwiązanej z białkami w osoczu pacjenta co potencjalnie zwiększa dokładność oznaczeń [14].

Pomimo niewątpliwych zalet śliny jako matrycy w TDM, nie jest ona pozbawiona wad. Przydatność śliny jako matrycy wciąż nie została potwierdzona dla wielu leków, dla których wskazane jest monitoro-

wanie terapii. Należy tu wziąć pod uwagę, że stężenie obserwowane we krwi może różnić się od tego obserwowanego w próbce śliny [13]. W takim przypadku konieczne może być opracowanie współczynnika korekcyjnego, który wykorzystuje się do oszacowania stężeń leku we krwi na podstawie oznaczonych stężeń w ślinie. Wyznaczenie takich współczynników niweluje konieczność opracowania odrębnych zakresów terapeutycznych dla śliny. Jednak nie wszystkie leki przenikają do śliny w takim stopniu, by możliwe było ich oznaczenie lub skorelowanie stężeń występujących w ślinie ze stężeniami obserwowanymi we krwi żyłnej [13]. Dodatkowym utrudnieniem są także różnice w aktywności ślinianek między pacjentami oraz fakt, że skład wydzielanej śliny różni się między śliniankami. Należy tu także wziąć pod uwagę przypadki, gdy z powodu występujących jednostek chorobowych produkcja śliny może być niewystarczająca do pobrania próbki [1]. Niezwykle ważny jest ogólny stan zdrowia pacjenta, a jako przykład mogą posłużyć choroby przyzębia, które mogą doprowadzić do kontaminacji śliny krwią i tym samym znacznie zafałszować wynik analizy [12]. Skład śliny różni się również w zależności, czy pobrana została w wyniku biernego wydzielania, czy poprzez stymulację [15]. W przypadku DSS, w porównaniu do DBS, miejsce, w którym znajduje się próbka nie jest oczywiste, a zastosowanie substancji wskaźnikowych może wpłynąć na wynik analizy [1].

W przypadku digoksyny zaobserwowano znaczne różnice międzypersonalne dla współczynnika korekcyjnego ślina/osocze, co poddaje w wątpliwość skuteczne wykorzystanie śliny jako matrycy do oznaczeń tego leku. Podobny problem napotkali Van den Elsen i wsp., którzy w swojej pracy doszli do wniosku, że ślina nie jest matrycą odpowiednią do terapeutycznego monitorowania stężeń moksifloksacyny [13]. W celu przewidzenia możliwości zastosowania śliny jako matrycy do analizy leku opracowany został system SECS (ang. *The Salivary Excretion Classification System*). Dzieli on substancje na cztery klasy, opierając się na wchłanianości w przewodzie pokarmowym i wiązaniu z białkami. Klasa I i II według systemu SECS, słabo wiążąca się z białkami, jest wydzielana do śliny. III klasa skupia substancje o wysokim stopniu wiązania z białkami i wysoką przyswajalnością w układzie pokarmowym, które są podatne na wydzielanie do śliny. Klasa IV dotyczy substancji o wysokim stopniu wiązania z białkami i ograniczonym wchłanianiu w przewodzie pokarmowym, które w wątpliwym stopniu będą wydzielane do śliny [16].

Sucha kropla moczu DUS

Do metod opierających się na suchej kropli, oprócz DSS i DBS, należy również stosunkowo nowa metoda suchej kropli moczu (ang. *dried urine spot*, DUS). Procedura wygląda niemal identycznie jak w przypadku DBS i DSS. Próbkę moczu jest pobierana na przeznaczoną do tego kartę, następnie suszona i przechowywana w temperaturze pokojowej lub wysyłana do ośrodka, w którym będzie analizowana. Metoda suchej kropli moczu wykazuje te same zalety, opisane wcześniej dla DBS i DSS. Należą do nich przede wszystkim duża prostota zebrania próbki, brak konieczności angażowania przeszkolonego personelu. Nie bez znaczenia jest również większa stabilność próbek, co ponownie przekłada się na niższe koszty przechowywania i transportu. Materiał pobrany metodą DUS również może być wykorzystywany do badań genetycznych, co zaobserwowali Grignani i wsp. [17]. Micheli i wsp. dowiedli, że DUS może być wykorzystywane do analizy kilku różnych grup leków w badaniach przesiewowych, w tym: przeciwdepresyjnych, neuroleptycznych, benzodiazepin i opioidowych. W swoich badaniach zidentyfikowali 15 substancji czynnych z wykorzystaniem próbek DUS pobranych od szczurów [18]. Podobnie jak w przypadku poprzednich metod suchej kropli metoda DUS nie jest pozbawiona wad. Przede wszystkim niewielka objętość pobranej próbki jest zarówno zaletą jak i wadą, ponieważ może skutkować małą czułością metody [18]. Podczas analizy związku macierzystego należy również wziąć pod uwagę jego aktywne metabolity oraz fakt, że nie wszystkie substancje wydalane są drogą nerkową. W porównaniu do DBS i DSS pobranie próbki jest także bardziej kłopotliwe, ze względu na konieczność pobrania moczu do naczynia z którego następnie pobrany jest materiał na kartę. Zależnie od pory dnia zmieniają się właściwości fizykochemiczne moczu, co podobnie jak w przypadku hematokrytu dla DBS, może utrudniać analizę i oszacowanie wielkości pobranej próbki. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym wykorzystanie DUS w analizie leków jest możliwość zafałszowania wyników przez samego pacjenta.

Płyn mózgowo-rdzeniowy

W większości przypadków celem poszukiwań nowych matryc do TDM jest zwiększenie komfortu, bezpieczeństwa pacjenta oraz zmniejszenie kosztów i inwazyjności procedury pobrania próbek. Pobranie płynu mózgowo-rdzeniowego, pomimo dużej inwazyjności, pozwala na uzyskanie informacji kluczowych

dla TDM. Fakt ten wyjaśnia istnienie bariery krew-mózg, odpowiedzialnej za różnice między stężeniami leku obserwowanymi we krwi, a tymi występującymi w płynie mózgowo-rdzeniowym. Może prowadzić to do sytuacji, gdy obserwujemy pożądane stężenie leku we krwi, ale stężenia leku w płynie mózgowo-rdzeniowym są poniżej wartości terapeutycznej. Na przykład w czasie terapii wankomycyną, wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) jest identyczna dla surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego, a utrzymanie stężenia leku na tym poziomie jest również konieczne dla skuteczności terapii. Jednakże obserwowana duża zmienność międzypersoniczna dystrybucji wankomycyny do płynu mózgowo-rdzeniowego powoduje, że obserwowane w tej matrycy stężenia mogą być niższe od MIC, nawet pomimo relatywnie wysokich stężeń występujących we krwi pacjenta. W swojej pracy Mei i wsp. opracowali metodę UPLC-MS/MS, pozwalającą na analizę stężeń wankomycyny w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów, u których po zabiegu wystąpiły infekcje pooperacyjne. Użyteczność tej matrycy potwierdzono również do analizy leków przeciwwirusowych lub przeciwnowotworowych [19-21].

Krew pępowinowa

TDM odgrywa istotną rolę nie tylko w zapewnieniu bezpieczeństwa i skuteczności terapii, ale także w ocenie ryzyka narażenia na substancje czynne. W przypadku kobiet ciężarnych należy wziąć pod uwagę ekspozycję płodu na leki przyjmowane przez matkę. Szczególnym ryzykiem odznaczają się substancje czynne zdolne do pokonania bariery krew-łożysko i tym samym wywierające bezpośredni farmakologiczny wpływ na dziecko jeszcze w życiu płodowym. Znaczenie terapii monitorowanej rośnie w momencie gdy pacjentka nie ma możliwości odstawienia dotychczas przyjmowanych leków. Przykładem jest terapia karbamazepiną przez kobiety ciężarne, przy czym substancja ta wykazuje działanie teratogenne zależne od dawki [22]. W swojej pracy Kacirowa i wsp. zaobserwowali, że jednoczesne przyjmowanie kwasu walproinowego powodowało przyspieszenie przemiany karbamazepiny do jej aktywnego metabolitu w osoczu matki o około 80%, a we krwi pępowinowej o ponad 100% [23]. TDM we krwi pępowinowej może pozwolić więc na zebranie danych odnośnie narażenia płodu na leki przyjmowane w czasie ciąży i tym samym na późniejsze oszacowanie ryzyka ekspozycji na podstawie stężeń obserwowanych w osoczu matki. Wiedza na

temat tych zależności jest kluczowa również dlatego, że dla wielu leków stężenia we krwi pacjenta nie zawsze są skorelowane z dawką. Jako przykład mogą posłużyć badania dotyczące stężeń kwasu walproinowego. W przypadku terapii przeciwpadaczkowej u kobiet leczonych kwasem walproinowym zaobserwowano dużą zmienność międzypersoniczną między stężeniami obserwowanymi w osoczu w porównaniu do krwi pępowinowej. Zaobserwowano również zależność wagi i długości noworodków od stężeń leku w obydwu matrycach, lecz nie od dawki przyjmowanego leku [24]. Przydatność krwi pępowinowej jako matrycy w TDM, pozwalającej określić ryzyko narażenia została potwierdzona dla leków przeciwpadaczkowych, przeciwdepresyjnych i w terapii odstawienia substancji uzależniających [25-27]. Krew pępowinowa jako matryca nie jest jednak pozbawiona wad. Pomimo licznych informacji, które można uzyskać w trakcie analizy sama procedura jest niekomfortowa i inwazyjna dla pacjentki i musi być przeprowadzona przez odpowiednio wyszkolony personel. Co więcej istnieją doniesienia, że stężenia substancji czynnej we krwi pępowinowej zmieniają się zależnie od etapu ciąży, co poddaje w wątpliwość wyniki uzyskane z próbek pobranych np. tylko intrapartum. Ograniczeniem tej matrycy jest również fakt, że nie wszystkie substancje są w stanie pokonać barierę krew-łożysko i tym samym w ich przypadku nie jest możliwe wykorzystanie krwi pępowinowej do analizy stężeń we krwi matki, a jedynie potwierdzenie braku narażenia dziecka w życiu płodowym.

Pot

Pot znalazł zastosowanie w badaniach toksykologicznych oraz do oceny stosowania się pacjenta do zaordynowanego schematu leczenia. Głównymi zalecaniami potu jako matrycy są przede wszystkim komfort pobierania próbek oraz możliwość monitorowania terapii przez dłuższy okres. Próbkę potu mogą być pobierane za pomocą ściereczek, plastrów lub specjalnego urządzenia dającego możliwość stymulacji wydzielania potu (np. za pomocą pilokarpiny). W przypadku np. plastrów, mogą one być pozostawione na ciele pacjenta przez dłuższy okres czasu (np. przez 5-7 dni). Głównymi ograniczeniami są natomiast możliwa kontaminacja oraz zmienne stężenia leku w zależności od miejsca pobrania próbki [28]. W związku z różnicami pomiędzy stężeniami obserwowanymi w pocie i krwi, różne mogą być również zakresy terapeutyczne

dotyczące obydwu matryc. W takim przypadku korzystne będzie określenie współczynnika korekcyjnego, który pozwoli oszacować stężenia leku we krwi na podstawie oznaczonych stężeń w pocie. Dodatkowo niełatwe jest określenie dokładnej objętości pobranej próbki, co utrudnia wykorzystanie tej matrycy w analizie ilościowej. Problem ten starano się wyeliminować poprzez analizę zawartości składników mineralnych (sodu i potasu) jako wzorca wewnętrznego [29]. Co więcej substancje lipofilne mogą być magazynowane w tkance tłuszczowej a następnie uwalniane, co może potencjalnie fałszować wyniki analizy [30].

Brasier i wsp. opracowali metodę UPLC-MS oznaczania β -laktamów w próbkach potu i krwi pacjentów, u których zastosowano dożylną antybiotykoterapię. W swoich badaniach dowiedli, że pot jako matryca może zostać wykorzystany w nieinwazyjnej, prostej i szybkiej analizie w celu TDM imipenemu, cefepimu i flukloksacyliny. Autorzy przyznali jednak, że pot jako alternatywna matryca w TDM posiada znaczące wady [31]. Należy do nich przede wszystkim konieczność posiadania odpowiedniego urządzenia (ang. *Macroduct sweat collector*) umożliwiającego pobranie próbki oraz konieczność stymulowania gruczołów potowych pilokarpiną. Wadą metody był również długi czas pobrania, wynoszący 30 minut. Pilokarpina użyta do pobudzenia produkcji potu może potencjalnie wpływać na wyniki analizy. Co więcej niewielka objętość pobranej próbki może znacznie zmniejszyć czułość metody. Należy tu również wziąć pod uwagę, że próbki musiały być przechowywane w temperaturze -80°C co zwiększało koszty transportu i przechowywania. W porównaniu do DBS, DUS i DSS metoda nie jest odpowiednia do samodzielnego zbierania próbek przez pacjenta w domu. Autorzy zaznaczyli również, że należy wziąć pod uwagę stabilność analizowanych substancji termolabilnych w temperaturze ciała, jak to miało miejsce w przypadku cefepimu. Dodatkowo istnieje niewiele badań dotyczących wykorzystania potu jako matrycy w TDM. Przekłada się to na niewielką ilość już gotowych metod, które mogą być wykorzystane do analizy leków w TDM. Nie wszystkie substancje czynne będą również równie łatwo przenikać do potu, co może ograniczać jego zastosowanie jako matrycy. Ponadto właściwości fizykochemiczne potu, takie jak np. lepkość czy skład elektrolitów w nim zawartych mogą podlegać znacznym wahaniom w zależności od stanu, wieku, płci, jednostek chorobowych czy nawet substancji używanych do stymulacji jego wydzielania [32].

Włosy

Wszystkie omawiane do tej chwili matryce pozwalają na uzyskanie informacji na temat stanu pacjenta jedynie w chwili obecnej lub przez ograniczony do kilku tygodni okres czasu. Nie dostarczają natomiast informacji na temat tego jak do tej pory przebiegała terapia. W badaniach toksykologicznych do określenia długotrwałego ryzyka narażenia od dłuższego czasu wykorzystywano właśnie włosy. Biorąc pod uwagę fakt, że wzrost włosa jest do pewnego stopnia równomierny, każdy jego odcinek może odpowiadać innemu okresowi. Analiza poszczególnych fragmentów może pozwolić na uzyskanie historii narażenia lub terapii, zależnie od stabilności analizowanego związku lub długości włosa. Proces przygotowania takiej matrycy polega najczęściej na usunięciu zabrudzeń lub dezynfekcji włosa, podzieleniu go na fragmenty o odpowiedniej długości i zmieleniu [33]. Matryca ta jest szczególnie przydatna do analizy związków, które łatwo kumulują się we włosach oraz są odporne na czynniki takie jak temperatura i obecność wody. Należy tu wziąć pod uwagę sytuację gdy regularne i długotrwałe przyjmowanie leku jest kluczowe dla powodzenia terapii. Dotyczy to między innymi leków antyretrowirusowych, takich jak np. lamiwudyna, newirapina, zydowudyna [34]. Pomimo dużej ilości danych jakie można uzyskać poprzez analizę włosów, rozwiązanie to nie jest pozbawione wad. Główną przeszkodą jest oczywiście opracowanie metody pozwalającej na ekstrakcję pożądanego związku z próbki. Dodatkowo istnieje konieczność opracowania nowego zakresu terapeutycznego dotyczącego stężeń leku obserwowanego w próbce włosów. W swojej pracy Duval i wsp. wykazali, że mediana stężenia indinawiru we włosach 29 pacjentów wynosiła $15\ \mu\text{g/g}$, a w przypadku osocza $370\ \text{ng/ml}$ [35]. Sytuację komplikują czynniki zewnętrzne, na które narażone są włosy w życiu codziennym, takie jak wysokie temperatury, wilgoć i promieniowanie, które mogą powodować degradację badanego związku. Problemem jest również naturalnie występująca zmienność w pigmentacji włosa i stosowanie np. farb do włosów [36].

Łzy

Główną zaletą łez jako matrycy jest łatwość ich pobrania. W porównaniu do śliny lub potu istnieje również mniejsze ryzyko zanieczyszczenia lub zakażenia próbki. W TDM łzy znalazły zastosowanie jako alternatywa dla osocza, w analizie m.in. leków przeciwpadaczkowych. W swojej pracy Monaco

i wsp. zaobserwowali lepszą korelację stężeń frakcji leku niezwiązanego z białkami (karbamazepiny i fenobarbitalu) między łzami a osoczem i płynem mózgowo-rdzeniowym, niż w przypadku śliny [37]. Podobnym badaniom poddano pacjentów leczonych kwasem walproinowym, u których porównano stężenia leku w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym, ślinie i łzach. Zauważono lepszą korelację stężeń frakcji leku niezwiązanego z białkami między łzami a osoczem i płynem mózgowo-rdzeniowym niż w przypadku śliny [38]. Należy jednak wspomnieć o wadach łez jako potencjalnej matrycy. Przede wszystkim dużym wyzwaniem jest określenie potrzebnej objętości pobieranej próbki. Niewątpliwym utrudnieniem jest również brak opracowanych metod analitycznych dla wielu leków, które powinny być objęte TDM oraz brak wytycznych określających pobieranie i analizę próbek. Konieczne może być również określenie współczynnika korekcyjnego pozwalającego na oszacowanie stężeń leku we krwi na podstawie oznaczeń w łzach lub nowego zakresu stężeń terapeutycznych dla tej matrycy [37]. Nie można tu pominąć także różnic we właściwościach fizykochemicznych łez u pacjentów w zależności od wieku, występujących jednostek chorobowych lub pobierania próbek po wcześniejszym stymulowaniu wydzielania łez.

Dyskusja

Celem TDM jest przede wszystkim zwiększenie skuteczności farmakoterapii i jednoczesne ograniczenie wystąpienia działań niepożądanych z nią związanych. TDM jest coraz szerzej i częściej stosowane, zwłaszcza w przypadku terapii antybiotykami, lekami przeciwpadaczkowymi, lekami antyretrowirusowymi lub przeciwzakrzepowymi. Do dnia dzisiejszego zarówno krew, surowica, jak i osocze są głównymi matrycami wykorzystywanymi w terapii monitorowanej, co jest podyktowane szeroką wiedzą na temat pożądanego stężeń terapeutycznych i dużą ilością gotowych już metod analitycznych pozwalających na analizę stężeń substancji czynnej w tych matrycach. Ograniczeniem rutynowego TDM są wysokie koszty pobrania próbek i ich analizy, konieczność zaangażowania odpowiednio wyszkolonego personelu czy też dyskomfort pacjenta związany z pobraniem próbek.

W związku z tym poszukuje się nowych metod pobierania próbek, a także nowych matryc, które mogą posłużyć w TDM. Metody te skupiają się na zwiększeniu komfortu pacjenta, zmniejszeniu ilości

pobieranego materiału, redukcji kosztów, umożliwieniu zdalnego pobierania próbek oraz zwiększeniu stabilności pobieranego materiału i ułatwieniu jego transportu.

Na podstawie dokonanego przeglądu literatury wydaje się, że techniką, która w największym stopniu mogłaby zastąpić standardowe pobranie krwi żyłnej w celu TDM jest DBS. Przemawia za tym szybkość i bardziej komfortowa dla pacjenta procedura pobrania, również w warunkach domowych. Co ważne, próbki pobrane tą metodą wykazują się zwiększoną stabilnością, co przekłada się również na redukcję kosztów transportu. Ograniczeniem tej metody może być konieczność wyznaczenia współczynników korekcyjnych w przypadku różnic w stężeniach leku we krwi włosniczkowej i żyłnej. Jednak takie współczynniki są już dostępne dla m.in. powszechnie stosowanych w antybiotykoterapii gentamycyny i wankomycyny [4,5].

Matrycą alternatywną dla krwi może być ślina, w przypadku leków wydzielanych tą drogą. Jej pobranie jest stosunkowo proste, przy czym udowodniono dobrą korelację między stężeniami np. antybiotyków obserwowanymi we krwi i ślinie pacjentów [1,13,14,16]. Na uwagę zasługuje tu metoda DSS, która pozwala na jeszcze prostsze pobranie próbek i tak jak w przypadku DBS, zwiększenie ich stabilności oraz redukcję kosztów. Niestety pobranie śliny w porównaniu z krwią lub osoczem wiąże się ze znacznie większym ryzykiem kontaminacji. Dodatkowo skład śliny oraz jej ilość są obarczone dużą zmiennością międzyosobniczą, zależną od wieku, chorób współtowarzyszących czy nawet płci [39]. Może również zająć konieczność dodatkowej stymulacji produkcji śliny, co potencjalnie może wpłynąć na wynik analizy. Trudne jest również określenie ilości pobranej próbki oraz jej stosunkowo mała ilość, co przekłada się na ograniczenie wykorzystania śliny w analizie ilościowej oraz jej mniejszą czułość.

W przypadku moczu, matryca ta znajduje coraz szersze zastosowanie. Przykładem może być TDM leków przeciwgruźliczych, w miejscach, takich jak kraje afrykańskie, o ograniczonym dostępie do specjalistycznych laboratoriów [40]. W takich przypadkach wykorzystanie metody DUS wydaje się szczególnie korzystne, ze względu na łatwe pobranie próbki, a także jej zwiększoną stabilność. Jednakże próbki moczu uzyskane za pomocą DUS, tak jak w przypadku śliny, charakteryzują się większym ryzykiem kontaminacji. Co więcej w przypadku badań toksykologicznych pobranie

moczu pozwala na potencjalne zafałszowanie wyników przez samego pacjenta. Pobranie moczu metodą DUS rodzi również pewne wątpliwości dotyczące jej prostoty, jako że trzeba najpierw pobrać mocz pośrednio do naczynia a następnie przenieść próbkę na kartę, co jest bardziej skomplikowane niż w przypadku DBS czy DSS i wymaga nadzoru personelu medycznego.

Pozostałe omówione matryce, ze względu na swoje ograniczenia nie znajdują szerszego zastosowania, jednak wydają się być użyteczne w szczególnych sytuacjach. Pobranie płynu mózgowo-rdzeniowego jest inwazyjne ale w przypadku zakażeń grzybiczych ośrodkowego układu nerwowego, matryca ta jest bardziej użyteczna niż krew do TDM worykonazolu [41]. Łzy mogą być wykorzystane do monitorowania terapii lekami okulistycznymi stosowanymi miejscowo. Ponadto, dobra korelacja między stężeniami substancji czynnej obserwowanej w łzach i osoczu/krwi pozwala na wykorzystanie łez jako matrycy w TDM leków przeciwpadaczkowych [38]. Nie bez znaczenia jest fakt, że obserwowane w tej matrycy stężenia dotyczą tylko frakcji leku niezwiązanej z białkami. Jednak, łzy, tak jak ślina czy pot, są matrycą, której wykorzystanie w analizie ilościowej może być utrudnione przez ciężką do określenia ilość pobranej próbki. Brak jest również opracowanych metod analitycznych oraz wytycznych sposobu pobrania i analizy dla wielu leków, które powinny być objęte TDM. Należy również wziąć pod uwagę różnice we właściwościach fizykochemicznych łez u pacjentów w zależności od wieku, występujących jednostek chorobowych lub pobierania próbek po wcześniejszym stymulowaniu wydzielania łez.

W przypadku potu i włosów, wydaje się, że mogą być użyteczne do określenia przebiegu terapii w szerokim oknie czasowym [28]. Informacje uzyskane z analizy włosów są szczególnie przydatne w TDM, gdy regularne i długotrwałe przyjmowanie leku jest kluczowe dla powodzenia terapii, np. w terapii lekami antyretrowirusowymi [34,42]. Jednak badane substancje muszą naturalnie odkładać się we włosach oraz

być odporne na czynniki, na które włosy są narażone, takie jak wysokie temperatury, wilgoć i promieniowanie. Natomiast głównymi ograniczeniami stosowania potu w TDM jest możliwa kontaminacja oraz zmienne stężenia leku w zależności od miejsca pobrania próbki. Dodatkowo niełatwe jest określenie dokładnej objętości pobranej próbki, co utrudnia wykorzystanie tej matrycy w analizie ilościowej. Potrzebna jest także dokładna wiedza na temat właściwości badanego związku i tkanek w których jest on magazynowany, ponieważ substancje lipofilne mogą być magazynowane w tkance tłuszczowej a następnie uwalniane, co może doprowadzić do fałszywych wyników analizy [30].

Konkludując, opracowanie nowych metod pobierania próbek oraz poszukiwanie nowych matryc, jest wciąż bardzo ważnym i aktualnym zagadnieniem, umożliwiającym wprowadzenie i optymalizację TDM dla jak największej liczby leków. Najnowsze doniesienia w tym temacie, pozwalają na zauważenie dużego potencjału tych badań i ich niewątpliwego, gargantuicznego wpływu na farmakoterapię.

Badania te powinny być kontynuowane, zwłaszcza w kierunku walidacji odkrytych metod, zwiększania ich czułości i selektywności, tak by mogły być one wykorzystywane w codziennej praktyce klinicznej.

Konflikt interesów / Conflict of interest
Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address
✉ Marta Karaźniewicz-Łada
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego
w Poznaniu
ul. Rokietnicka 3, 60-806 Poznań
☎ (+48 61) 641 83 67
✉ mkaraz@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Han Y, Li XL, Zhang M, et al. Potential use of a dried saliva spot (DSS) in therapeutic drug monitoring and disease diagnosis. *J Pharm Anal.* 2022;12(6):815-23.
2. Moretti M, Freni F, Valentini B, et al. Determination of Antidepressants and Antipsychotics in Dried Blood Spots (DBSs) Collected from Post-Mortem Samples and Evaluation of the Stability over a Three-Month Period. *Molecules.* 2019;24(20):3636.
3. van der Elst KCM, Span LFR, van Hateren K, et al. Dried blood spot analysis suitable for therapeutic drug monitoring of voriconazole, fluconazole, and posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(10):4999-5004.

4. Anibaletto Dos Santos AL, Cezimbra Da Silva AC, Feltraco Lizot LDL, et al. Development and validation of an assay for the measurement of gentamicin concentrations in dried blood spots using UHPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;208:114448.
5. Scribel L, Zavascki AP, Matos D, et al. Vancomycin and creatinine determination in dried blood spots: Analytical validation and clinical assessment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020;1137:121897.
6. Kong ST, Lim SH, Chan E, et al. Estimation and comparison of carbamazepine population pharmacokinetics using dried blood spot and plasma concentrations from people with epilepsy: the clinical implication. *J Clin Pharmacol.* 2014;54(2):225–33.
7. Girardin F, Hearmon N, Negro F, et al. Increasing hepatitis C virus screening in people who inject drugs in Switzerland using rapid antibody saliva and dried blood spot testing: A cost-effectiveness analysis. *J Viral Hepat.* 2019;26(2):236–45.
8. Taieb F, Tram TH, Ho HT, et al. Evaluation of Two Techniques for Viral Load Monitoring Using Dried Blood Spot in Routine Practice in Vietnam (French National Agency for AIDS and Hepatitis Research 12338). *Open Forum Infect Dis.* 2016;3(3):ofw142.
9. Adam BW, Hall EM, Sternberg M, et al. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clin Biochem.* 2011;44(17-18):1445–50.
10. Mohammed BS, Cameron GA, Cameron L, et al. Can finger-prick sampling replace venous sampling to determine the pharmacokinetic profile of oral paracetamol? *Br J Clin Pharmacol.* 2010;70(1):52–6.
11. Fan L, Lee JA. Managing the effect of hematocrit on DBS analysis in a regulated environment. *Bioanalysis.* 2012;4(4):345–7.
12. Sankowski B, Michorowska S, Račkowska E, et al. Saliva as Blood Alternative in Therapeutic Monitoring of Teriflunomide—Development and Validation of the Novel Analytical Method. *IJMS.* 2022;23(17):9544.
13. Van Den Elsen SHJ, Akkerman OW, Jongedijk EM, et al. Therapeutic drug monitoring using saliva as matrix: an opportunity for linezolid, but challenge for moxifloxacin. *Eur Respir J.* 2020;55(5):1901903.
14. Danhof M, Breimer DD. Therapeutic Drug Monitoring in Saliva. *Clin Pharmacokinet.* 1978;3(1):39–57.
15. Burlage FR, Pijpe J, Coppes RP, et al. Variability of flow rate when collecting stimulated human parotid saliva. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(5):386–90.
16. Idkaidek N, Arafat T. Saliva versus plasma pharmacokinetics: theory and application of a salivary excretion classification system. *Mol Pharm.* 2012;9(8):2358–63.
17. Grignani P, Manfredi A, Monti MC, et al. Genetic individual identification from dried urine spots: A complementary tool to drug monitoring and anti-doping testing. *Drug Test Anal.* 2022;14(7):1234–43.
18. Michely JA, Meyer MR, Maurer HH. Dried urine spots – A novel sampling technique for comprehensive LC-MSn drug screening. *Anal Chim Acta.* 2017;982:112–21.
19. Mei S, Wang J, Zhu L, et al. A UPLC-MS/MS method for analysis of vancomycin in human cerebrospinal fluid and comparison with the chemiluminescence immunoassay. *Biomed Chromatogr.* 2017;31(8).
20. Calcagno A, Pinnetti C, De Nicolò A, et al. Cerebrospinal fluid abacavir concentrations in HIV-positive patients following once-daily administration. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(6):1380–3.
21. Wang W, Zheng X, Wang H, et al. Development of an UPLC-MS/MS method for quantification of Avitinib (AC0010) and its five metabolites in human cerebrospinal fluid: Application to a study of the blood-brain barrier penetration rate of non-small cell lung cancer patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;139:205–14.
22. Tomson T, Battino D, Perucca E. Teratogenicity of antiepileptic drugs. *Curr Opin Neurol.* 2019;32(2):246–52.
23. Kacirova I, Grundmann M, Brozmanova H. Concentrations of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in maternal and umbilical cord blood at birth: Influence of co-administration of valproic acid or enzyme-inducing antiepileptic drugs. *Epilepsy Res.* 2016;122:84–90.
24. Kacirova I, Grundmann M, Brozmanova H. Serum levels of valproic acid during delivery in mothers and in umbilical cord – correlation with birth length and weight. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015;159(4):569–75.
25. Paulzen M, Schoretsanitis G, Gründer G, et al. Pregnancy exposure to venlafaxine—Therapeutic drug monitoring in maternal blood, amniotic fluid and umbilical cord blood and obstetrical outcomes. *J Affect Disord.* 2020;266:578–84.
26. Concheiro M, Jones HE, Johnson RE, et al. Umbilical Cord Monitoring of In Utero Drug Exposure to Buprenorphine and Correlation with Maternal Dose and Neonatal Outcomes. *J Anal Toxicol.* 2010;34(8):498–505.
27. Okoye NC, McMillin GA. Patterns of Neonatal Co-Exposure to Gabapentin and Commonly Abused Drugs Observed in Umbilical Cord Tissue. *J Anal Toxicol.* 2021;45(5):506–12.
28. Kintz P, Tracqui A, Jamey C, et al. Detection of Codeine and Phenobarbital in Sweat Collected with a Sweat Patch. *J Anal Toxicol.* 1996;20(3):197–201.
29. Appenzeller BMR, Schummer C, Rodrigues SB, et al. Determination of the volume of sweat accumulated in a sweat-patch using sodium and potassium as internal reference. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;852(1-2):333–7.
30. Fucci N, De Giovanni N, Pascali VL. The sweat matrix: a new perspective for drugs analysis. *Skin Res Technol.* 2015;21(1):129–30.
31. Brasier N, Widmer A, Osthoff M, et al. Non-invasive Drug Monitoring of β -Lactam Antibiotics Using Sweat Analysis—A Pilot Study. *Front Med.* 2020;7:476.
32. Baker LB. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin).* 2019;6(3):211–9.

33. Míguez-Framil M, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera P, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of opiates and cocaine in human hair. *Anal Chim Acta*. 2011;704(1-2):123-32.
34. Wu Y, Yang J, Duan C, et al. Simultaneous determination of antiretroviral drugs in human hair with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018;1083:209-21.
35. Duval X, Peytavin G, Breton G, et al. Hair versus plasma concentrations as indicator of indinavir exposure in HIV-1-infected patients treated with indinavir/ritonavir combination. *AIDS*. 2007;21(1):106-8.
36. Yu H, Jang WJ, Jang JH, et al. Role of hair pigmentation in drug incorporation into hair. *Forensic Sci International*. 2017;281:171-5.
37. Monaco F, Mutani R, Mastropaolo C, et al. Tears as the best practical indicator of the unbound fraction of an anticonvulsant drug. *Epilepsia*. 1979;20(6):705-10.
38. Monaco F, Piredda S, Mutani R, et al. The free fraction of valproic acid in tears, saliva, and cerebrospinal fluid. *Epilepsia*. 1982;23(1):23-6.
39. Almukainzi M. Saliva Sampling in Therapeutic Drug Monitoring and Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Review. *Drug Res (Stuttg)*. 2023;73(02):65-9.
40. Zentner I, Modongo C, Zetola NM, et al. Urine colorimetry for therapeutic drug monitoring of pyrazinamide during tuberculosis treatment. *Int J Infect Dis*. 2018;68:18-23.
41. Palmisani E, Barco S, Cangemi G, et al. Need of voriconazole high dosages, with documented cerebrospinal fluid penetration, for treatment of cerebral aspergillosis in a 6-month-old leukaemic girl. *J Chemother*. 2017;29(1):42-4.
42. Shah SAB, Mullin R, Jones G, et al. Simultaneous analysis of antiretroviral drugs abacavir and tenofovir in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;74:308-13.