

Stanovení léků a návykových látek

Petr Breinek

TDM

terapeutické monitorování lékových hladin

- Soubor činností, jejichž cílem je **optimalizovat a individualizovat** další dávky léku
- Součástí TDM je:
 - **Stanovení koncentrace léčiva** (příp. jeho metabolitu) v krevním vzorku, odebraného v definovaném časovém intervalu
 - **Interpretace** výsledku

Proč se u některých léků stanovuje jejich koncentrace?

- Hrozí jejich **toxický účinek** při předávkování
- **Některé mají** úzké terapeutické rozmezí
(Rozmezí mezi nejnižší koncentrací léku, při které se objevuje jeho účinek a nejvyšší koncentrací, při které se ještě neobjevuje toxický účinek léku)
- **Lékař pozoruje nedostatečný účinek**
- **Je potřeba kontrolovat terapii**
- **Je podezření, že pacient léky neužívá**

Obvykle monitorované léky

- **Imunosupresiva** (cyklosporin, takrolimus, sirolimus, mykofenolát)
- **Antiepileptika** (karbamazepin, fenytoin, kyselina valproová, fenobarbital)
- **Antibiotika** (gentamicin, vancomycin)
- **Bronchodilancia** (teofylin)
- **Kardiotonika** (digoxin)
- **Cytostatika** (metotrexát, busulfan)

V některých případech se stanovují i **metabolity** léků.

Analyzovaný materiál

- Plazma
- Sérum
- Krev
- Moč
- Sliny
- Mozkomíšní mok
- Žluč nebo peritoneální tekutina

Odběr vzorku

- V ustáleném stavu (steady state)
- Před další dávkou („through“)
- Kdykoli („random“)
- Před a po podání („peak“)

Doba odběru musí být u každého léku určena

+ informace o pacientovi:

renální funkce, čas podání, dávka

Farmakologie a laboratoř

1. Klinická farmakologie

odběr

čas odběru

interpretace výsledku

konzultační činnost

hlášení podezření na nežádoucí účinek

léku

2. Klinická biochemie

preanalytická fáze

stanovení

terapeutické rozmezí

v případě nedostupnosti klinického

farmakologa další činnosti

Léky jsou metabolizovány

- U stanovovaných léků je jejich metabolismus znám
- Přibližně u 20% osob probíhá odbourávání léčiv **jinou rychlostí**, než u většiny osob
→ vzniká problém při stanovení dávky léku

Co ovlivňuje hladinu léku ve stanovovaném vzorku krve?

Původní látka

Vstřebávání (absorpce, distribuce)

Metabolismus (biotransformace)

Vylučování (močí, stolicí, dechem, potem)

Farmakokinetika

studuje působení organismu na lék

- změny koncentrace léku v těle
- časový průběh koncentrací léku v plasmě

Farmakodynamika

studuje působení léku na organismus
(orgány, tkáně, receptory)

- doba účinku
- stimulace
- deprese
- ovlivnění metabolismu

„Rychlí metabolizátoři“

Přeměna léku probíhá rychleji:

- nedosáhne se terapeutické rozmezí
- účinek léku se neprojevuje

- tato situace není tak nebezpečná: lékař zvýší dávkování léku

„Pomalí metabolizátoři“

Přeměna léku probíhá pomaleji:

- množství léku v krvi přesahuje terapeutické rozmezí, i když užívá doporučené dávky
- často dochází k toxickým projevům až k poškození organismu
- závažnější stav

Co to způsobuje?

- dlouhou dobu se to nevědělo:
lék se vysadil nebo změnil
- u pomalých metabolizátorů je to často
zapříčiněno **geneticky**:
vrozené „chybění“ nebo změněná funkce
některého **enzymu** (např. cytochrom P450
se podílí na metabolismu asi 30%
používaných léků)

Farmakogenetika a farmakogenomika

Studují individuální genetický vliv na farmakokinetiku a farmakodynamiku

- Velká interindividuální variabilita
- Cílem je individualizace volby léku a jeho dávkování

Současná praxe

- Sleduje se koncentrace léku v krvi
- Pacient musí chodit na kontroly (odběry krve)
- V případě problémů se upraví dávkování, či změní lék..

Budoucnost

Začíná se sledovat:

- buď vrozené chybění
- nebo změněná forma příslušného enzymu (vedoucí k pomalé přeměně léku v organismu)

Metody stanovení

1. Chromatografické metody

HPLC

HPLC/MS

LC/MS

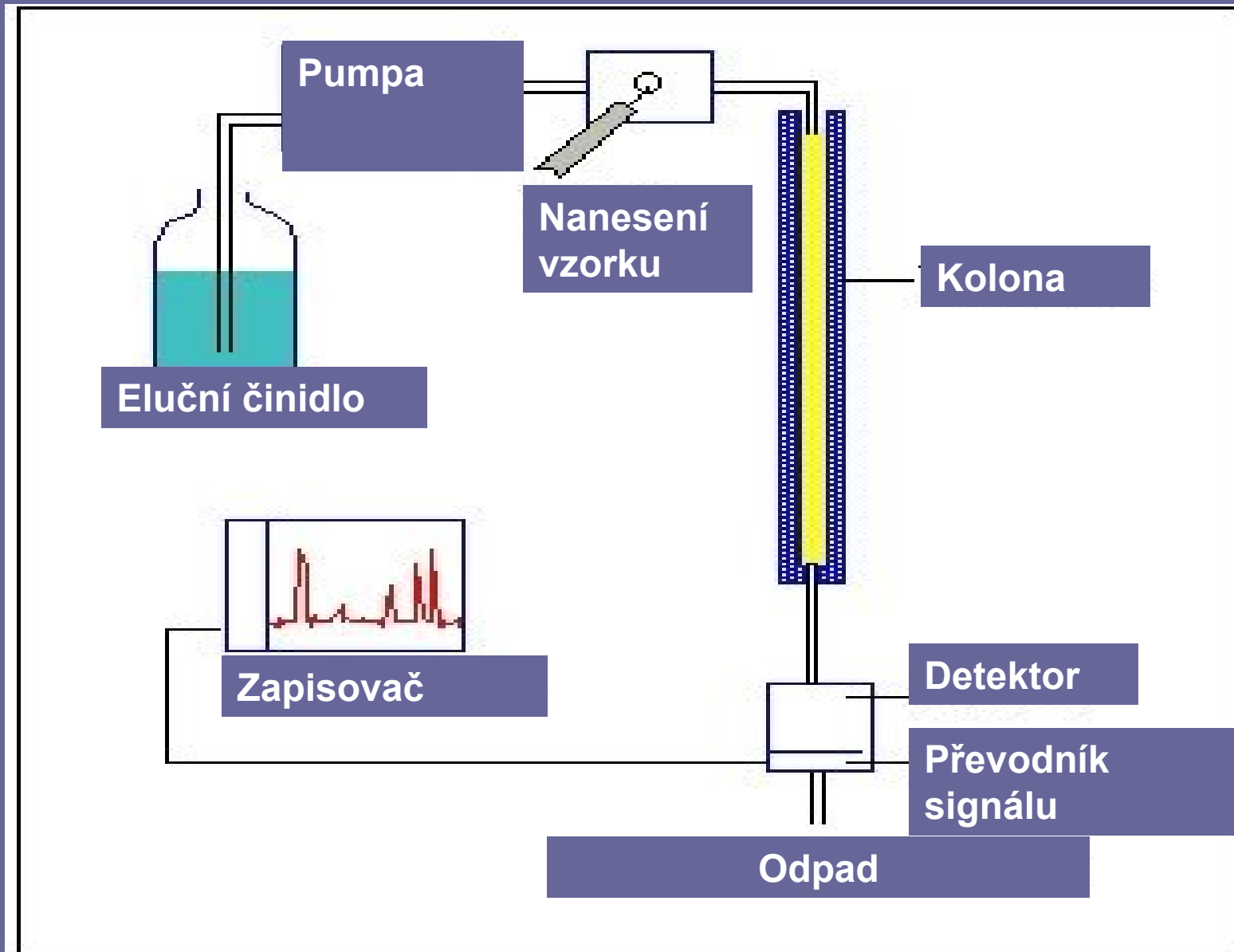
GC/MS

TLC

Techniky úpravy vzorků:

- Extrakce kapalinou
- Extrakce pevnou látkou (SPE)
- Ultrafiltrace
- Derivatizace
- Extrakce plynem (headspace)
- Adsorpce
- Vymrazování

HPLC – jednoduché schéma



HPLC



GC-TRACE GC MS – POLARISQ (Finnigan)



2. Imunoanalytické metody

a) fluorescenční imunoanalýza (FIA, FPIA, DELFIA)

b) enzymová imunoanalýza (EMIT, ELISA, MEIA, CEDIA)

c) luminiscenční imunoanalýza (LIA, ILMA, CMIA, ECLIA, ...)

3. Metody pro odhalování genetického polymorfismu v metabolismu léčiv

Lze stanovit:

- a) Fenotyp (rychlost transformace)
- b) Genotyp (analýza DNA, DNA čipy)

Standardizace

Zkouška	Referenční metoda	CRM	Doporučené metody
Digoxin	ID-MS		FPIA, EIA, LIA
Teofylin	ID-MS		FPIA, EIA, LIA, HPLC
Fenytoin		SRM 900	FPIA, EIA, LIA, HPLC
Karbamazepin		SRM 1599	FPIA, EIA, LIA, HPLC
Kyselina valproová		SRM 1599	FPIA, EIA, LIA, HPLC

Jaká je povolená chyba v EHK?

Lék	TMU (SEKK 2011)	Lék	TMU (SEKK 2011)
Digoxin	24%	Amikacin	30%
Teofylin	27%	Gentamicin	30%
Primidon	24%	Vankomycin	24%
Fenobarbital	24%	Metotrexát	30%
Fenytoin	24%		
Karbamazepin	24%	Lithium	12%
Etosuximid	24%		
Kyselina valproová	24%		

Terapeutické hladiny (příklady)

Lék	Terapeutická hladina	Lék	Terapeutická hladina
Digoxin	0,5-1,0 µg/l	Amikacin	
Teofylin	8,0-20,0 mg/l	Gentamicin	10,4-20,9 µmol/l
Primidon	5,0-12,0 mg/l	Vankomycin	
Fenobarbital		Metotrexát	
Fenytoin	10,0-20,0 mg/l		
Karbamazepin	4,0-10,0 mg/l	Lithium	0,5-1,2 mmol/l
Etosuximid			
Kyselina valproová	50,0-100,0 mg/l		

CYKLOSPORIN A MYKOFENOLOVÁ KYSELINA

- Imunosupresiva
- Odběr: nesrážlivá krev (EDTA)
- Referenční meze: podle doby po transplantaci a druhu transplantace
- Cy A: cyklický polypeptid
- MPA: aktivní část z léčiva mofetil

DIGOXIN

- Odběr: srážlivá krev
před podáním nebo 6-11 h po podání
- Referenční meze: 0,5-1,2 ug/l
- Srdeční glykosid, je indikován při srdečním selhávání
- DLIF (digoxin-like immunoreactive factor)
- DLIS (digoxin-like immunoreactive substance)

TACROLIMUS

- Imunosupresivum, FK 506
- obchodní název PROGRAF®
- objev (1984): extrakt z houby (Streptomyces tsukubaensis) japonská farmaceutická firma Fujisawa (kódové č. FK 506)
- přispívá významnou měrou k dosažení současného stupně rozvoje **transplantace** orgánů a buněk, používá se také při léčbě závažných autoimunitních onemocnění

- je 10x až 100x účinnější ve srovnání s cyklosporinem
- působí inhibičně v časně fázi aktivačního procesu T lymfocytů
- metabolizuje se v mikrosomech jaterních buněk (cytochrom P450)
- existují i závažné nežádoucí účinky (hypertenze, nefrotoxicita, neuropatie, hepatopatie, hyperlipoproteinemie)
- z toho vyplývá nutnost laboratorního monitorování lékové terapie (TDM)

Analyzovaný materiál

- pouze krev (EDTA)

- stabilita

+2 až +8 C14 dní

≤ -70 C 2 měsíce

koncentrace v krvi je průměrně 35x vyšší
(12-67x) než v plazmě

CYKLOSPORIN A MYKOFENOLOVÁ KYSELINA

- Imunosupresiva
- Odběr: nesrážlivá krev (EDTA)
- Referenční meze: podle doby po transplantaci a druhu transplantace
- Cy A: cyklický polypeptid
- MPA: aktivní část z léčiva mofetil

DIGOXIN

- Odběr: srážlivá krev
před podáním nebo 6-11 h po podání
- Referenční meze: 0,5-1,2 ug/l
- Srdeční glykosid, je používán při terapii srdečního selhání a srdečních arytmií
- DLIF (digoxin-like immunoreactive factor)
- DLIS (digoxin-like immunoreactive substance)

LITHIUM

- Odběr: srážlivá krev
10-18h po podáním
- Udržování terapeutické hladiny nebo určení intoxikace Li
- Terapeutická hladina: 0,5-1,2mmol/l
- Použití Li: léčba bipolárních chorob (duševní poruchy s cykly deprese a mánie) - profylaxe maniodepresivního onemocnění
- Stanovení: nejčastěji PES (plamenová emisní spektrometrie)

KYSELINA VALPROOVÁ

- Odběr: srážlivá krev
před podáním
- Terapeutická hladina: 50,0-100,0 mg/l
- Antiepileptikum (součást léků pro léčbu epilepsie),
někdy používaná k léčbě migrény a bipolárních chorob)

FENYTOIN

- Odběr: srážlivá krev
- Terapeutická hladina: 10,0-20,0 mg/l;
volný fenytoin 1,0-2,0 mg/l (8-14%)
- Antiepileptikum ze skupiny hydantoinů (5,5-difenylyhydantoin); lék pro léčbu epilepsie; aktivní je jen volný fenytoin (většina je vázána v krvi na bílkoviny- část neaktivní)

Toxikologie a návykové drogy

Drogový screening

= detekce přítomnosti povolených i nepovolených návykových látek v biologickém materiálu (moč, vlasy, sliny, krev, pot)

Důvody:

- Klinické
- Léčebné
- Soudní
- Sportovní testování

Jak je vyšetření prováděno?

Požadavek zní : je droga přítomna?

- ✓ První vyšetření je screeningové (nespecifické!)
- ✓ V některých případech následuje potvrzení (konfirmasi)

Vyšetřované skupiny návykových látek

- Amfetaminy
- Benzodiazepiny
- Kanabinoidy
- Kokain
- Opiáty

(Psilocin a psilocybin - halucinogenní houby)

Fencylidin (CP)

LSD

Zákon 167/1998 Sb. O návykových látkách;
Seznam omamných a psychotropních látek

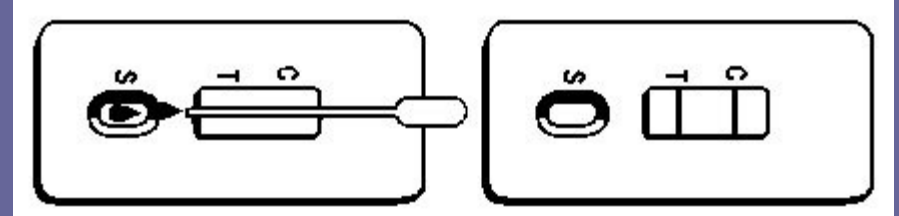
Příklad testu na drogy



DynexTest®SalivaScreen

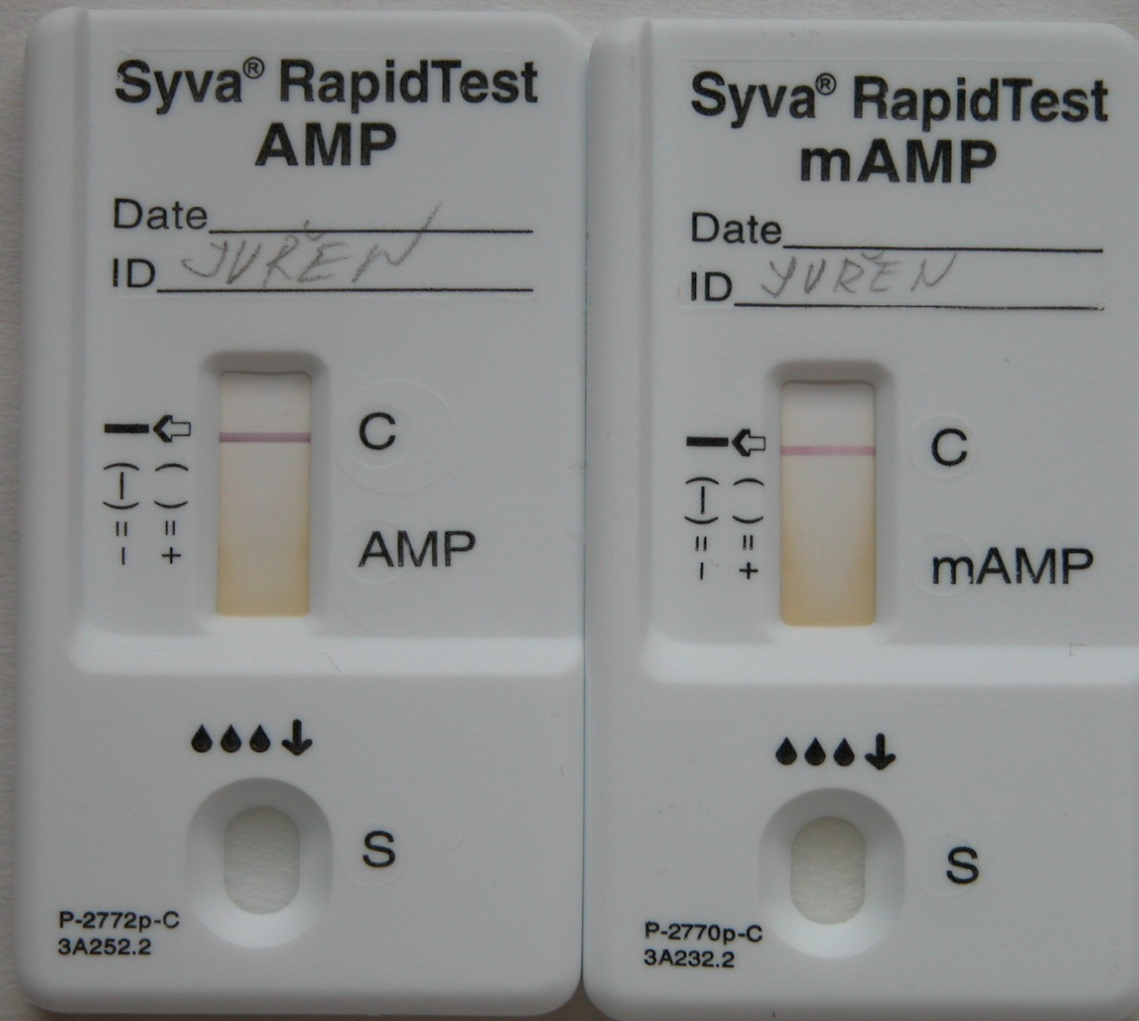
- Nanesení vzorku
- Odečíst výsledek po 10min
- Negativní výsledek: 2 proužky
- Pozitivní výsledek: 1 proužek v kontrolní oblasti

1. Amfetamin
2. Metamfetamin (pervitin)
3. THC (marihuana)
4. Opiáty (morfin/heroin)
5. kokain



Jiný příklad:

Kazetový test Syva® RapidTest (pozitivní na amfetaminy)



Alkohol (etanol)

- Plynová chromatografie (GC)
- Widmarkova zkouška
- Enzymové metody
- Imunoanalytické metody

Widmarkova zkouška

nespecifická - volumetrické stanovení všech redukujících látek založené na jodometrické oxidačně-redukční titraci:



Enzymové stanovení etanolu

Oxidace etanolu pomocí alkoholdehydrogenázy



Etanol

Acetaldehyd

Amfetaminy

- Metamfetamin (Pervitin)
 - Amfetamin
 - Methylenedioxyamfetamin (MDMA, Extáze)
 - Efedrin
 - Fenmetrazin, Fentermin
-
- Cut-off: 1000 ng/ml
 - Doba záchytu v moči: MA a metabolity 3 až 5d po ukončení aplikace
 - Potvrzení pozitivních výsledků – GC/MS

Benzodiazepiny (BZD)

- Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam, atd.
- Cut-off: 300 ng/ml (↓)
- Doba záchytu v moči: 1 až 7d
- Potvrzení pozitivních výsledků – GC/MS (?)

Kanabinoidy (obsažené v marihuaně)

- delta-9-tetrahydrokannabinol (THC)
 - Cannabinol (CAN)
 - Cannabidiol (THC-COOH)
-
- Cut-off: 50 ng/ml
 - Doba záchytu v moči: 1 až 3d po jednorázové dávce;
až 30d u chronických uživatelů
 - Potvrzení pozitivních výsledků – GC/MS
(ve vlasech 2 až 3 měsíce)

Kokain

■ Kokain

■ Crack (volá báze kokainu)

- Cut-off: 300 ng/ml
- Doba záchytu v moči: 3 až 6h; 24-6h metabolity;
až 5d u chronických uživatelů
- Potvrzení pozitivních výsledků – GC/MS

Opiáty

- Morfin
 - Heroin (diacetylmorfin)
 - Braun (hydrokodon)
 - Kodein
 - Ethylmorfin
 - Dihydrokodein, ...
-
- Cut-off: 300 ng/ml (morfin)
 - Doba záchytu v moči: až 3d po poslední dávce
 - Potvrzení pozitivních výsledků – GC/MS

Metody stanovení

1. Chromatografické metody

HPLC

HPLC/MS

LC/MS

GC/MS

TLC

2. Imunoanalytické metody

a) fluorescenční imunoanalýza (FIA, FPIA, DELFIA)

b) enzymová imunoanalýza (EMIT, ELISA, MEIA, CEDIA)

c) luminiscenční imunoanalýza (LIA, ILMA, CMIA, ECLIA, ...)