

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

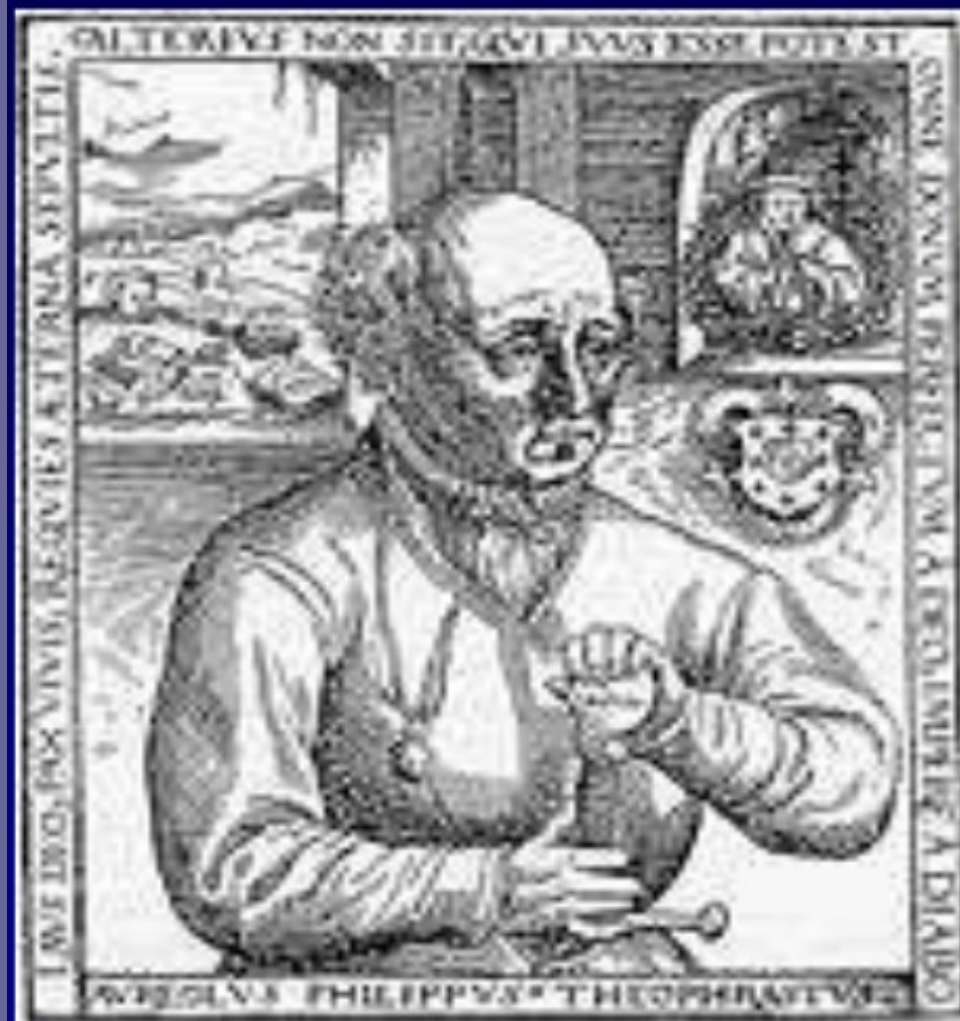
Dávka a typ látky jsou klíčové



“Každá látka může být jedem, závisí jenom na dávce”

Paracelsus

(1493-1541)



Proč se u některých léků stanovuje jejich koncentrace?

- Hrozí jejich toxický účinek při předávkování např. nefrotoxicita, ototoxicita
- **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**

Kdy stanovení koncentrace léku není indikováno

Účinek léku je stanovován jinak, např.:

- Warfarin (Quick INR,..)
- Inzulin (glukóza)
- Antihypertenziva (krevní tlak)

Obvykle monitorované léky

- **Imunosupresiva** (cyklosporin, takrolimus, sirolimus, mykofenolát,...)
- **Antiepileptika** (karbamazepin, fenytoin, kyselina valproová, fenobarbital,...)
- **Antibiotika** (gentamicin, vancomycin, amikacin,...)
- **Bronchodilancia** (teofylin)
- **Kardiotonika** (digoxin)
- **Antiarytmika** (amiodaron, chinidin,..)
- **Cytostatika** (metotrexát, busulfan)
- **Psychofarmaka** (Li,...)
- 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“) - např. digoxin
- **Kdykoli** („random“) - např. fenytoin
- **Před podáním** - např. karbamazepin, sirolimus, valproát
- **Po podání** („peak“) - např. metotrexát, Li
- **Před a po podání** -např. cyklosporin, vankomycin,

Doba odběru musí být u každého léku určena
+ informace o pacientovi: renální funkce, čas podání, dávka

Farmakokinetika

- studuje působení organismu na lék
- nauka no osudech léku v organismu

(změny koncentrace léku v těle, časový průběh koncentrací léku v plasmě, odhad a porovnání předpokládané koncentrace léku s koncentrací naměřenou → lze upravit dávku, ...)

Farmakodynamika

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

- doba účinku
- stimulace
- deprese
- ovlivnění metabolismu

Farmakogenetika a farmakogenomika

Studují individuální genetický vliv na farmakokinetiku a farmakodynamiku (existuje velká interindividuální variabilita)

- Cílem je individualizace volby léku a jeho dávkování

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

„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)

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)
- individualizace volby léku a jeho dávkování

AmpliChip

- Genotypizace CYP2D6 a CYP2C19
- první komerčně dostupný mikroanalytický farmakogenetický test určený pro diagnostiku
- certifikace pro využití v EU i USA





1. Chromatografické metody

HPLC

HPLC/MS

LC/MS

GC/MS

TLC (screening)

Antidopingová laboratoř pro Olympijské hry v Londýně 2012

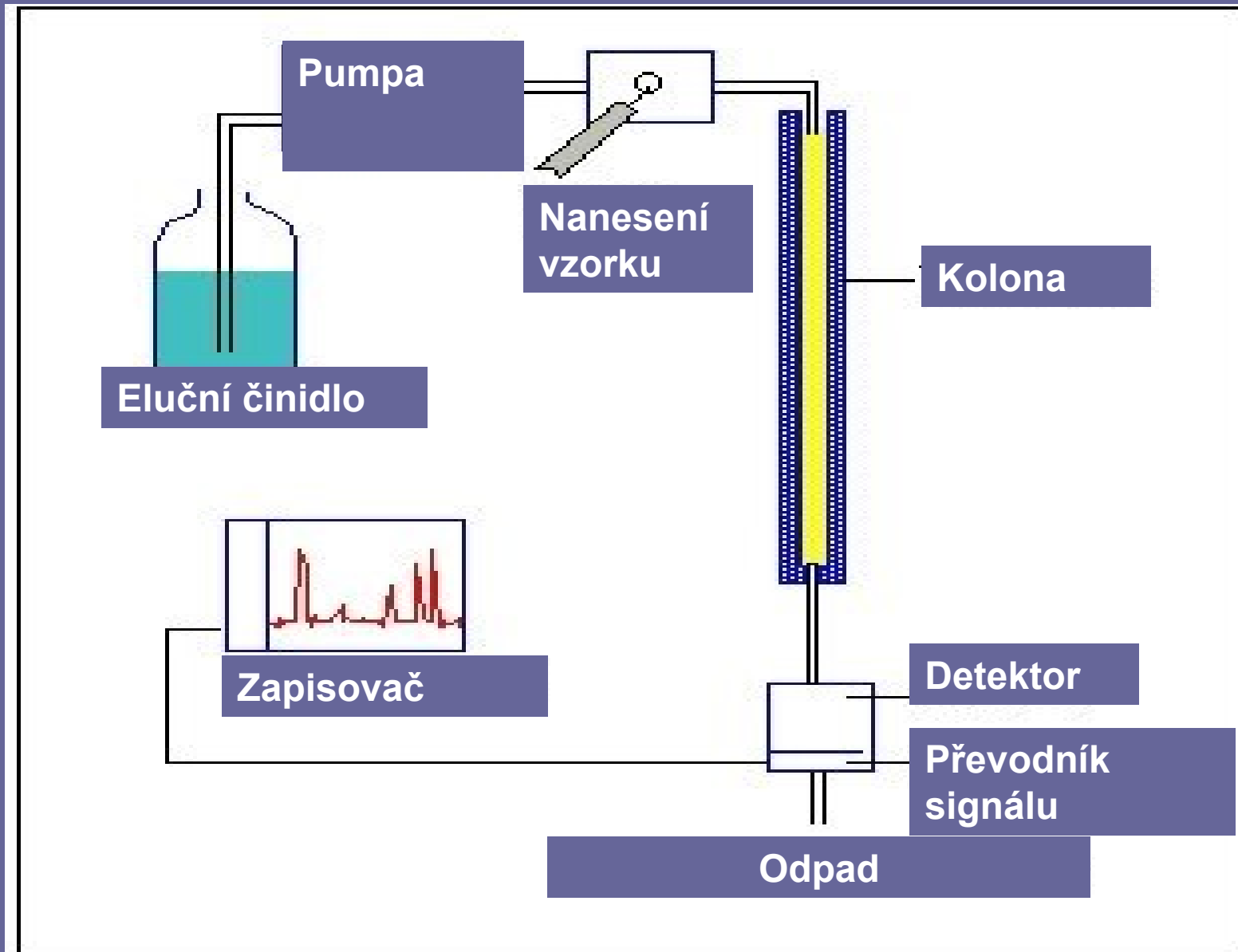


Techniky úpravy vzorků

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



HPLC – jednoduché schéma



HPLC/MS



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)

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

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)

THEOFYLIN

- Odběr: srážlivá i nesrážlivá krev
- Terapeutická hladina: 8,0-20,0 mg/l
- Metylxantinový derivát
- Bronchodilatační působení
- U novorozenců a některých dospělých metabolizován na kofein

Toxikologie a návykové drogy



Alkohol (etanol)

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

1‰ v krvi = dávka 1g/kg hmotnosti

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

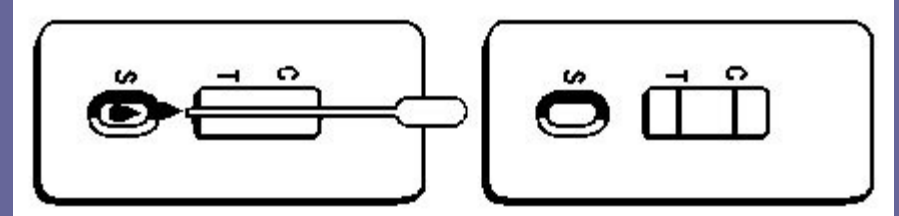
Příklad testu na drogy



DynexTest®SalivaScreen

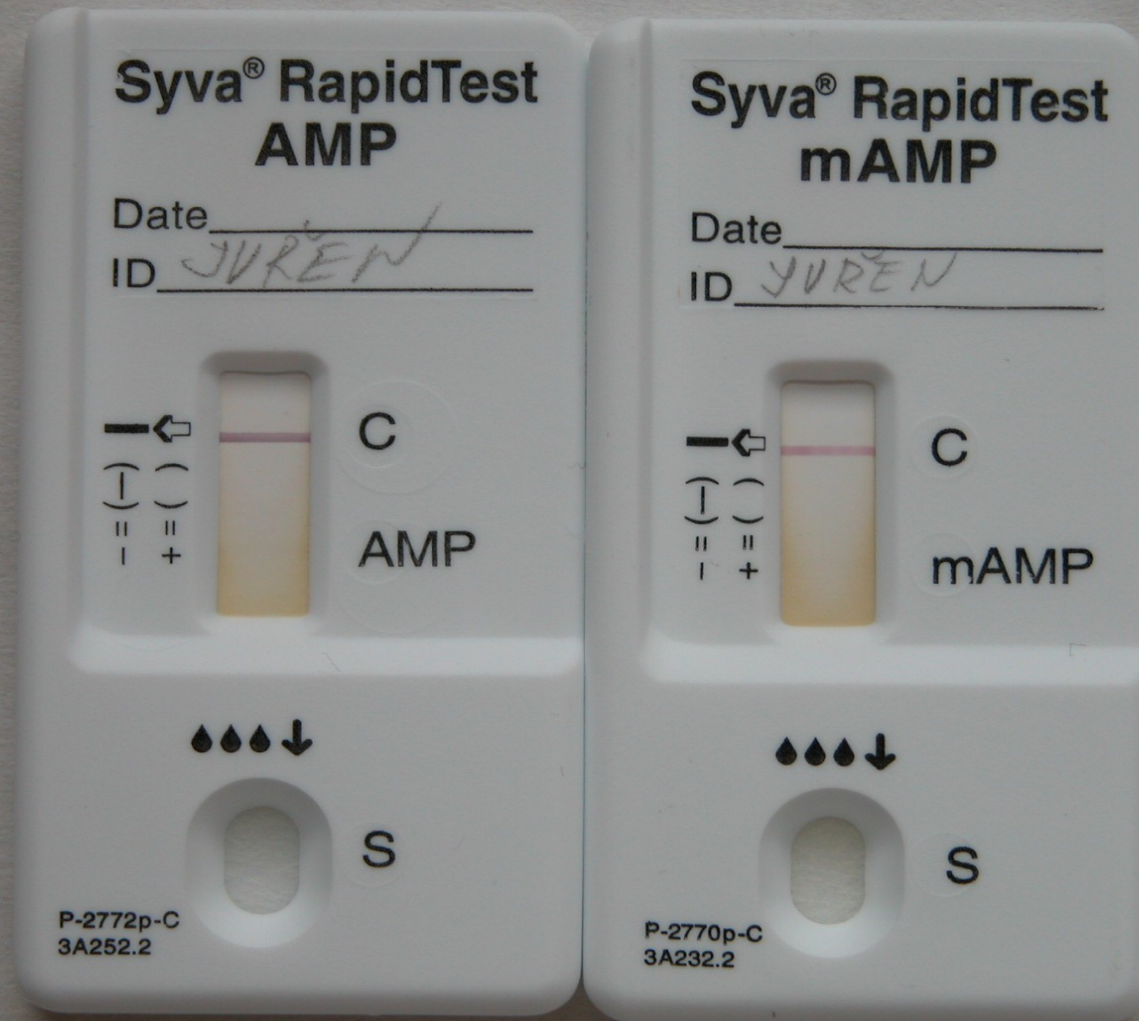
- Nanesení vzorku
- Odečíst výsledek po 10min
- Negativní výsledek: 2 proužky
- Pozitivní výsledek: 1 proužek v kontrolní oblasti

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



Jiný příklad:

Kazetový test Syva® RapidTest (pozitivní na amfetaminy)



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, ...)