



Léky, Drogy

Mgr. Zuzana Stražilová

Laboratorní diagnostika

Léky



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)
- Nelineární farmakokinetika
- Lékař pozoruje nedostatečný účinek
- Zahájení, změna, kontrola terapie
- Je podezření, že pacient léky neužívá
- Porucha fce ledvin, jater (podílí se na metabolismu a eliminaci léku)
- Podezření na lékové interference
- velká inter- a intraindividuální variabilita léčiv (Cyklosporin A)

TDM (Therapeutic Drug Monitoring)

terapeutické monitorování lékových hladin

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

TDM

- *Interdisciplinární charakter !!!*

Ošetřující lékař:
vedení léčby pacienta

Účinná mezioborová spolupráce

Klinická farmakologie:
interpretace a výpočet
farmakokinetických
parametrů

Klinická biochemie:
stanovení koncentrace
léčiva v biologickém
materiálu

TDM

- → cyklus stanovení koncentrace léčiva v biologickém materiálu, provedení farmakokinetické analýzy a interpretace nálezu, návrhu vhodného dávkovacího schématu, jeho aplikace a opakovaného stanovení koncentrace léčiva
 - TDM tedy NENÍ jen samotné stanovení koncentrace léčiva v biologickém materiálu a k interpretaci nestačí pouhá číselná hodnota nebo srovnání číselných hodnot několika laboratorních vyšetření
 - Cílem je farmakokinetická analýza, tj. určení dávkovacího režimu vhodného pro dosažení terapeutických koncentrací léčiv pomocí matematického zpracování laboratorních výsledků a výpočtu individuálních farmakokinetických parametrů konkrétního pacienta
- ⇒ **bezpečnější, účinnější a efektivnější léčba**

Kdy stanovení koncentrace léku není indikováno

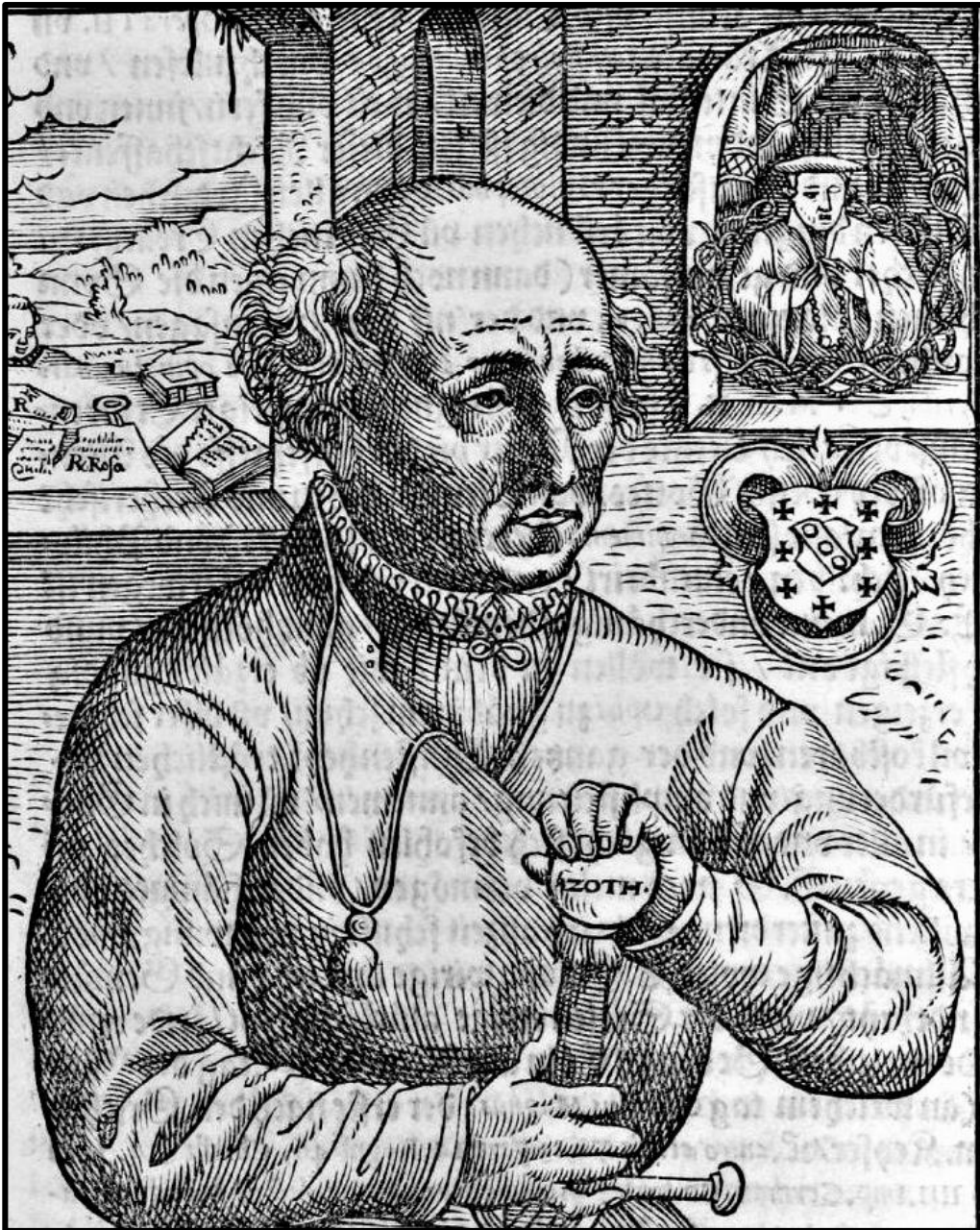
Účinek léku je stanovován jinak, např.:

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

Obvykle monitorované léky

antibiotika	amikacin, gentamicin, vankomycin
antiepileptika	fenobarbital, valproát, karbamazepin, fenytoin, lamotrigin, levetiracetam
bronchodilatancia	teofylin
kardiotonika	digoxin
antiarytmika	amiodaron
imunosupresiva	cyclosporin A, tacrolimus, sirolimus, kys. mykofenolová
antimykotika	vorikonazol, posakonazol
cytostatika	methotrexát, busulfan
ostatní	litium, TCA, antivirotika, benzodiazepin

V některých případech se stanovují i metabolity léků



DÁVKA A TYP LÁTKY JSOU KLÍČOVÉ

„Každá látka může být jedem, závisí jenom na dávce.“

Paracelsus

(1493 – 1541)

Údaje nezbytné pro správnou interpretaci TDM

- Identifikace subjektů (zařízení, žadatel)
- Typ požadavku (urgence, důvod)
- Diagnóza/ problém
- Typ vzorku
- Datum
- **Přesný čas odběru vzorku**
- Hmotnost, výška, pohlaví pacienta
- Současná léčba (stav nemoci)
- **Schéma dávkování (aplikační cesta, dávka, dávkovací interval)**
- Parametry renálních funkcí včetně dialýzy
- Současně aplikované léky

Co ovlivňuje hladinu léku ve stanovovaném vzorku krve?

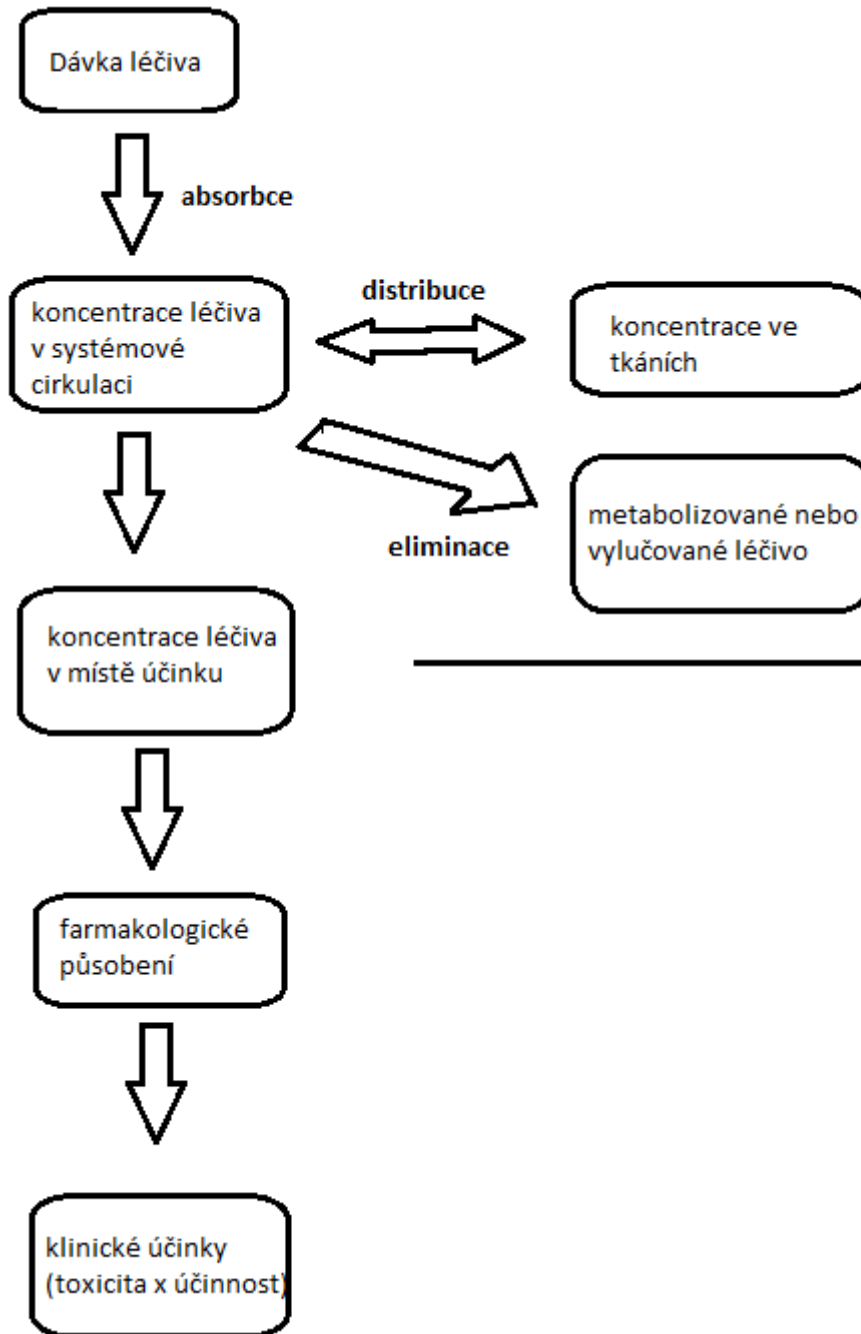
- ❖ Původní látka, dávka a způsob
 - podání (perorálně, parenterálně)
- ❖ Vstřebávání (absorpce, distribuce)
- ❖ Metabolismus (biotransformace)
- ❖ Vylučování (močí, stolicí, dechem, potem)

Odběr vzorku

- V ustáleném stavu (steady state)
- Před další dávkou („through“) – léky s dlouhým poločasem eliminace, např. digoxin
- Kdykoli („random“) - např. fenytoin

Léky s krátkým poločasem eliminace

- Před podáním - tzv. bazální koncentrace, 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

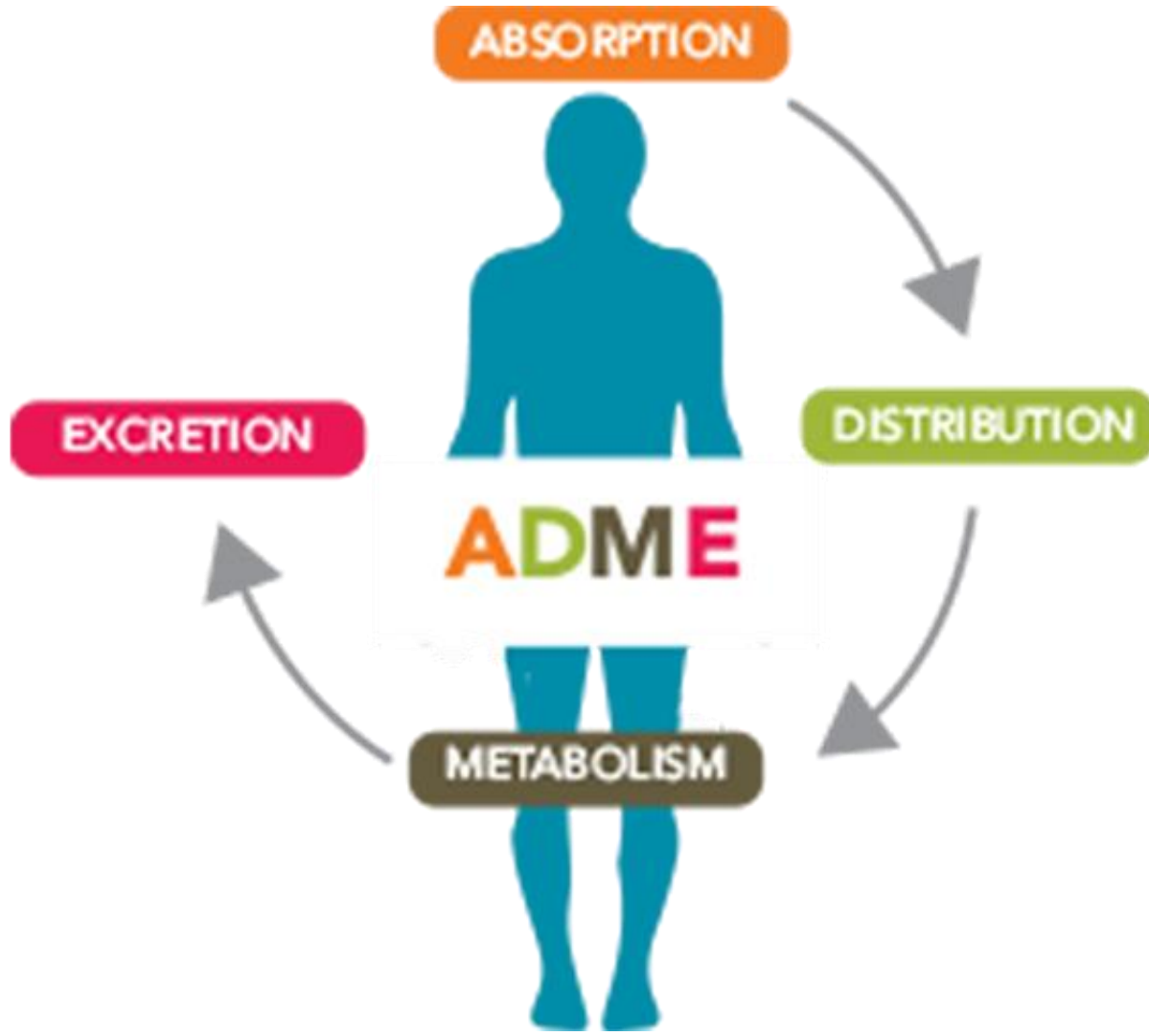


Farmakokinetika

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

Farmakodynamika

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



Farmakokinetika

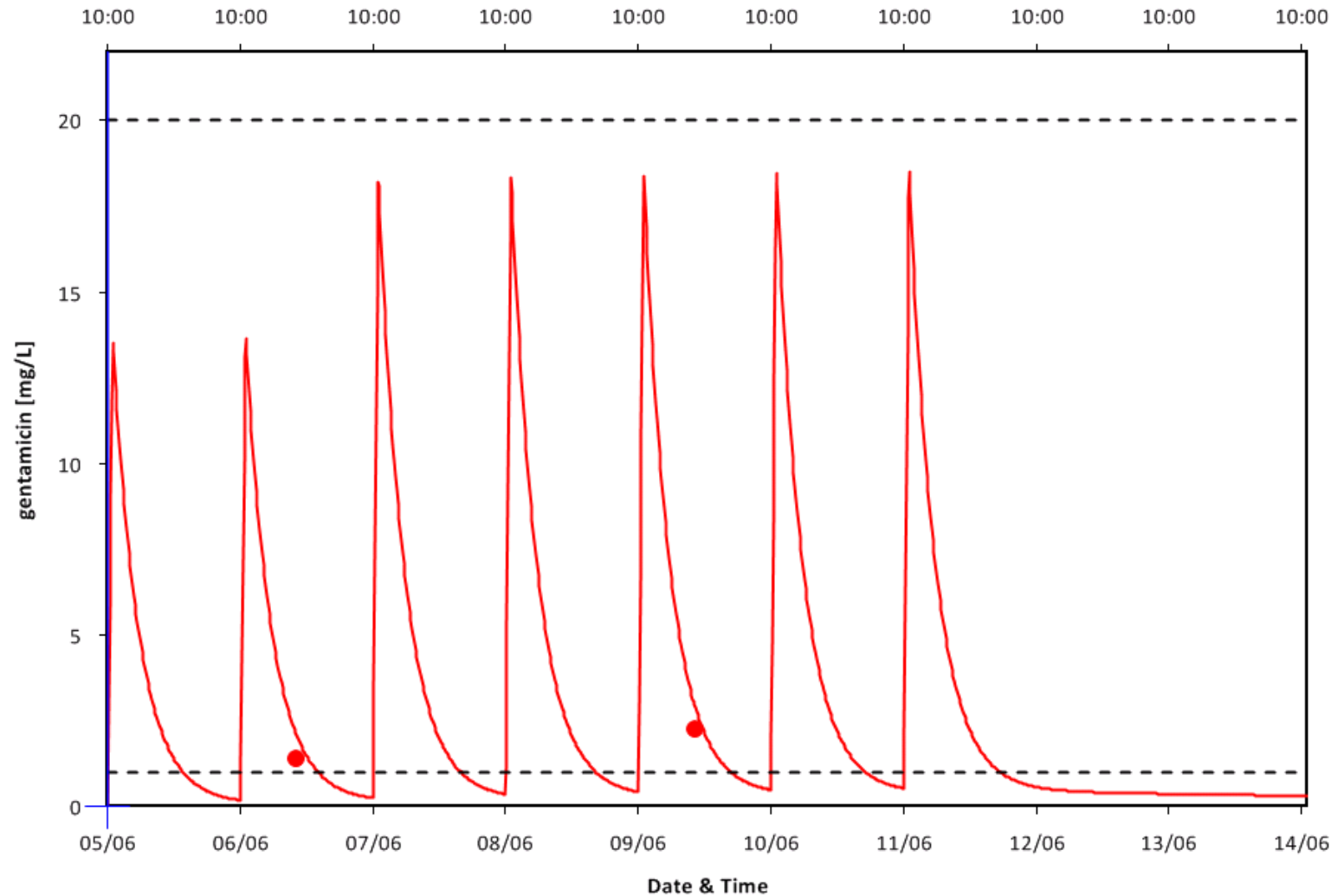
- studuje působení organismu na lék
- nauka no osudech léku v organismu

Farmakokinetika

- Pro sledování osudu léku v organismu, hodnocení dávkování léku je nutná znalost:
 - věk, pohlaví, výška, váha, BMI, fce ledvin, jater
 - údaje o druhu léku (včetně formy a dávky)
 - údaje o způsobu podání léku (způsob, doba)
 - doba odběru na stanovení léku
- Na základě těchto údajů odhadne speciální program předpokládanou konc. léku a porovná jí s naměřenou → simulací změny dávky nebo intervalu podání určí optimální způsob léčby popř. lékové interakce (podání více léků současně)

SIMULATION

gentamicin [gentamicin_C2]



<input checked="" type="checkbox"/>	Conc	0.0000 mg/L
<input type="checkbox"/>	Cave	0.0000 mg/L
	Effect	n.a. -
<input type="checkbox"/>	AUC	0.0000 mg/L.h
<input type="checkbox"/>	AUCC	0.0000 mg/L.h
	Dose	1
<input type="checkbox"/>	Ccr	97.00 μ mol/L
<input type="checkbox"/>	CLcr	79.23 mL/min
<input type="checkbox"/>	CLcrN	68.85 mL/min/1.73m ²
<input type="checkbox"/>	Bsa	1.99 m ²
<input type="checkbox"/>	Lbmc	76.31 kg
<input type="checkbox"/>	Bw	81.00 kg
<input type="checkbox"/>	Total	0.0000 mg 0.0000 mg/kg BW
<input type="checkbox"/>	CI	
<input type="checkbox"/>	POP	
<input type="checkbox"/>	SD	
	Date	5.6.2018 dd-mm-yy
<input type="checkbox"/>	Time	10:00 hh:mm
	Span	0.00:00 d.hh:mm 0.0000 h
	Scale	22.00 mg/L

Pharmacokinetics

The principles of ADME

Metabolism
How is it broken down?



Medicine

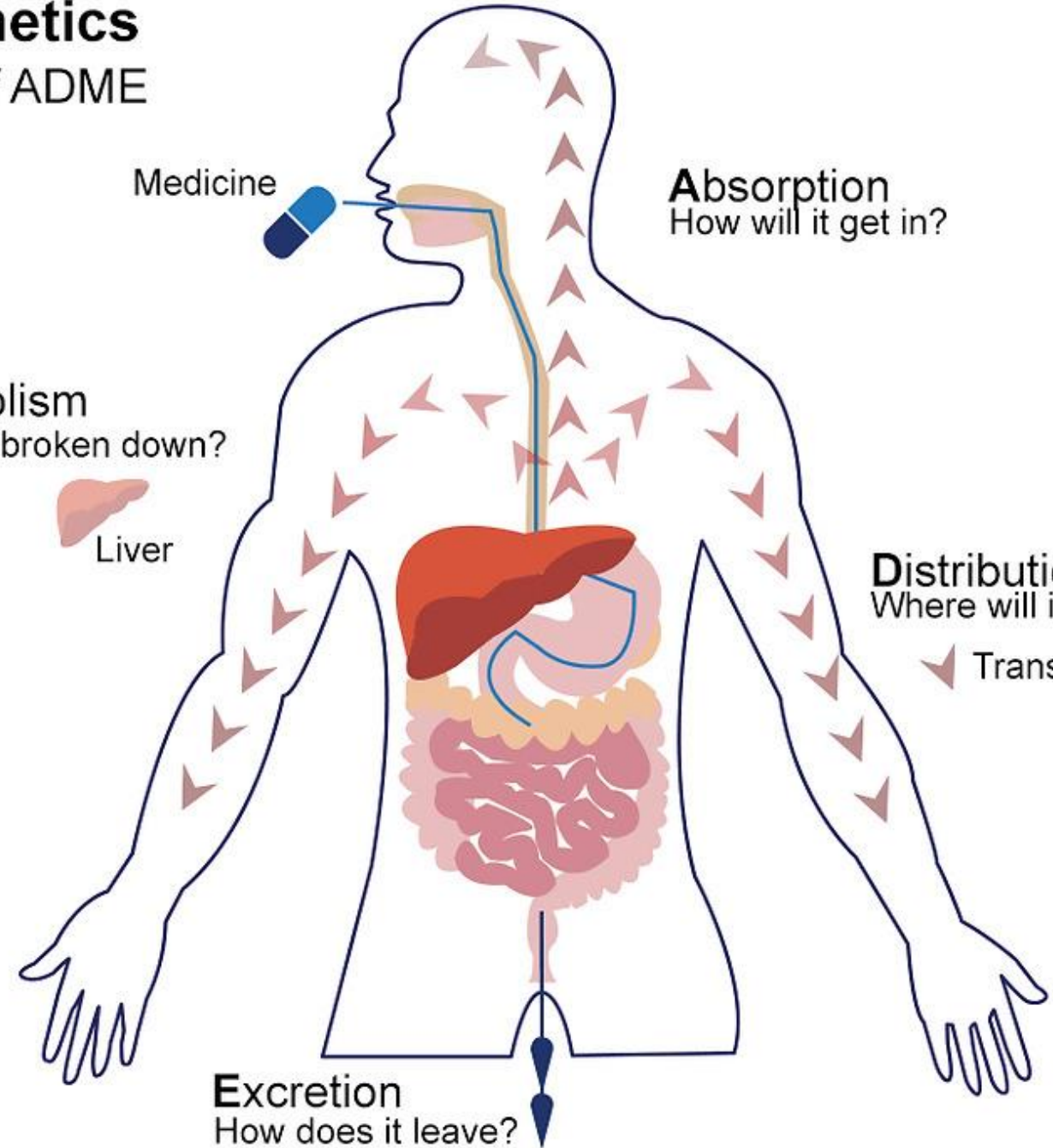


Absorption
How will it get in?

Distribution
Where will it go?

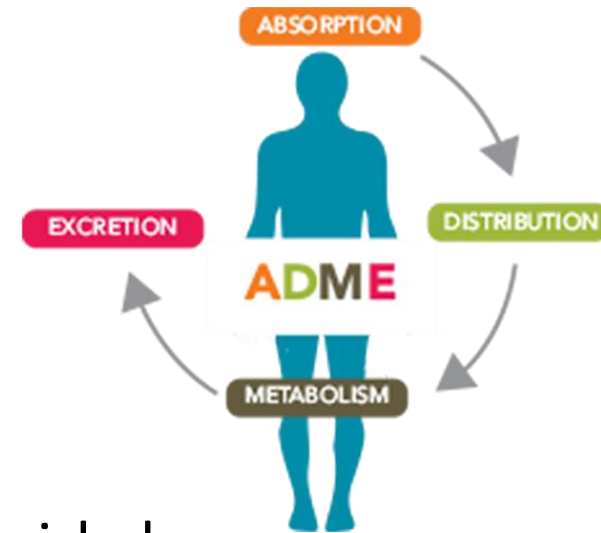
Transporters

Excretion
How does it leave?



Farmakokinetika

zahrnuje 4 základní procesy „ADME“



- **Absopce** – transfer léčiva z místa podání do systémové cirkulace
- **Distribuce** – transfer léčiva ze systémové cirkulace do různých orgánů/tkání v organismu
- **Metabolismus** – chemická modifikace léčiva v organismu
- **Exkrece** – odstranění mateřské látky nebo jejího metabolitu z organismu

- **Metabolismus + exkrece = dohromady přispívají k eliminaci léčiva z organismu**

Základní parametry klinické farmakokinetiky

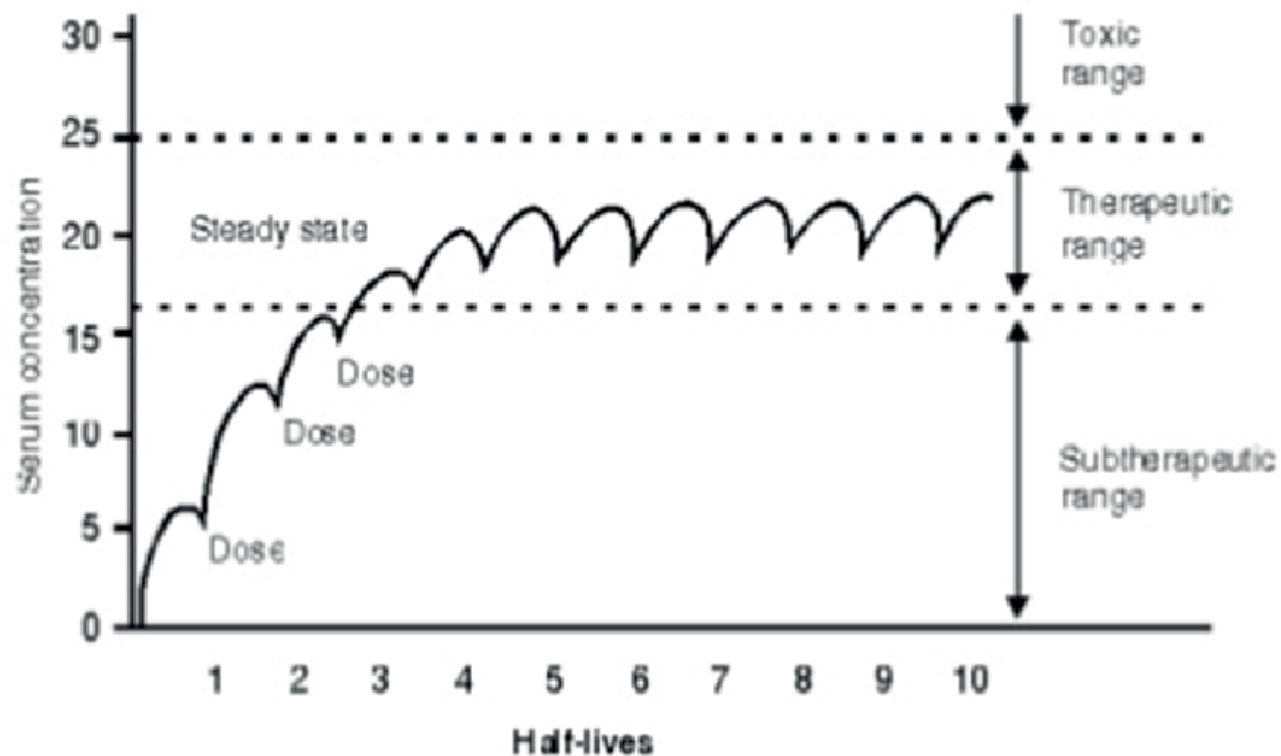
- **Distribuční objem V_d**
 - Fiktivní pojem
 - Podává informaci o rozdělení látky v organismu (malý V_d – léčivo spíše v krvi, velký V_d – léčivo spíše ve tkáních)
 - **Hypotetický, teoretický, „zdánlivý“ objem, který by byl nutný pro rozpuštění léčiva, aby mělo stejnou koncentraci jako je koncentrace v plazmě**
 - Vyjadřuje vztah mezi velikostí dávky a dosaženou koncentrací v plazmě
- **Celková clearance**
 - **Objem plazmy zcela očištěné od léčiva za jednotku času**
- **Biologický poločas (plazmatický)**
 - **Vyjadřuje dobu, za kterou klesne hladina látky v plazmě o polovinu**
- **Biologická dostupnost**
 - **Podíl podaného léčiva (látky), který se dostane do systémové cirkulace**

Ustálený stav (steady state)

- Po uplynutí 4-5 poločasů
- Dosažení rovnováhy mezi rychlostí přívodu léčiva a jeho eliminací z organismu

Pravidlo 4-5 poločasů

- Jestliže léčivo aplikujeme v intervalech kratších než 1,4 poločasu, tak se jeho hladina neustále zvyšuje (dochází k jeho kumulaci), ale za 4-5 poločasů se ustálí a již se dále nezvyšuje.



Proč 4-5 poločasů?

Vznik ustáleného stavu při opakovaném podávání léčiva v intervalech 1 poločasu.

Interval	Aplikováno	Výchozí hladina na začátku intervalu %	Zbývá na konci intervalu %	Eliminováno během intervalu %
1.	100 mg	100	50	50
2.	100 mg	150	75	75
3.	100 mg	175	88	88
4.	100 mg	188	94	94
5.	100 mg	194	97	97

Farmakodynamika

- Studuje působení léku na organismus (orgány, tkáně, receptory)
- interakce s buněčnými komponenty, např. receptory, cílovými místy
- mechanismy účinku (působení léčiva v cílovém místě účinku, vztah mezi koncentrací léku a jeho účinkem)
- lékové interakce
- nežádoucí účinky

Farmakogenetika a farmakogenomika

- Studují individuální genetický vliv na farmakokinetiku a farmakodynamiku (existuje velká interindividuální variabilita)
- Cílem je individualizace volby léku a jeho dávkování
- FARMAKOGENETIKA studuje rozdílné účinky léčiva u rozdílných pacientů in vivo, které jsou dány přítomností dědičných variant genů. Farmakogenetika se zaměřuje na variabilitu pacientů.
- FARMAKOGENOMIKA studuje rozdílné účinky potenciálních léčiv in vivo i in vitro na genovou expresi jako celek. Hodnotí expresní profily. Farmakogenomika se zaměřuje na variabilitu potenciálních léčiv.

Stanovení koncentrace léčiv v biologickém materiálu

Analyzovaný materiál

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

1. Imunoanalytické metody

- a) fluorescenční imunoanalýza
(FIA, FPIA, DELFIA)
- a) enzymová imunoanalýza
(EMIT, ELISA, MEIA, CEDIA)
- a) luminiscenční imunoanalýza
(LIA, ILMA, CMIA, ECLIA,...)

1. Imunoanalytické metody

☐ *Imunochemické metody*

- Většinou kompetitivní princip
- Uplatnění zejména v rutinních klinických laboratořích ⇒ jednoduchá automatizace, snadná manipulace a možnost analýzy větších sérií vzorků
- Nevýhody: výskyt nespecifických reakcí a neschopnost identifikovat aktivní metabolity léčiv

☐ **Elektro-chemiluminiscenční imunoanalýza, *ECLIA*** (Cobas 8000 Roche)

❖ např. *Digoxin*

☐ **Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích, *CMIA*** (Architect Abbott)

❖ antiepileptika: *Fenytoin, Karbamazepin, Kyselina Valproová*

❖ imunosupresiva: *Cyklosporin A*

❖ cytostatika: *Metotrexát*

☐ **Imunoturbidimetrie** (Cobas 8000/6000 Roche)

❖ *Amikacin, Teofylin*

2. Chromatografické metody

HPLC

HPLC/MS

LC/MS

GC/MS

TLC (screening)

2. Chromatografické metody

- ❖ dříve zejména tenkovrstevná chromatografie (TLC), v současnosti kapalinová chromatografie s různými typy detekce, menší podíl pak plynová chromatografie
- vysoká účinnost, dobrá opakovatelnost a robustnost
- umožňuje rozlišit i metabolity
- nevýhody: náročnější na přípravu vzorků, vyšší TAT

2. Chromatografické metody

☐ **RP-HPLC** (*Reverse Phase HPLC*)

- nejpoužívanější metodou HPLC v praxi
- používá se k separaci polárních látek, mezi které patří většina léčiv
- detekce: UV/VIS, fluorescenční, elektrochemická

❖ antimykotika: *Vorikonazol, Posakonazol*

❖ imunosupresiva: *Kyselina mykofenolová*

☐ **LC-MS/MS**

- příprava vzorků stejná jako u HPLC, odpadá potřeba případné derivatizace
- velmi vysoká citlivost a specifita, robustnost, možnost rozlišení i jednotlivých metabolitů
- nevýhody: vyšší pořizovací náklady, technická náročnost, vyšší TAT

❖ cytostatika: *Busulfan*

❖ inhibitory tyrozinkinázy: *Nilotinib, Imatinib, Dasatinib*

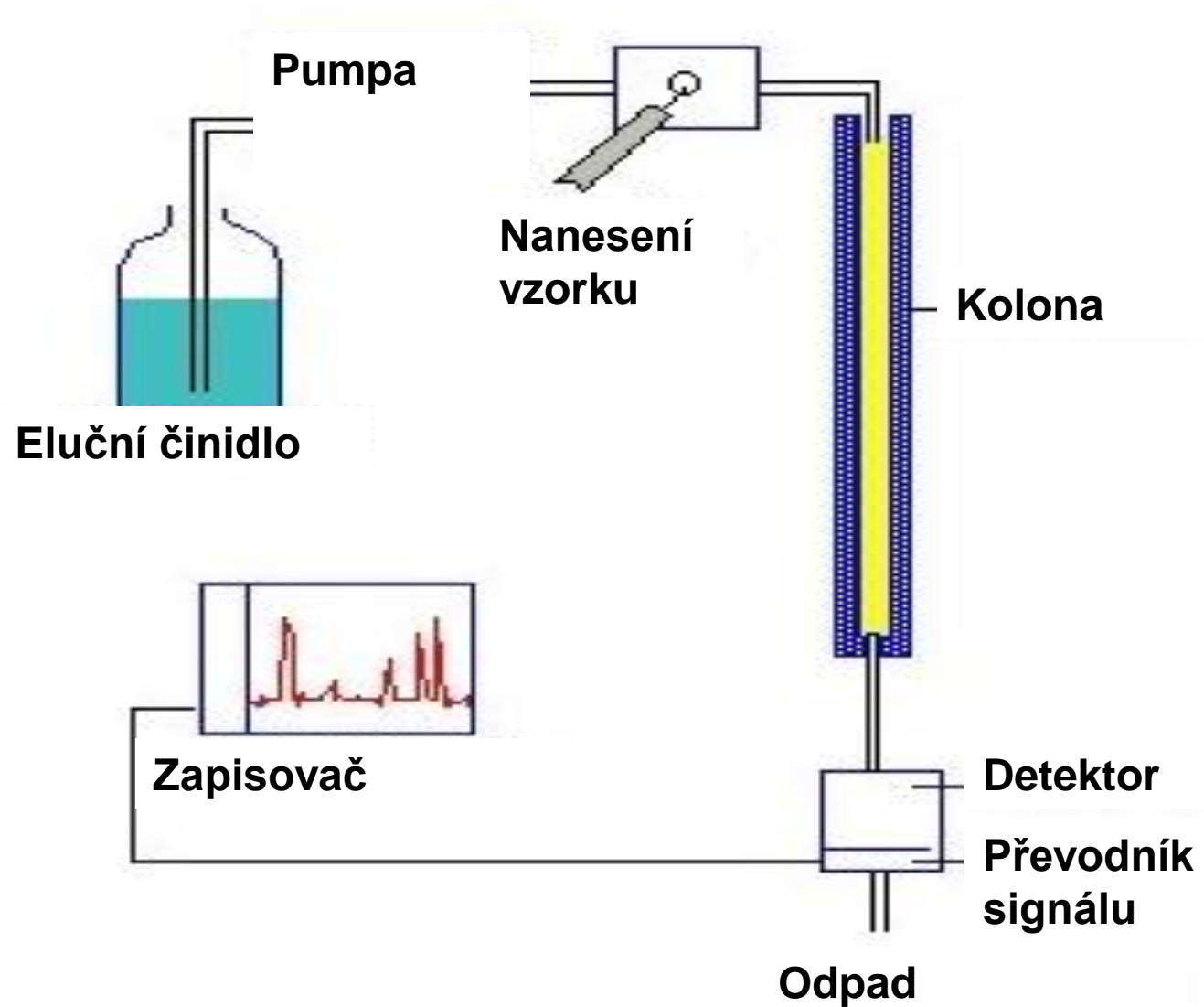
❖ antipsychotika: Clozapin, Olanzapin, Risperidon, Paliperidon, Aripiprazol, Quetiapin, Haloperidol

Techniky úpravy vzorků

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



HPLC – jednoduché schéma



HPLC/MS



3. Metody pro odhalování genetického polymorfismu v metabolismu léčiv

Lze stanovit:

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

Cobas 8000 (Roche)

- Amikacin, Vankomycin, Gentamicin – antibiotika (c modul)
 - Digoxin – kardiotonika (e modul)
 - Teofylin – bronchodylatancia (c modul)
 - Lamotrigin, Levetiracetam – antiepileptika (c modul)
 - Lithium – léčba psychotických poruch (c modul)
 - Benzodiazepiny – anxyolitika, hypnotika (c modul)
-
- c modul – fotometrie
 - e modul - elektrochemiluminiscence

Architect (Abbott)

- Fenobarbital, valproát, karbamazepin, fenytoin – antiepileptika (sérum, plasma)
- Cyklosporin A – imunosupresiva (plná krev)

□ CMIA

HPLC/MS

- Busulfan – cytostatika
- Imatinib, Dasatinib, Nilotinib – inhibitory tyrosinkináz
- Metotrexát, 7-OH-metotrexát – cytostatikum
- Risperidon, Paliperidon, Quetiapin, Olanzapin, Clozapin, Haloperidol, Aripiprazol – antipsychotika

HPLC s UV detekcí

- Vorikonazol, Posakonazol – antimykotika
- Meropenem, Cefepim, Ampicilin, Piperacilin, Linezolid – antibiotika
- Kys. mykofenolová – imunosupresiva

CYKLOSPORIN A MYKOFENOLOVÁ KYSELINA

- Imunosupresiva
- Odběr: nesrážlivá krev (EDTA), Cyklosporin (plná krev, EDTA)
- Referenční meze: podle doby po transplantaci a druhu transplantace
- Cy A: cyklický polypeptid, Architect (Abbott)
- MPA: aktivní část z léčiva mofetil (HPLC s UV detekcí)

Busulfan

- Součást vysokodávkované protinádorové chemoterapie (před transplantací krvetvorných buněk)
- Velké interindividuální rozdíl
- Nežádoucí účinky: především hepatotoxicita (nejčastěji zapříčiňuje venookluzivní nemoc jater - VOD)
- Monitorování hladiny (tabletová forma) po 1., 5., 9., 13. dávce, začátek po 6 hodinách (30 min. před další dávkou), pak v hodinových intervalech do další dávky
- Vyhodnocuje se plocha pod křivkou, vypočítává tzv. Steady-state concentration – C_{ss} (doporučovaná: 850-1000 ng/ml)
- Na základě C_{ss} korekce 3., 7., 11., 15. dávky
- Metoda: HPLC/MS, nesrážlivá krev

DIGOXIN

- Odběr: srážlivá, nesrážlivá krev před podáním nebo 6-11 h po podání
- Referenční meze: 0,5-1,2 ug/l
- Srdeční glykosid, je indikován při srdečním selhávání
- Cobas 8000

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
- Cobas 8000

LITHIUM

- Odběr: srážlivá, nesrážlivá (NIKDY Li-Heparin!) krev
10-18h po podání
- 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 AAS, cobas 8000



**Laboratorní diagnostika
návykových látek**

Za jakým účelem se stanovují návykové látky?

- v rámci policejních kontrol
- k odlišení symptomů nebo k ujištění, že pacient není pod jejich vlivem před některými lékařskými zákroky
- sledování dodržování léčby
- u těhotných žen, které mají v anamnéze dřívější užívání drog (užitečné pro následnou péči o novorozence)
- někteří zaměstnavatelé vyžadují drogový screening jako součást vstupních nebo preventivních prohlídek (zejména u osob, které při výkonu svého povolání mohou ohrozit zdraví a životy ostatních lidí – řidiči MHD, zdravotnický personál apod.)

Stanovení na několika úrovních:

- **Orientační** (vhodné i pro terénní účely)
- **Semikvantitativní** (drogový screening v klinických laboratořích)
- **Konfirmační** (analýza ve specializovaných toxikologických laboratořích)

Orientační testy

- patří do kategorie testů POCT (rychlá analýza v terénu, u lůžka apod.)
- materiál: sliny, moč, krev, pot, pevné látky (ubrousky na kokain)
- možná detekce několika druhů drog v rámci jednoho testu
- nižší spolehlivost (95 %), možná falešná pozitivita či falešná negativita (v dané skupině nemusí reagovat všechny strukturní deriváty)
- nemohou samy o sobě odlišit nelegální užívané drogy od komponent stejné třídy, které mohou být obsaženy v předepisovaných lécích (FP)



V případě pozitivního výsledku orientačního testu je třeba zajistit materiál a zaslat ho k vyšetření ve specializované toxikologické laboratoři, která k takové analýze má oprávnění!

Princip stanovení

Imunochromatografická technika podélného toku reagensí proužkem porézní membrány (angl. Lateral Flow Immunoassay; zkr. *LFIA*)

- Kompetice drogy ve vzorku se značeným konjugátem drogy imobilizovaným na membráně o vazbu na specifickou protilátku imobilizovanou v testovací a kontrolní zóně testu
- Nízká koncentrace drogy → vazba značeného konjugátu na specifickou protilátku v testovací zóně → *vznik barevné linie*

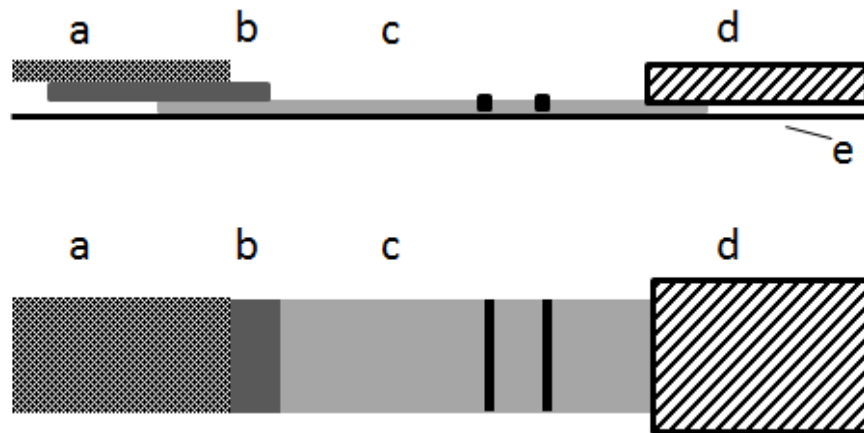


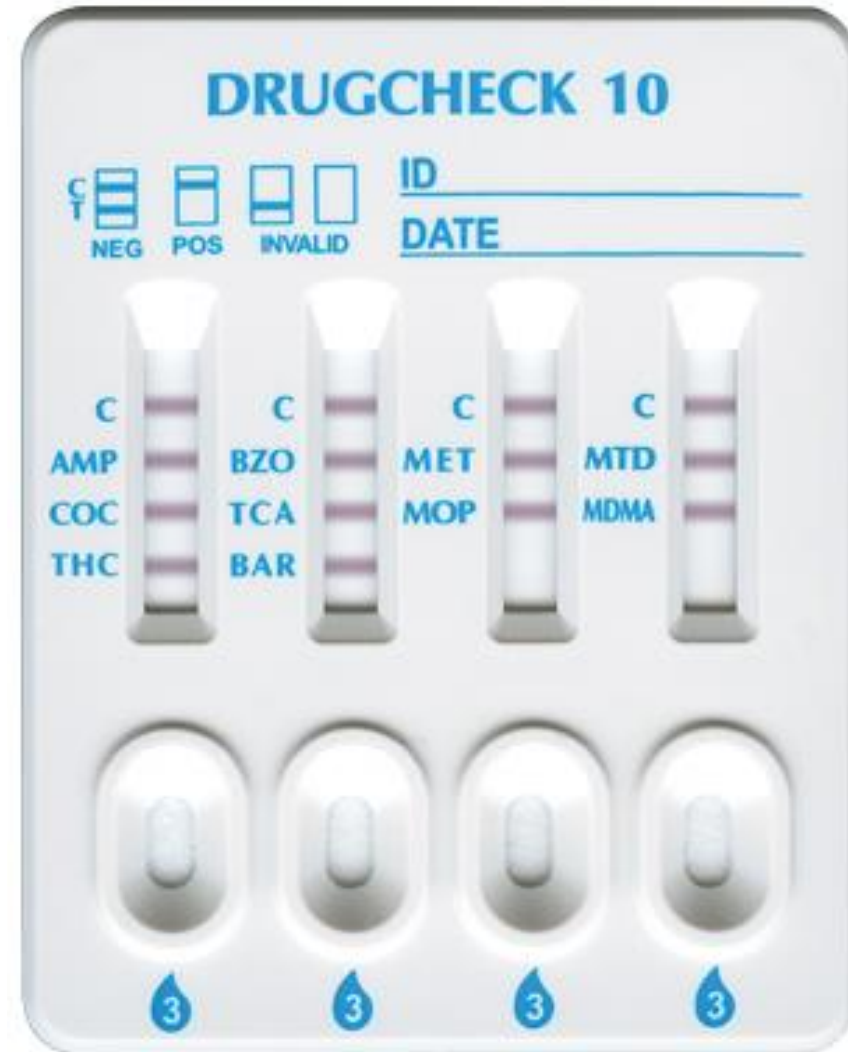
Schéma uspořádání membrán v LFIA testu (nárys a půdorys); *a* – podložka pro vzorek, *b* – podložka pro konjugát, *c* – membrána s testovací a kontrolní linkou v detekční zóně, *d* – absorpční podložka, *e* – plastová výztuž membrány

Ukázka membránového testu v kazetě; *a* – uspořádání membrán v kazetě, *b* – výsledek testu standardního roztoku bez analytu a s vysokou koncentrací analytu (www.chemickelisty.cz)

Drogový screening pomocí testovacích kazet

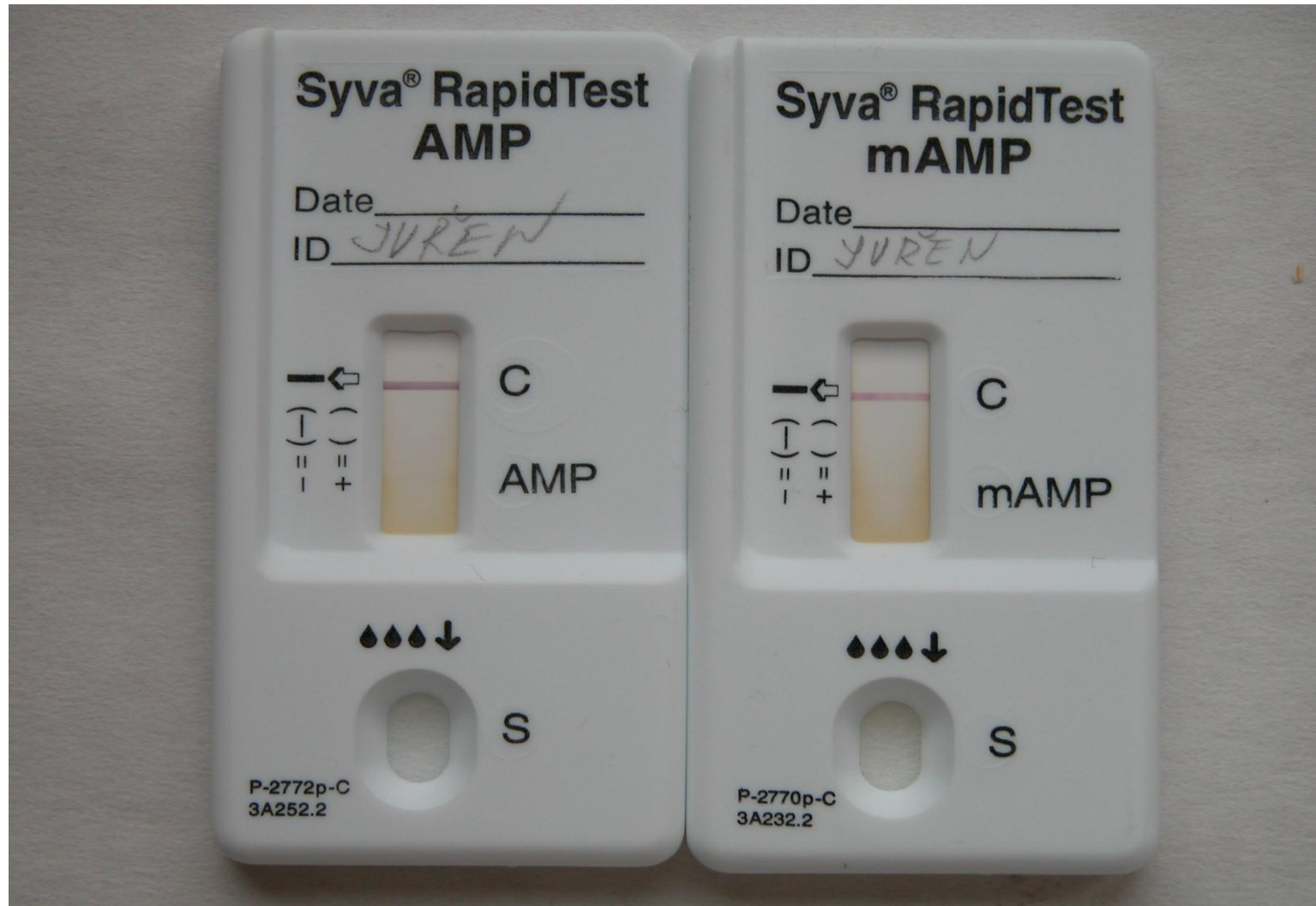
Metoda LFIA

- Kompetice drogy ve vzorku se značeným konjugátem drogy immobilizovaným na membráně o vazbu na specifickou protilátku immobilizovanou v testovací a kontrolní zóně testu



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,...)

Drogový screening v klinické laboratoři

Imunochemická vyšetření

- **semikvantitativní stanovení** (výsledek je pouze orientační, vyžaduje potvrzení a upřesnění více specifickou nezávislou metodou)
- screeningové metody mohou sloužit pro zaměření na další analytické postupy – vstupní náhled na soubor látek
- uvážení možností imunochemických metod a správná interpretace výsledků slouží k rychlému řešení akutních intoxikací
- materiál: jednorázová moč

nevyžadují izolaci a zakoncentrování analytu
vysoká citlivost
vysoká rychlost
jednoduchost, nenáročnost na kvalifikaci
vhodné pro automatizaci
vhodné pro sériová vyšetření

Kinetická interakce mikročastic v roztoku - *KIMS*

- protilátka proti příslušnému analytu v moči je kovalentně vázána na mikročástice a derivát analytu je připojen k makromolekule
- kinetická interakce mikročastic v roztoku je vyvolána vazbou konjugátu analytu na protilátku na mikročastici a je měřena jako změna průchodu světla.
- mezi konjugátem a nekonjugovaným analytem ve vzorku probíhá kompetitivní reakce o vazebná místa protilátky proti analytu navázané na mikročástice
- přítomnost analytu ve vzorku úměrně snižuje nárůst absorbance vůči koncentraci drogy ve vzorku



Substance	Medical Uses	Drug Detection Times
Stimulants		
Amphetamine	Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), obesity, narcolepsy	2-5 days
Cocaine	Local anesthetic, vasoconstrictor	2-5 days
Methamphetamine	ADHD, obesity, narcolepsy	3-5 days
Methylphenidate	ADHD, narcolepsy	1-2 days
Nicotine	Treatment for nicotine dependence	4-10 days
Hallucinogens and Other Compounds		
LSD	None	7-10 days
Mescaline	None	5-7 days
Phencyclidine & Analogs	Anesthetic (veterinary)	2-8 days
Psilocybin	None	5-7 days
Amphetamine variants	None	5-7 days
Marijuana	Limited, Analgesic	*
Hashish	Limited, Analgesic	*
Tetrahydrocannabinol	Antiemetic	*
Anabolic Steroids	Hormone Replacement Therapy	Oral: up to 3 weeks (for testosterone and others); Injected: up to 3 months (Nandrolone up to 9 months)
Opiates and Morphine Derivatives		
Codeine	Analgesic, antitussive	5-7 days
Heroin	None	5-7 days
Methadone	Analgesic, treatment for opiate dependence	5-7 days
Morphine	Analgesic	5-7 days
Opium	Analgesic, antidiarrheal	5-7 days
Depressants		
Alcohol	Antidote for methanol poisoning	24-48 hours
Barbiturates	Anesthetic, anticonvulsant, hypnotic, sedative	2 days - 4 weeks
Benzodiazepines	Antianxiety, anticonvulsant, hypnotic, sedative	7-10 days
Methaqualone	None	2 weeks

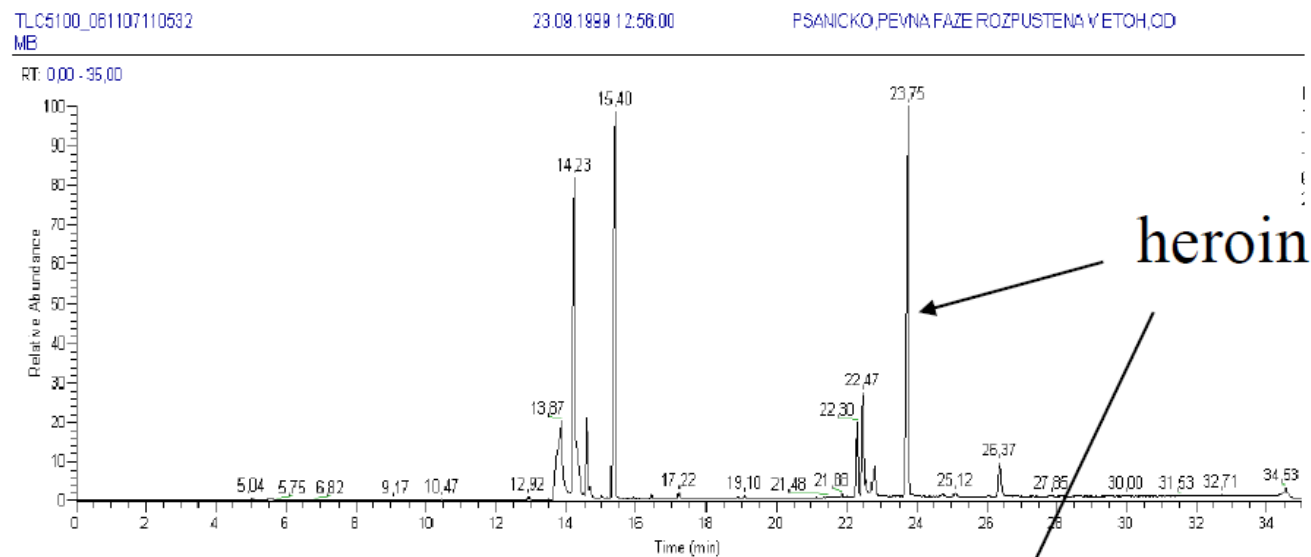
Marijuana Detection Time Based on Usage	
Usage at 1 time only	5-8 days
Usage at 2-4 times per month	11-18 days
Usage at 2-4 times week	23-35 days
Usage at 5-6 times per week	33-48 days
Daily Usage	49-63 days

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)

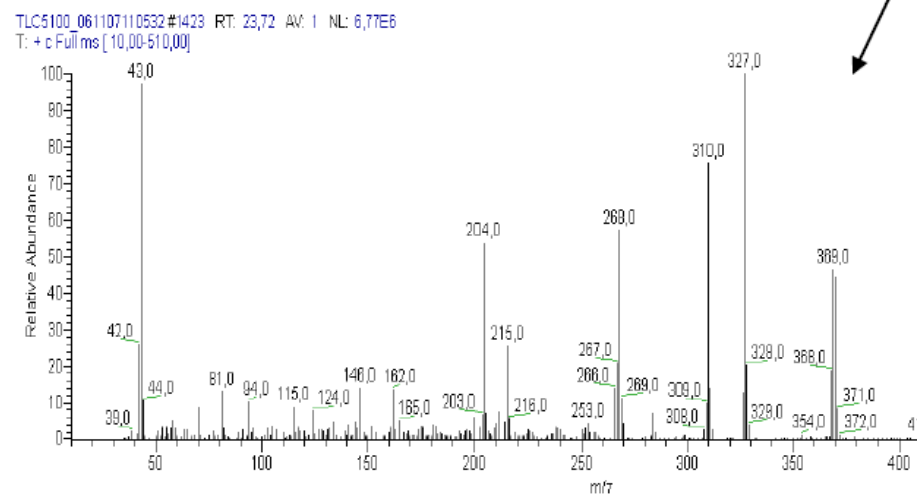
- velká specifita hmotnostních spekter - **jsou standardem pro identifikaci neznámých látek v toxikologii**
- reprodukovatelné retenční parametry, mezilaboratorní přenos retenčních dat, databáze retenčních indexů
- velká separační účinnost GC kapilár
- použití:
 - chemická identifikace širokého spektra neznámých látek
 - potvrzovací analýzy užší skupiny látek
 - kvantifikace – stanovení známé látky

GC-MS: potvrzení přítomnosti heroinu

GC-MS Total Ion Chromatogram – analýza substance



MS spektrum heroinu



GC-MS: intoxikace kokainem a extází

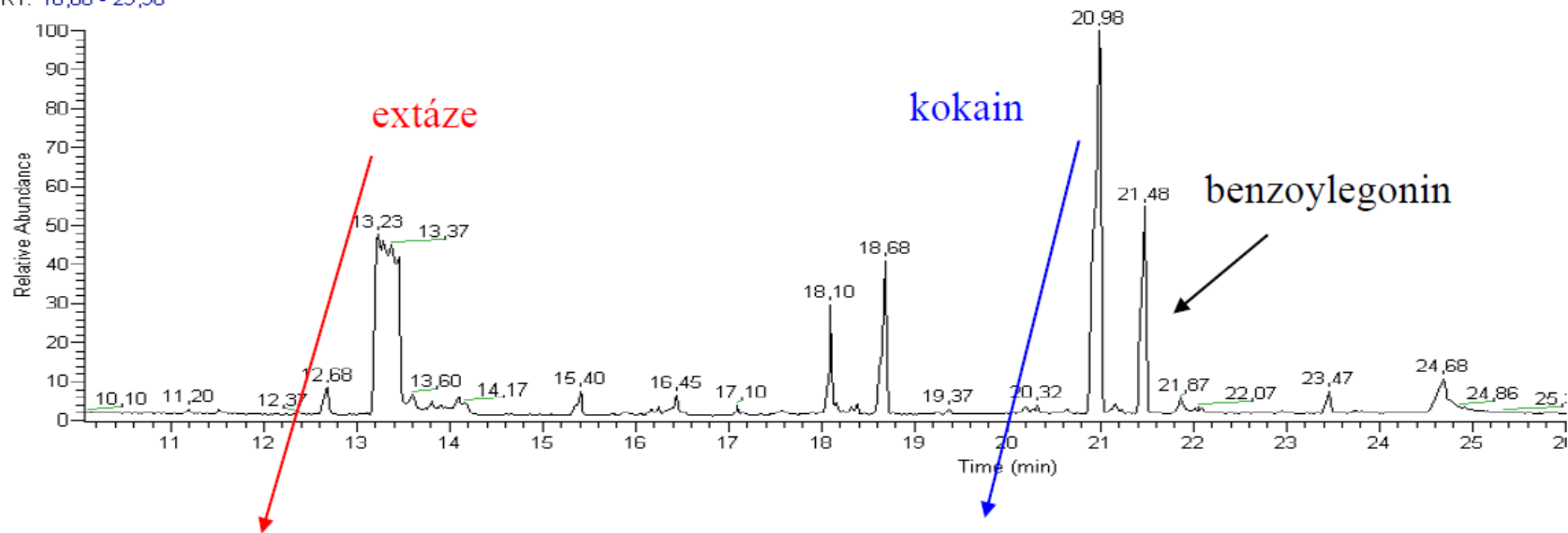
Total Ion Chromatogram – analýza 2 ml moč silylace

C:\Documents and Settings\...\ISM64997B

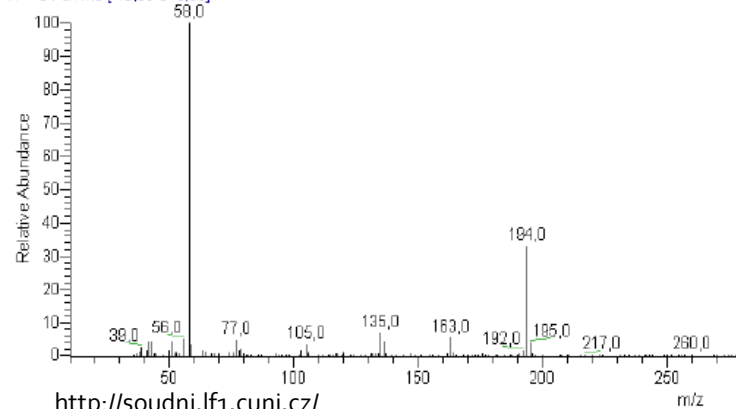
08.11.2006 20:31:20

2 ML UR,SPE BEC SCREENING FRA

RT: 10,06 - 29,98

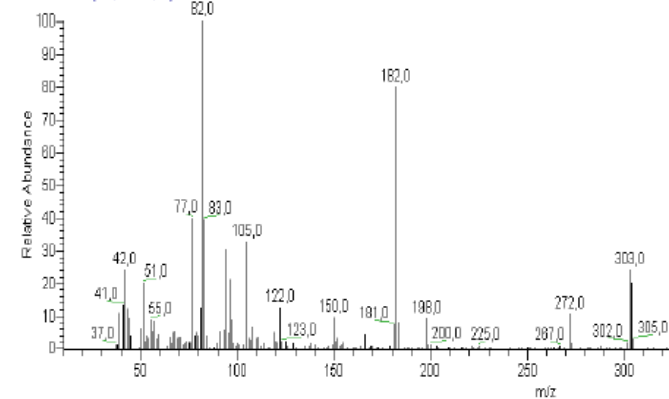


SS64997B #002 RT: 13,37 AV: 1 NL: 1,15E7
T: + c Full ms [10,00-510,00]



<http://soudni.lf1.cuni.cz/>

SS64997B #1258 RT: 20,97 AV: 1 NL: 1,48E6
T: + c Full ms [10,00-510,00]



Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

- využívá princip dělení směsi látek mezi stacionární a mobilní fází - využívá adsorpční a rozdělovací chromatografii
- využívá princip extrakčního chování nosiče – dělení na látky bazické, kyselé a neutrální
- denzitometrická kvantifikace (UV, VIS)
- jednoduché a rychlé provedení
- při dobré volbě extrakce a detekčních činidel poskytuje velmi dobré kvalitativní rozlišení neznámé látky

Tenkvrstevná chromatografie (TLC)

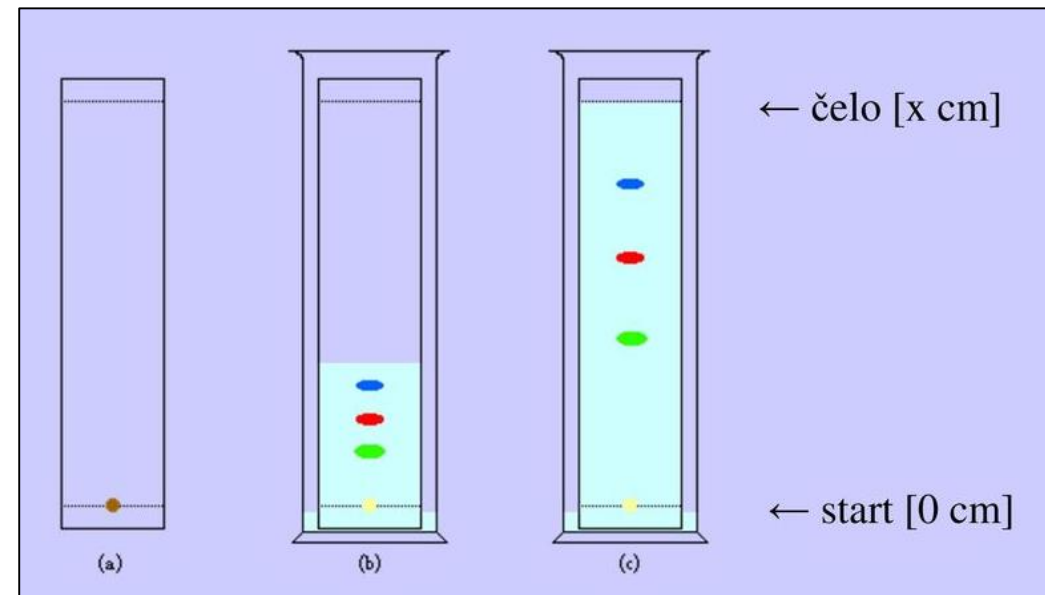
- způsob provedení:

Stacionární fáze – silikagel (kyselina křemičitá), oxid hlinitý, komerční přípravky: silufol, kieselgel G

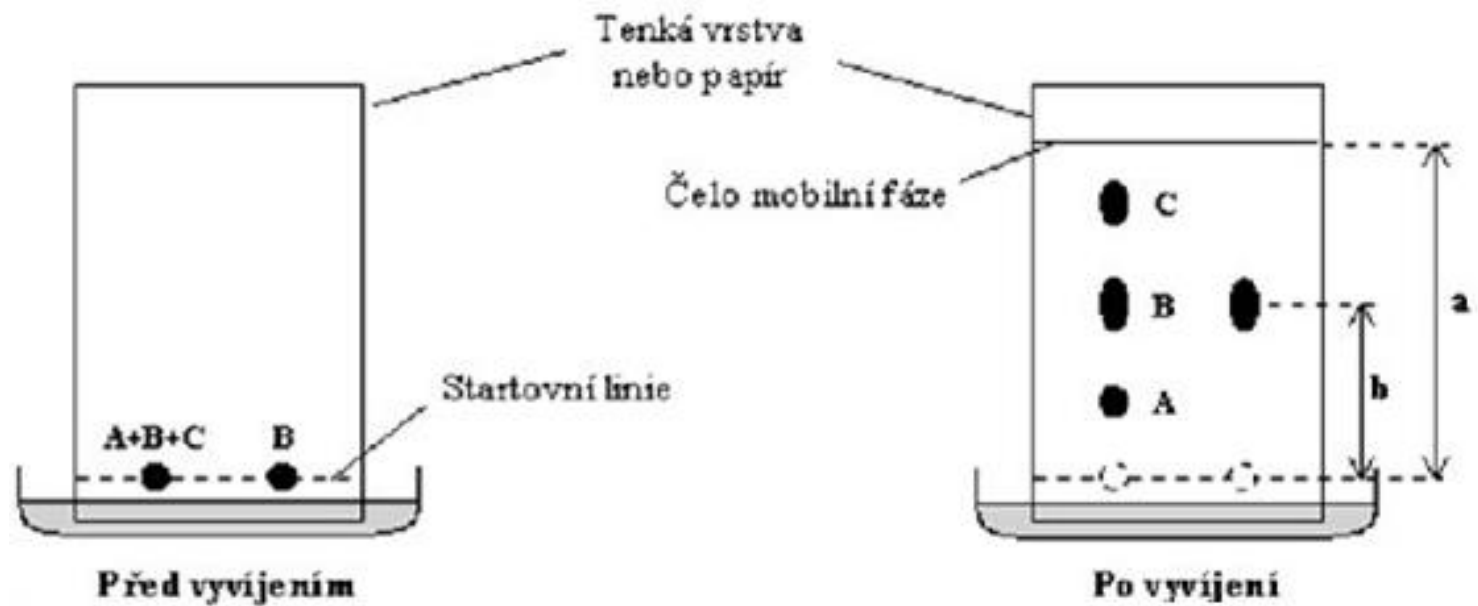
Mobilní fáze – směs organických rozpouštědel

- R_F faktor (retenční/retardační faktor) – podíl vzdálenosti středu skvrny látky od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla

- R_F faktor ovlivňuje:
 - chemická struktura látky
 - složení mobilní fáze
 - pH
 - teplota, vlhkost
 - materiál nosiče



Tenkovrstevná chromatografie (TLC)



$$R_F(B) = \frac{b}{a}$$



EMIT (Enzyme-multiplied immunoassay technique)

- Homogenní kompetitivní imunoanalýza
- kompetice mezi látkou ve vzorku a látkou značenou enzymem o vazebná místa na protilátce.
- enzym = glukoso-6-fosfát dehydrogenáza (G6PDH)
- aktivní enzym mění NAD na NADH → změna absorbance
- aktivita enzymu klesá při vazbě protilátky, proto lze koncentraci látky ve vzorku měřit podle změny aktivity enzymu.

Př. Kotinin v moči (DRI Cotinine Assay, ThermoScientific/ cobas c8000, Roche)

- Referenční meze kotininu v moči

<30 (nekuřáci)

50-500 (vystavení nikotinu – lehký/pasivní kuřák)

>500 (abúzus tabákových výrobků)

Vzorek č.	Udaná expozice	Výsledky [ng/ml]
1	do 5 cigaret denně	389
2	10-15 denně	2009
3	10-15 denně	971
4	15-20 denně	1304
5	20-25 denně	1848
6	25-30 denně	1517
7	15-20 denně	2142
8	10-15 denně	615
9	10-15 denně	589
10	10 denně	1746
11	nekuřák	0
12	příležitostně	0
13	nekuřák	0
15	nekuřák	3
16	nekuřák	0

Konfirmační analýza návykových látek

- **základní princip toxikologie: potvrzování výsledků navzájem nezávislými metodami**
- klinický a forenzně toxikologický standard současnosti: metody hmotnostní spektrometrie v tandemu s plynovou nebo kapalinovou chromatografií **GC-MS, LC-MS**
 - bezpečná identifikaci neznámé látky a přesné stanovení její koncentrace
- výsledky takového konfirmačního vyšetřování je jako jediné možné použít i pro soudně-lékařské účely (tedy pouze laboratoře forenzní toxikologie, soudní toxikologie)
<http://www.soudnikarstvi.cz/wp-content/uploads/2014/10/Seznam-laboratoří-kvalifikovaných-pro-vyšetřování-specifikovaných-návykových-látek.pdf>
- materiál: moč, krev, sliny, pot, vlasy, žaludeční obsah, tkáně, podezřelé látky

Další toxikologická vyšetření v klinické laboratoři

- **Deriváty Hb** (COHb, MetHb, SulfHb, CNHb) - přímá spektrofotometrie - analyzátory ABR s fotometrickým systémem, paralelní stanovení Hb, oxyHb
- **Ethanol, Methanol, Ethylenglykol** – osmolární okno
- **TDM** (Therapeutic Drug Monitoring) – imunoanalýza, HPLC, LC-MS
- **Li, Pb** - AAS

Otrava alkoholy

Etanol

- akutní: excitační a narkotický účinek na CNS, metabolická acidóza, hypoglykémie, hyperurikémie, ↑ ALT, ↑ osmolalita
- chronický účinek: steatóza až cirhóza jater, ↑ GMT, ↑ %CDT
- > 3‰ : kóma, křeče, hypotermie (podchlazení), hrozí smrt vyvolána útlumem dechového centra a oběhovým selháním
- u alkoholika nebo osoby dlouhodobě nadužívající alkohol vzniká jakási "rezistence" (odolnost) a tyto stavy mohou nastoupit až ve vyšším stupni opilosti

Otrava alkoholy

Metanol

- nejdříve příznaky podobné ethanolu (lehká opilost, horší artikulace) poté 12 – 24 hod. bez příznaků (s kombinací s alkoholem až 36 hod.) , následuje bolest hlavy, dušnost, bolest břicha, křeče, snížená ostrost vidění, rozvrat met. procesů
- **toxické účinky met. produktů – formaldehydu (na zrakový nerv), kys. mravenčí (met. acidóza)**
- tox. dávka – 0,1 ml/ kg, smrtelná dávka – 1 ml/kg
- léčba: podání antidota (etanol, fomepizol) min. tvorbu tox. produktů (kompetitivní inhibice alkoholdehydrogenázy); HD – odstraňuje metanol i jeho metabolity, koriguje metalické poruchy

Otrava alkoholy

Ethylenglykol

- metabolizován v játrech působením alkohol - a aldehyd-dehydrogenázy na silné kyseliny (glyoxalovou, šťavelovou, oxalovou),
- vzniká těžká metabolická acidóza, která se prudce zhoršuje a ohrožuje život otráveného
- kys. oxalová se váže s Ca, depozita krystalů šťavelanu vápenatého vedou k poškození buněk (mozek, ledviny, myokard, plíce), také výrazné ↑↑ osmolality
- tox. dávka 200 mg/l, smrtelná dávka: 850- 2000 mg/l (nejednotné údaje)

Otrava alkoholy

Ethylenglykol

- příznaky otravy: opilost bez zápachu alkoholu
- neurologické stádium (30 min. – 12 h. po požití) opilost, euforie, smazaná řeč, ospalost, zvracení. Během 4-12 h. rozvoj met. Acidózy.
- kardiopulmonální stádium (12-24 h.) – tachykardie, hypo nebo hypertenze, těžká m. acidóza a s hyperventylací a selháváním orgánů
- renální stádium – (24 -72 h.) – hematurie, albuminurie, selhání ledvin, ne vždy úprave fce ledvin
- léčba: podání etanolu (100x vyšší afinita k ADH); HD – odstraní ET i metabolity, upraví acidózu



Děkuji za
pozornost
