

Stanovení léků a návykových látek

Petr Breinek

Proč se u některých léků stanovuje jejich množství v krvi?

- Hrozí jejich toxický účinek
- Některé mají úzké terapeutické rozmezí
- Lékař pozoruje nedostatečnou terapeutickou odpověď
- Je potřeba kontrolovat terapii
- Je podezření, že pacient léky neužívá
- Existuje dostupná metoda pro jeho stanovení

Terapeutické rozmezí

- Rozmezí mezi nejnižší koncentrací léku, při které se objevuje jeho účinek a nejvyšší koncentrací, při které se ještě neobjevuje toxický účinek léku

Analyzovaný materiál

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

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

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

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.

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

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

Farmakogenetika a farmakogenomika

Studují individuální genetický vliv na farmakokinetiku farmakodynamiku

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

„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. CYP450 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)

Metody stanovení

1. Chromatografické metody

HPLC

HPLC/MS

LC/MS

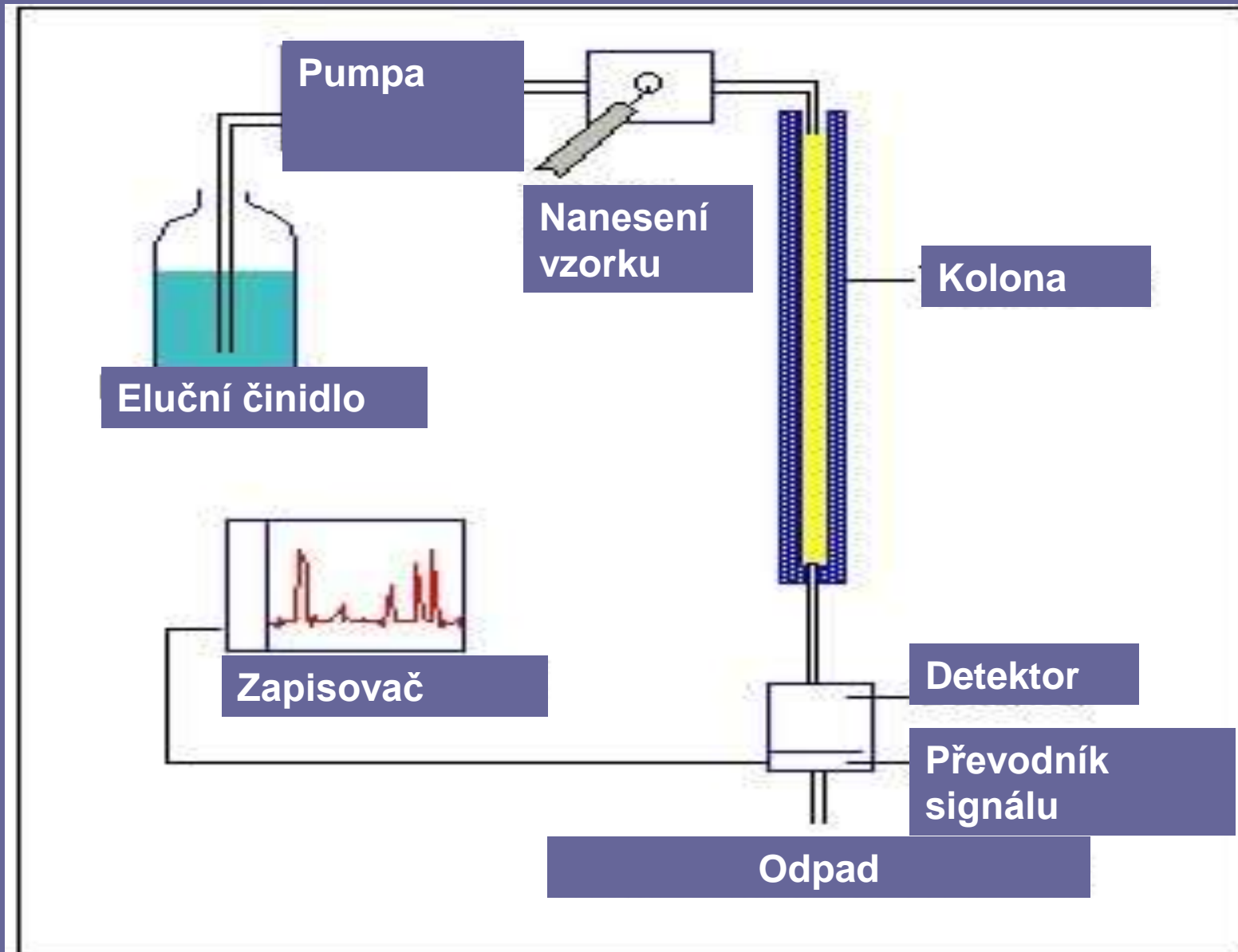
GC/MS

TLC

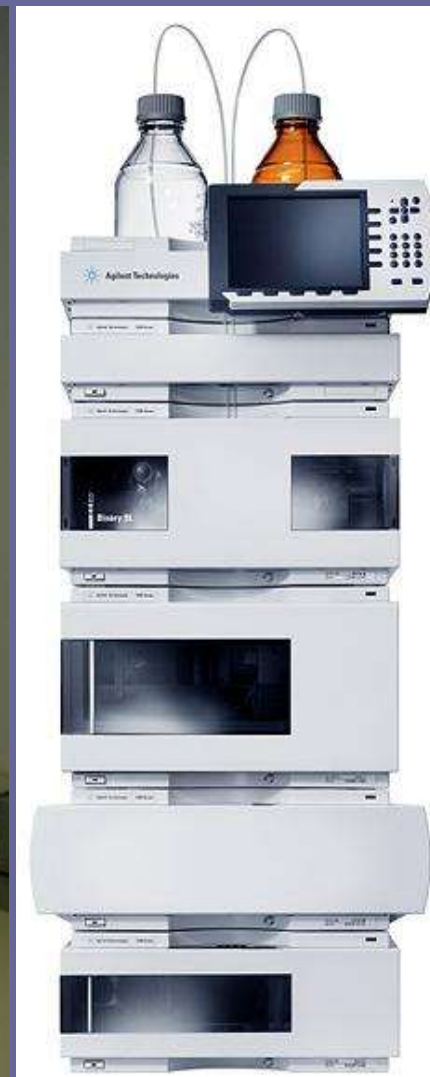
Techniky úpravy vzorků:

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

HPLC – jednoduché schéma



HPLC



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)

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 indikován při srdečním selhávání
- DLIF (digoxin-like immunoreactive factor)
- DLIS (digoxin-like immunoreactive substance)

LITHIUM

- Odběr: srážlivá krev
10-18h po podáním
- Terapeutická hladina: 0,5-1,2 mmol/l
- Profylaxe maniodepresivního onemocnění
- Stanovení: nejčastěji PES(plamenová emisní spektrometrie)

Toxikologie a návykové drogy

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

Alkohol (etanol)

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

Enzymové stanovení

Oxidace etanolu pomocí alkoholdehydrogenázy

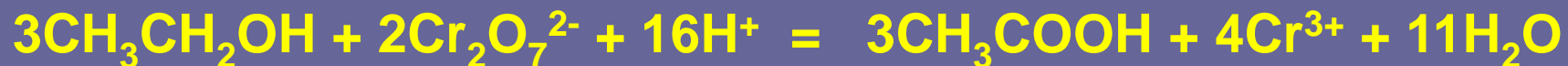


Etanol

Acetaldehyd

Widmarkova zkouška

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



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-tetrahydrokanabinol (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

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

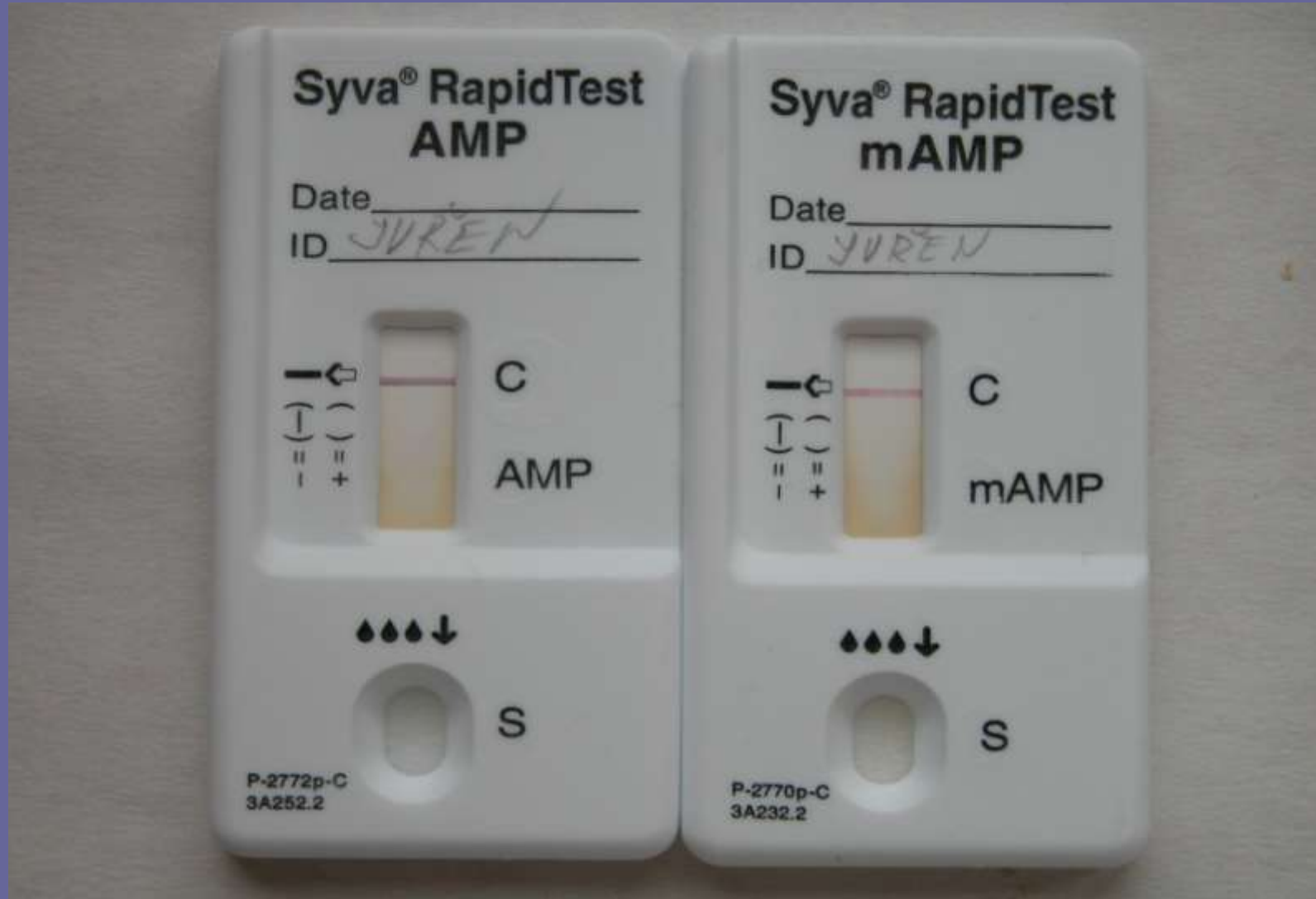
HPLC/MS

LC/MS

GC/MS

TLC

Kazetový test (pozitivní na amfetaminy)



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, ...)