

Stanovení léků a návykových látek



Mgr. Zuzana Stražilová

Dle přednášky Petra Breineka, Jana Bultase¹

Proč se u některých léků stanovuje jejich koncentrace?

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**
- **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)

Kdy stanovení koncentrace léku není indikováno

Účinek léku je stanovován jinak, např.:

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

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

→ 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**

TDM

Interdisciplinární charakter !!!

Ošetřující lékař:
vedení léčby pacienta

Účinná mezioborová spolupráce

```
graph TD; A["Ošetřující lékař:  
vedení léčby pacienta"] <--> B["Účinná mezioborová spolupráce"]; B <--> C["Klinická farmakologie:  
interpretace a výpočet  
farmakokinetických  
parametrů"]; B <--> D["Klinická biochemie:  
stanovení koncentrace  
léčiva v biologickém  
materiálu"]; C <--> D;
```

Klinická farmakologie:
interpretace a výpočet
farmakokinetických
parametrů

Klinická biochemie:
stanovení koncentrace
léčiva v biologickém
materiálu

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

TDM

- Indikace TDM není nutný pro všechna léčiva
- Existují však léčiva s tzv. **úzkým terapeutickým rozmezím**, u nichž je rozdíl mezi účinnou a toxickou koncentrací velmi úzký

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, benzodiazepin, tricyklická antidepresiva)
- V některých případech se stanovují i **metabolity léků**

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

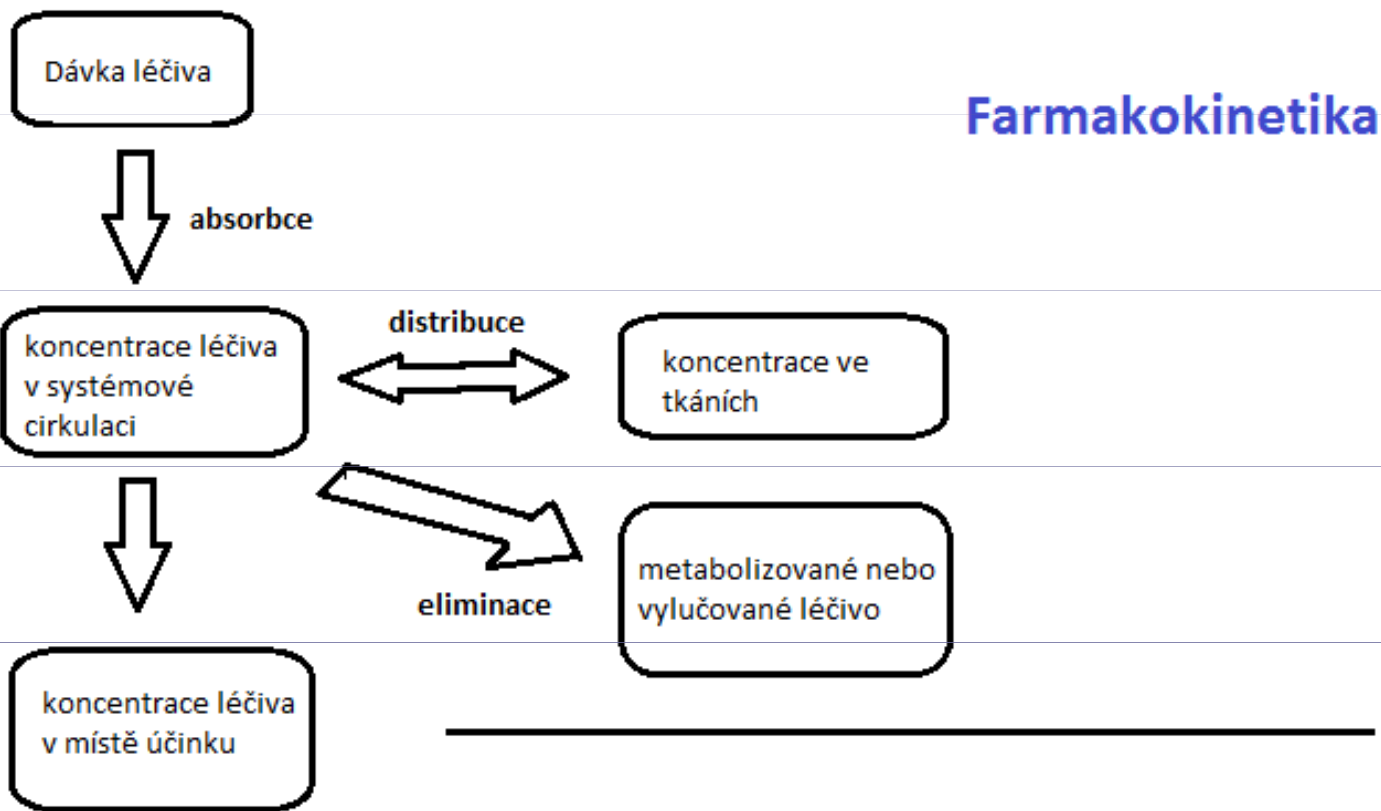
- V ustáleném stavu (steady state)
- **Před další dávkou** („through“) – léky s dlouhým poločasem eliminace, např. digoxin
- **Kdykoli** („random“) - např. fenytoin

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

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)

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**

Absorpce

- Přestup léčiva z místa podání do krevního proudu a systémové cirkulace
- Kompletní přestup při nitrožilním podání
- Bariéry přestupu při jiném typu aplikace

Faktory ovlivňující vstřebání léčiva

- Fyzikální faktory
 - ❖ krevní zásobení
 - ❖ střevo, plíce dobře prokrveny; kůže prokrvena hůře
 - ❖ resorpční povrch
 - ❖ velký ve střevě, v plicích; malý při resorpci kůží
 - ❖ doba kontaktu
 - ❖ snížení resorpce při průjmech,...
 - ❖ potrava – léčivo déle v kontaktu s ↓pH

Faktory ovlivňující vstřebání léčiva

- Fyzikálně - chemické vlastnosti
 - ❖ molekuly lipofilní x hydrofilní
 - ❖ elektrický náboj molekuly
 - ❖ velikost molekuly
- First-pass efekt – „účinek prvního průchodu játry“
 - snížení účinku perorálně přijatého léku tím, že jeho část je před vstupem do systémové cirkulace metabolizována v játrech - presystémový metabolismus
- Transmembránovní transport
 - ❖ Transportní systém
 - ❖ Přejchod přes membrány

Distribuce

- Proces, kdy je léčivo transportováno reverzibilně z krevního řečiště do orgánů a tkání, jakmile koncentrace léčiva v plazmě stoupá. A naopak, transport léčiva z tkání, jakmile koncentrace léčiva v plazmě klesá.
- Probíhá tak dlouho, dokud není dosaženo rovnovážného stavu mezi kompartmenty.

Faktory ovlivňující distribuci léčiva

- krevní proud
 - ❖ mozek s ↑ perfuzí má ↑ konc. léčiva
 - ❖ kosterní stal, tuková tkáň ↓ perfuzi
- struktura kapilár v daném orgánu
 - ❖ v CNS ↓ prostupnost
 - ❖ v játrech ↑ prostupnost
- aktivita membránových transportních systémů (hematoencef., hematoplacent., bariéry)
- vazba na proteiny (transportní a reservoárová fce)
- struktura vlastní molekuly léčiva (lipo- x hydrofilní)

Vazba léků na transportní bílkoviny

- lipofilní molekuly vždy vázány na bílkoviny
- různá afinita k transportnímu proteinu (spec. transport. proteiny)
- účinná je vždy jen volná frakce (nevázaná na protein), tj. zpravidla 1-2%
 - vázaná = inaktivní rezervoár
- vzájemná kompetice molekul na transportních bílkovinách

Metabolismus (biotransformace)

- Proces při kterém organizmus transformuje léčivo (bioaktivuje či biodegraduje) a umožňuje tak jeho vyloučení
- Užitečnou vlastností většiny léčiv – lipofilita – umožňuje přestup přes lipidové bariéry, proto mohou být léčiva podávána p.o.
- Metabolismus je nezbytný pro eliminaci liposolubilních léčiv z organismu, protože umožní přeměnu lipofilních léčiv (které se po eliminaci do moči reabsorbovaly tubuly zpět do org.) na hydrosolubilní léčiva (rychlá eliminace do močí, většinou aniontovými transportéry)
- Skrz metabolismus jsou produkovány nové chemické látky, které mohou vykazovat rozdílné farmakologické účinky než podaná mateřská látka

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)
- Genotypizace CYP2D6 A CYP2C19

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

Exkrece

- proces kterým se organizmus zbavuje léčiva
- cesty:
 - ❖ ledviny (do moče) > játra (žluč → stolice)
> plíce (vzduch)
 - ❖ mateřské mléko, dialýza, kůže, ...

Základní parametry klinické farmakokinetiky

- Distribuční objem
 - Fiktivní pojem
 - Podává informaci o rozdělení látky v organismu
 - Často při stanovení počáteční dávky
 - **Vyjadřuje jak veliký objem tekutiny bychom potřebovali, aby při podaném množství léčiva byla v tomto objemu (při rovnoměrném rozptýlení) stejná koncentrace léčiva jako v plazmě.**
 - Vyjadřuje vztah mezi velikostí dávky a dosaženou koncentrací v plazmě.
 - Je-li distribuční objem velký, pak se jen pomalu zvyšuje hladina léčiva v plazmě; nejdříve se saturuje (nárazová dávka), potom stačí udržovací dávka. Je-li distribuční objem malý, pak se rychle zaplní
 - $V_d = \text{množství léčiva v těle} / \text{koncentrace léčiva v plazmě}$

Základní parametry klinické farmakokinetiky

- **Celková clearance**
 - Objem plazmy zcela očištěné od léčiva za jednotku času (ml/min/kg)
 - Celková, renální, hepatální, nerenální
 - Určuje udržovací dávku
 - charakterizuje výkonnost eliminačních orgánů.
 - Volit léčiva, jejichž eliminace není závislá na orgánu postiženém patologickým procesem
 - léčiva s vysokým podílem CLR obvykle vyžadují úpravu dávkování při renální nebo hepatální insuficienci
- **Biologický poločas (plazmatický)**
 - vyjadřuje dobu, za kterou klesne hladina látky v plazmě o polovinu
- **Biologická dostupnost**
 - Podíl účinné látky, která se dostává do systémového krevního objemu

Biologická dostupnost

- **frakce podaného léčiva (látky), která se dostane do systémové cirkulace**

Faktory ovlivňující biologickou dostupnost

- biotransformace ve střevě a v játrech při prvním průchodu tráv. traktem (first pass efekt)
- afinita k influxním či efluxním pumpám ve střevě/játrech, lipofilní látky mají ↑ afinitu
- rozpustností molekuly (lipofilní zpravidla lépe vstřebány prostou difuzí)
- stabilitou molekuly (rozklad acidolabilních mol.)
- lékovou formou (velikost partikulí - mikronizace)
- fyz. chem. vlastnosti molekuly a vehikul
- pH žaludku a střev

Biologický poločas (plazmatický)

- vyjadřuje dobu, za kterou klesne hladina látky v plazmě o polovinu

Klinický význam biologického poločasu

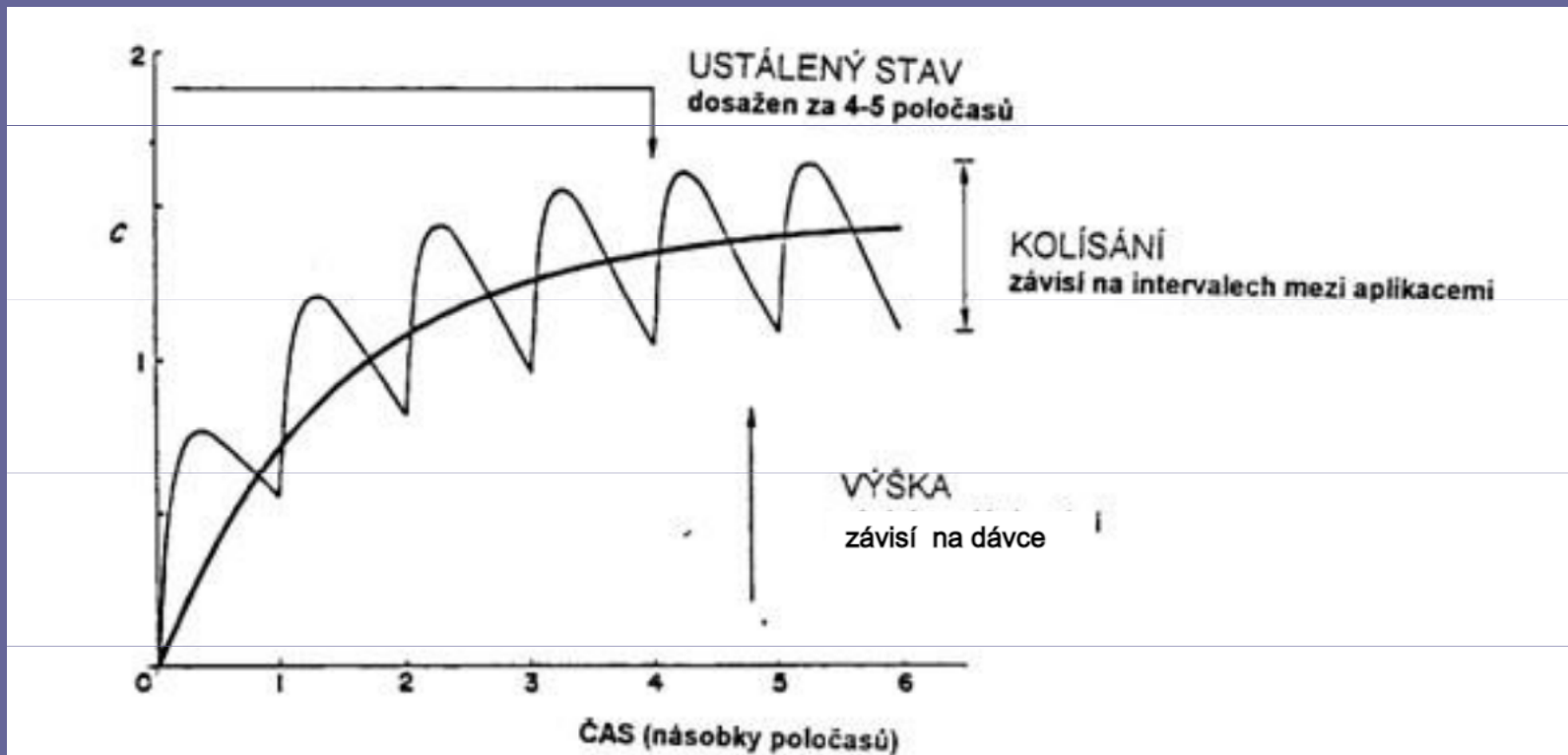
1. Odhad trvání účinku
2. Odhad toho zda dojde ke kumulaci léčiva, a pokud ano, kdy se hladina ustálí (za 4-5 poločasů)
3. Odhad toho, kdy dojde k téměř úplné eliminaci léčiva po jeho vysazení (za 4-5 poločasů)

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

Jaká část léku přetrvává v plazmě za 4-5 poločasů?

Eliminace léčiva během 5 poločasů		
Čas (násobky $t_{1/2}$)	% výchozí hodnoty	Celkem eliminováno %
0 – na počátku	100	0
1	50	50
2	25	75
3	12,5	87,5
4	6,2	93,8
5	3,1	96,9

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 a farmakogenomika

- 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, ...)

Stanovení koncentrace léčiv v biologickém materiálu

❑ **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)

Stanovení koncentrace léčiv v biologickém materiálu

□ *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

Stanovení koncentrace léčiv v biologickém materiálu

❑ **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*
- ❖ inhibitory tyrozinkinázy: *Nilotinib, Imatinib*
- ❖ imunosipresiva: *Kyselina mykofenolová*

❑ **LC-MS/MS**

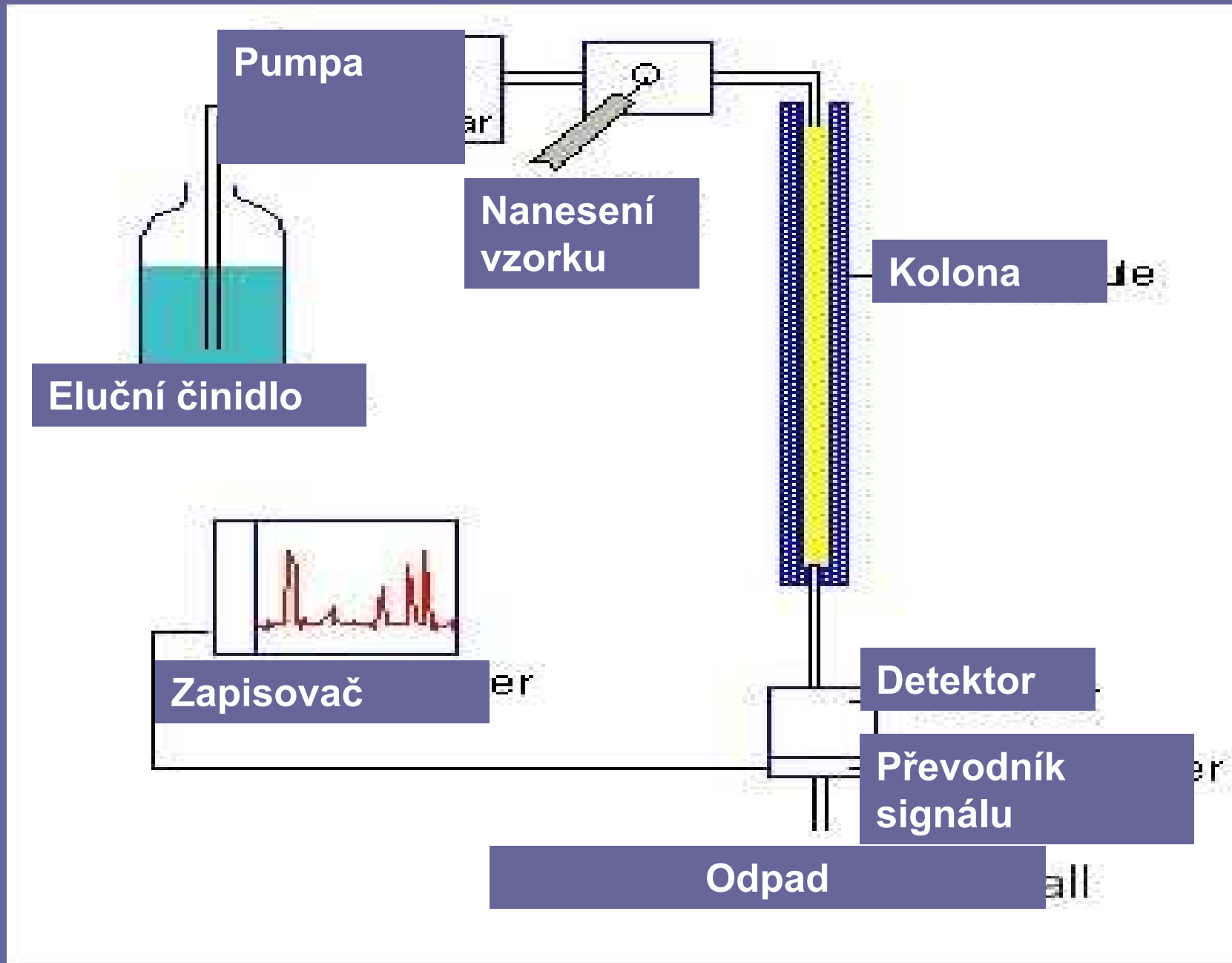
- příprava vzorků stejná jako u HPLC, odpadá potřeba případné derivatizace
- velmi vysoká citlivost a specifita, robustnost, možnost rozlišení i jednotlivých metabolitů
- nevýhody: vyšší pořizovací náklady, technická náročnost, vyšší TAT
- ❖ cytostatika: *Busulfan*
- ❖ inhibitory tyrozinkinázy: *Nilotinib, Imatinib*

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)

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

Busulfan

- Součást vysokodávkované protinádorové chemoterapie (před transplantací krvetvorných buněk)
- Velké interindividuální rozdíly
- 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 na reverzní fázi s UV detekcí

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

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

LITHIUM

- Odběr: srážlivá 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