

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát dizertační práce



Chirální a achirální chromatografie ve farmakologii a toxikologii

Ing. Lukáš Chytil

2010

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Farmakologie a toxikologie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav farmakologie 1. LFUK

Školitel: Doc. MUDr. Ondřej Slanař, PhD.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

PODĚKOVÁNÍ

Především bych chtěl poděkovat svému školiteli docentovi MUDr. Ondřeji Slanařovi, PhD. za odborné rady, laskavou pomoc a vedení.

Dále děkuji kolegům z Farmakologického ústavu 1. LF UK a VFN, panu profesoru MUDr. Františku Perlíkovi, DrSc. za to, že mi umožnili realizovat část této práce. Mé další poděkování patří i kolektivu pracovníků Toxikologického oddělení Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN pod vedením paní primářky Ing. Evy Novákové, Csc. za možnost použít nejmodernější analytické metody při realizaci velké části práce. Za zajímavé náměty a spolupráci bych chtěl poděkovat také pracovní skupině pana profesora MUDr. Jiřího Widimského ml., CSc. z III. interní kliniky 1. LF UK a VFN.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	5
SOUHRN	6
SUMMARY.....	7
1. ÚVOD	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	8
2.1 STANOVENÍ TRAMADOLU A O-DESMETYLTRAMADOLU	8
2.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV	9
2.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI	9
3. CÍLE PRÁCE.....	10
4. METODY.....	10
4.1 ANALYTICKÉ METODY	10
4.2 GENOTYPIZACE CYP2D6.....	10
4.3 SOUBOR PACIENTŮ.....	11
4.4 METODY PRO STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT	11
5. VÝSLEDKY.....	11
5.1 ANALYTICKÉ METODY	11
5.2 ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT	15
6. DISKUZE	19
6.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT.....	19
6.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV	20
6.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI	20
7. ZÁVĚR	21
8. LITERATURA.....	21
SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ.....	24

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACB: 2-amino-5-chlorbenzofenon
ACE: angiotenzin konvertující enzym
GC: plynová chromatografie
EMIT: enzyme multiplied immunoassay technique
FID: plamenově ionizační detektor v plynové chromatografii
FPIA: fluorescenční polarizační immunoassay
LC: kapalinová chromatografie
LLE: extrakce kapalnou fází
MACB: 5-chlor-2-(metylamino)benzofenon
MS: hmotnostní spektrometr
 m/z : efektivní hmota iontu
ODT: *O*-desmethyltramadol
PCR: polymerázová řetězová reakce
r: korelační koeficient
RSD: relativní směrodatná odchylka
SD: směrodatná odchylka
SIM: mód hmotnostní analýzy, sledování určitého iontu (iontů)
SNRI: selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
SRM: mód hmotnostní analýzy, sledování charakteristického rozpadu molekuly
TLC: chromatografie na tenké vrstvě

SOUHRN

Předkládaná dizertační práce popisuje formou komentáře k vlastním originálním publikacím vývoj analytických postupů pro analýzu léčiv popř. metabolitů z různých terapeutických skupin. Vedle optimalizace preanalytické a analytické fáze, je věnován velký prostor validaci a interpretaci získaných výsledků. Práce je složena ze tří tématických okruhů: chirální stanovení tramadolu a jeho metabolitu, stanovení antihypertenziv a kvalitativní analýza benzodiazepinů.

V prvním okruhu je popsán vývoj metodik pro chirální analýzu tramadolu a jeho demetylovaného metabolitu *O*-desmetyltramadol (ODT) v moči a v plazmě. Tramadol je centrálně působící analgetikum, jež se užívá v terapii jako racemát. Chování každého enantiomeru se liší: (+)-tramadol inhibuje především zpětné vychytávání serotoninu a (-)-tramadol inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu, (+)-tramadol je desetkrát terapeuticky účinnější než druhý enantiomer. *O*-demetylací katalyzovanou enzymem CYP2D6 v játrech vzniká neaktivnější metabolit (ODT), který je zodpovědný za vznik lékově navozené opioidní analgezie. (-)-ODT vykazuje schopnost inhibice zpětného vychytávání monoaminů zatímco (+)-ODT vykazuje 200 krát vyšší afinitu k opioidním receptorům než mateřská látka. Také metabolická přeměna tramadolu vykazuje stereoselektivní selektivitu. Z toho důvodu je pro fenotypizaci polymorfního cytochromu P450 2D6 výhodné detekovat enantiomery ODT i tramadolu. Nejprve byla analyzována moč a plazma u zdravých dobrovolníků po požití tramadolu a následně byl porovnán výsledek s konkrétním fenotypem. Výsledky dobře korelovaly s genotypizací: poměr ODT/tramadol u středních a rychlých metabolizátorů byl výrazně posunut ve prospěch metabolitu, u pomalých metabolizátorů naopak. Vyvinuté metody byly dále použity pro analýzu moče a plazmy pacientů hospitalizovaných na dětské jednotce intenzivní péče, jimž byl tramadol podán pro tišení bolesti. Koncentrace analytů dobře korelovaly s účinkem a výskytem nežádoucích účinků.

V další části jsou popsány metody pro kvantifikaci antihypertenziv v séru pomocí LC-MS/MS. Stanovení bylo prováděno u pacientů léčených pro potenciální farmakorezistentní hypertenzi, u kterých bylo vysloveno podezření na nedodržování předepsané terapie. Dodržování farmakoterapie u léčby hypertenze, stejně jako např. u léčby epilepsie nebo depresí, má zásadní význam pro úspěšnost léčby. Neužívání předepsané medikace nutí lékaře k hledání příčiny selhání zvolené terapie a navíc ohrožuje také samotného pacienta. Dalším, neméně zanedbatelným aspektem, je i ekonomická stránka věci. Vedle nejčastěji stanovených preparátů-verapamilu a doxazosinu, bylo sledováno dalších 13 léčiv nebo jejich metabolitů užívaných při léčbě hypertenze. Zkoumaný soubor obsahoval 215 pacientů ve věku od šestnácti do devadesáti let, u kterých bylo provedeno 496 analýz. Zastoupení pohlaví bylo vyvážené: 104 žen a 111 mužů. Interpretace naměřených dat byla prováděna na základě publikovaných doporučených hladin léčiv, což kromě potvrzení non-compliance pomohlo odhalit nedostatečné nebo naopak vysoké dávkování léčiva. Výsledky analýz byly dány do souvislosti s věkem, pohlavím, počtem užívaných léčiv a způsobem léčby pacienta. Všeobecně lepší výsledky ve smyslu dodržování terapie byly pozorovány u mužů, zatímco ženy, především nižšího a středního věku, dodržovaly předepsanou farmakoterapii méně často. Dále se ukázalo, že pacienti užívající více preparátů častěji léčbu neužívali, než ti, kteří měli předepsaný jeden nebo dva léky. Naopak konkrétní typ léčiva na dodržování terapie vliv neměl.

Poslední díl je věnován kvalitativní analýze benzodiazepinů nebo jejich metabolitů v moči pro potřeby toxikologické analýzy. Benzodiazepiny tvoří podstatnou část nálezů v toxikologické praxi. Bohužel jejich intenzivní metabolizace znemožňuje v řadě případů detekci mateřské látky v moči. Z tohoto důvodu bylo nutné vyvinout takové analytické metody, které umožní detekovat jak mateřské látky, tak i metabolity, nebo produkty kyselé hydrolýzy konjugátů. Vzhledem ke zdoluhavým a ne vždy lehce proveditelným současným metodám bylo nutné nalézt takový postup, který vyhovuje dnešním vysokým nárokům na přesnost, citlivost a časovou nenáročnost. Vyvinutá metoda v sobě zahrnuje LC-MS/MS analýzu s předřazenou kyselou hydrolýzou a dvojitou extrakcí z bazického a neutrálního prostředí. Pomocí vyvinuté metody je možné prokázat užití všech běžně se vyskytujících benzodiazepinů. Uvedený postup byl úspěšně implementován do laboratorních postupů, běžně užívaných v rámci systematické toxikologické analýzy.

SUMMARY

Development and validation of methods for analysis of several drugs or their metabolites are described in this thesis. The document is presented as a commentary to the original papers, which were published in peer reviewed journals. Discussion on the optimization of each method is presented and covers also method development and influence of preanalytical aspects. Additionally, examples of the application of the developed methods in clinical pharmacology and toxicology are shown. This dissertation consists of three parts: enantiomeric determination of tramadol and its metabolite, determination of some antihypertensive drugs, and qualitative analysis of benzodiazepines.

Development of a method for chiral analysis of tramadol and its desmethylated metabolite *O*-desmethyltramadol (ODT) in human urine and plasma is described in the first part of the thesis. Tramadol is a centrally acting analgetic drug, which is used as racemate in clinical practice. Each enantiomer displays different binding properties for various receptors: (+)-tramadol preferentially inhibits serotonin reuptake while (-)-tramadol mainly inhibits noradrenalin reuptake. (+)-tramadol is considered 10-times more potent than (-)-tramadol. Major active metabolite (ODT), which is considered to be the main agent responsible for the drug-induced opioid analgesia, is formed in the liver predominantly via CYP2D6 enzyme. (-)-ODT possesses potent monoamine reuptake inhibitory activity while (+)-ODT has approximately 200-times the affinity of the parent drug. The metabolic fate of tramadol is also stereoselective. From this reason it was necessary to determine concentrations of both enantiomers for parent drug and ODT for phenotypization of polymorphic cytochrome P450 2D6. Phenotype results were compared with the results of genotypization. Metabolic ratios ODT/T correlated well with genotypes: extensive metabolizers had higher metabolite concentrations while poor metabolizers had metabolic ratios shifted to tramadol. The developed methods were also used for measurement of enantiomers in tramadol treated patients, who were hospitalised in a paediatrics intensive care unit.

LC-MS/MS methods for determination of several antihypertensive drugs are described in second part of the thesis. These analyses were performed to document non-compliance of patients, who were treated with one or more antihypertensive drugs. Eleven methods were developed for determination of antihypertensive drugs including verapamil and doxazosin. To apply the methods blood samples were analysed from 215 (104 female and 111 male) patients aged from 16 to 90 years. Interpretation of the obtained results was based on published therapeutic ranges for each drug that served as discriminating values for low, therapeutic or high levels. The results were compared with age, sex, number of prescribed drugs, and institutionalized or out-patient care. Generally better compliance was observed in men, whilst large non-compliance was observed especially in young and middle aged women. Poor compliance was also noted in patients using more than two pills. The therapeutic group of the prescribed drug did not influence compliance.

The last part of this thesis describes development of analytical method for qualitative screening for benzodiazepines in urine. Benzodiazepines belong among the most widely analysed drugs in toxicological practice. They undergo extensive metabolic conversion that makes difficult to detect parent compounds in urine. It was therefore necessary to develop analytical method suitable for detection of parent compounds, metabolites and glucuronides. Final method consists of LC-MS/MS detection of analytes after acid hydrolysis and consecutive double liquid-liquid extraction. This method was applied for a screening of all common benzodiazepines and it was also implemented in routine laboratory practice. The developed method is conveniently applicable for the routine use since it is accurate and time non-consumable.

1. ÚVOD

Laboratorní diagnostika patří mezi základní vyšetřovací metody v medicíně. Současné moderní metody analytické chemie umožňují stanovit celou řadu látek v klasickém i alternativním biologickém materiálu. Zejména technické pokroky ve spojení chromatografie a hmotnostní spektrometrie umožnily prudký rozvoj aplikací v medicíně a biologii. Ve farmakologii a toxikologii patří tyto metody

zdaleka mezi nejrozšířenější prostředky pro zjištění kvalitativního nebo kvantitativního obsahu látky v biologickém vzorku.

Achirální chromatografické analýzy se už léta rutinně používají například v rámci optimalizace farmakoterapie pro stanovení látek s nízkým terapeutickým indexem u chronicky léčených pacientů, neboť variabilita farmakokinetiky léčiv u lidí je považována za jednu z nejvýznamnějších příčin interindividuální odlišnosti lékové odpovědi na podávané léčivo. V toxikologické praxi se achirální chromatografické separace používají jak pro potvrzení cizorodé substance po předchozím skupinovém screeningovém záchytu, tak i pro kvantitativní doplnění toxikologického vyšetření. Neméně významné je použití achirálních chromatografických metod za účelem stanovení koncentrace etanolu a podobných látek.

Chirální separace nejsou zatím obvykle prováděny v běžném režimu laboratoře klinické farmakologie nebo toxikologie vzhledem k technickým obtížnostem, jež takový typ analýz doprovází. Jejich provoz se soustřeďuje spíše do laboratoří výzkumných center univerzit nebo soukromých subjektů. Je ale nutné dodat, že čím méně jsou tyto techniky rozšířené, tím zajímavější poznatky o metabolismu léčiva podléhajícímu stereospecifickému metabolismu mohou přinést.

Jednou z nových oblastí, kam chromatografické techniky úspěšně pronikly, je mimo jiné farmakogenetika, která se jako nový obor zabývá geneticky podmíněnou variabilitou odpovědi organismu na podané léčivo. Pomocí poměrů koncentrace metabolitů a mateřské látky, která byla stanovena achirální chromatografií, je možné odhadnout funkčnost enzymu popř. genetickou predispozici, odpovídajících za metabolizaci daného léčiva. Analogicky lze při použití chirální analýzy stanovit poměr koncentrací izomerů dané látky a zjistit tak, který isomer je přednostně odbouráván stereospecifickým metabolismem.

Tato práce je předkládána jako komentovaný soubor prací, zabývajících se vývojem chromatografických metod a jejich aplikací ve farmakologii a toxikologii. Součástí je kromě popisu vývoje postupů také vyhodnocení naměřených výsledků a objasnění jejich významu pro experimentální výzkum i klinickou praxi. První část práce je věnována vývoji metod pro chirálního stanovení tramadolu a jeho metabolitu v plazmě a moči, což může být po porovnání s fenotypem přínosné pro predikci výskytu nežádoucích účinků u konkrétní skupiny pacientů. Druhá část práce se zabývá problematikou stanovení sérových hladin různých antihypertenziv, jako nástroje pro průkaz non-compliance. V poslední části je popsán vývoj metody pro kvalitativní průkaz benzodiazepinů v moči. Vzhledem k četnosti výskytu intoxikací těmito léky a dosavadní absenci univerzální detekční metody by vyvinutá metoda podstatně ulehčila postupy v toxikologické analýze a dokázala by řešit případy, které dosavadními způsoby zůstávaly neobjasněny.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 STANOVENÍ TRAMADOLU A O-DESMETYLTRAMADOLU

Tramadol je centrálně působící analgetikum s analgetickým účinkem mezi slabými opioidy a morfinem, které se užívá v terapii jako racemát. Chování každého enantiomeru se liší: (+)-tramadol (1R, 2R-tramadol) inhibuje především zpětné vychytávání serotoninu a (-)-tramadol (1S, 2S-tramadol) inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu (Paar et al 1992; Dayer et al 1997). Navíc bylo zjištěno, že (+)-tramadol je desetkrát účinnější než druhý enantiomer (Frankus et al 1978). Metabolická přeměna tramadolu je velmi obsáhlá – je známo 11 nekonjugovaných a 12 konjugovaných metabolitů (Wu et al 2002). *N*-demethylace a *O*-demethylace mateřské látky probíhá za účasti třech enzymových systémů cytochromu P450: CYP2D6, CYP3A a CYP2B6.

O-demethylací katalyzovanou enzymem CYP2D6 v játrech vzniká neaktivnější *O*-desmethyltramadol (ODT), který je pravděpodobně zodpovědný za vznik lékově navozené opioidní analgezie (Paar et al 1992; Wu et al 2002). (-)-ODT vykazuje schopnost inhibice zpětného vychytávání monoaminů a (+)-ODT, jak bylo prokázáno studií na krysách, je schopen antinociceptivního efektu (Garrido et al 2000). Ve studii prováděné s klonovanými lidskými opioidními receptory bylo prokázáno, že (+)-ODT vykazuje 200 krát vyšší afinitu než tramadol a je proto farmakodynamicky aktivní *in vitro* (Gillen et al 2000).

Cytochrom P450 2D6 je vysoce polymorfní gen svíce než 70 variantními alelami. Jeho polymorfismus může mít velký vliv na fenotyp vedoucí ke kompletním enzymovým deficitům u pomalých metabolizérů a částečný deficit u středních metabolizérů. Farmakokinetika tramadolu a jeho metabolitu je následně ovlivněna deficitem CYP2D6 (Slanař et al 2007). Metabolismus katalyzovaný tímto enzymovým systémem je stereoselektivní (Poulsen et al 1996; Pedersen et al 2006; Halling et al 2008). Geneticky predisponovaní pomalí metabolizéři měli hladinu (+)-ODT extrémně nízkou, zatímco ultrarychlí metabolizéři měli hladinu extrémně vysokou (Kirchheiner et al 2008). Zatím ovšem neexistují přímé důkazy, že farmakokinetika závislá na genotypu má vliv na analgetické působení v klinické praxi a také, že farmakodynamické vlastnosti tramadolu jsou ovlivněny polymorfismem CYP2D6 (Slanař et al 2007; Stamer & Stuber 2007; Kirchheiner et al 2008; Stamer et al 2008). Díky metabolismu tramadolu, který je závislý na aktivitě CYP2D6, může být použit jako bezpečné léčivo k testování enzymové aktivity v humánních farmakogenetických studiích (Pedersen et al 2005).

Cílem první části této vědecké práce bylo vytvoření analytické metody pro chirální stanovení tramadolu s metabolitem v moči i plazmě a pro následující klinické aplikace:

- fenotypizaci CYP2D6 *in vivo* pomocí modelového substrátu tramadolu
- terapeutické monitorování tramadolu u dětí různého věku hospitalizovaných na jednotce intenzivní péče

2.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Spolupráce pacienta ve smyslu dodržování předepsaného dávkování léčiv je jedním ze základních pilířů úspěšné farmakologické léčby. Zatímco stanovení celé řady antiepileptik, antipsychotik a antidepresiv je dnes pro účely terapeutického monitorování běžně dostupné, stanovení antihypertenziv pro účel zjištění compliance nikoliv.

Pro kontrolu dodržování léčebných postupů lze používat například kontroly vyzvednutí léčiv pacientem (Strocchi et al 1996) nebo se balení léků opatřuje elektronickým počítadlem jednotlivých otevření a zavření (Andrejak et al 2000). Určitým preventivním zásahem je i zavádění kombinovaných preparátů pro usnadnění dávkovacích schémat. Přímé stanovování obsahu léčiva v séru se začalo objevovat až v posledních letech (Maurer et al 2004; Iriarte et al 2006; Ferreiros et al 2007; Gonzalez et al 2009; Iriarte et al 2009; Gonzalez et al 2010). Metodiky pro sledování široké škály látek a současné zpracování získaných výsledků však chybí.

Dalším cílem této vědecké práce bylo vyvinout analytické metody pro stanovení různých antihypertenziv (amlodipin, betaxolol, bisoprolol, spironolakton, doxazosin, hydrochlorothiazid, losartan, metoprolol, perindopril, ramipril, rilmenidin, telmisartan a verapamil) u pacientů léčených pro farmakorezistentní hypertenzi. Následně byla naměřená data statisticky zpracována, přičemž byl zkoumán vliv věku, pohlaví, počtu předepsaných léčiv a způsobu péče o pacienta na dodržování předepsané terapie.

2.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI

Přítomnost benzodiazepinů v biologickém materiálu se v toxikologické praxi obvykle prokazuje řadou na sebe navazujících vyšetření. Nejprve je biologický materiál podroben skupinovému screeningovému vyšetření nejčastěji na bázi imunochemických reakcí (např. EMIT, FPIA), které odhalí přítomnost blíže neurčeného benzodiazepinu (Pegon et al 1982; Beck et al 1990; DeRienz et al 2008). Při pozitivním nálezu je vzorek dále vyšetřován specifickými chromatografickými metodami, kde se určuje, o který benzodiazepin se jedná, popřípadě se prokáže falešná pozitivita imunochemické metody. Fakultativně se v některých případech, provádí kvantifikace nálezu v krvi.

Odezva imunochemických screeningových metod může být vyhodnocena jako negativní, jako hraniční záchyt nebo jako záchyt. Tyto metody jsou rychlé, snadno proveditelné a v současnosti tvoří nedílnou součást toxikologických vyšetřovacích schémat. Bohužel pro každou skupinu drog existují látky, způsobující zkříženou reaktivitu imunochemické reakce, a tím falešnou pozitivitu (Rohrich et al 1998; Baden et al 2001; Blank et al 2009; Marin et al 2009; Kovatsi et al 2010). Konečné ověření falešné positivity je možné získat pouze pomocí specifických chromatografických metod.

Posledním cílem této práce bylo vyvinout jednoduchou a spolehlivou analytickou metodu pro screeningové vyšetření na běžné benzodiazepiny nebo jejich metabolity v moči pomocí LC-MS/MS. Popis metody se soustředí jak na přípravu extraktu moče, tak i na optimalizaci metody pro tandemovou hmotnostní detekci. Během zavádění metody jsme kladli důraz na to, aby bylo možné uvedený postup rutinně používat v běžném provozu forenzní nebo klinické toxikologické laboratoře. Součástí práce jsou i statistiky ze zpracovaných reálných případů, které jsme řešili v rámci běžného laboratorního provozu.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem doktorského studia bylo vyvinout citlivé a přesné chromatografické metody pro analýzu léčiv z různých terapeutických skupin pro aplikace ve farmakologii a toxikologii. Konkrétně jsme pro použití ve farmakologických studiích a toxikologické praxi vybrali stanovení enantiomerů tramadolu a jeho aktivního metabolitu v moči a plazmě, stanovení antihypertenziv v séru a kvalitativní analýzu benzodiazepinů v moči. Enantioselektivní analýza tramadolu s metabolitem by měla zejména sloužit pro stanovení metabolického fenotypu, stanovení antihypertenziv jsme vybrali z důvodů objektivizace nedostatečné spolupráce pacientů a analytická metoda pro detekci benzodiazepinů by měla být zařazena mezi rutinní postupy v rámci klinické a forenzní toxikologické analýzy.

4. METODY

4.1 ANALYTICKÉ METODY

- **CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT**

Separace a kvantifikace enantiomerů tramadolu a ODT byla provedena dvěma různými analytickými metodami. K analýze v moči bylo použito chirální GC-MS, zatímco analýza v plazmě byla, vzhledem k nižším koncentracím, prováděna pomocí citlivé LC-MS/MS. Dekonjugace ODT v moči byla provedena enzymaticky působením β glukuronidázy.

- **STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV**

Vzhledem k povaze stanovovaných látek (přítomnost polárních funkčních skupin a termolabilita) a počtu vzorků byla pro analýzu zvolena metoda LC-MS/MS. Pro extrakci analytů ze vzorků séra byla použita extrakce kapalina-kapalina (LLE; amlodipin, betaxolol, bisoprolol, kanrenon, doxazosin, hydrochlorothiazid, losartan, metoprolol, telmisartan a verapamil) nebo extrakce na pevné fázi (SPE; perindoprilát, ramiprilát a rilmenidin). Kvantifikační postupy byly validovány podle mezinárodně platných kritérií (Peters et al 2007), a ověřovaly se u nich všechny důležité parametry (matricový efekt, výtěžnost extrakčního postupu, opakovatelnost, správnost, korelační koeficient kalibrační závislosti, selektivita a sensitivita).

- **PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ**

Benzodiazepiny a jejich metabolity byly detekovány pomocí LC-MS/MS. Samotné chromatografické analýze předcházela dvoustupňová LLE extrakce s předřazenou kyselou hydrolyzou sulfátů a glukuronidů benzodiazepinových metabolitů.

4.2 GENOTYPIZACE CYP2D6

Všechny metody genotypizace jsou založené na metodikách PCR, PCR-RFLP, eventuelně nested PCR-RFLP. Měření bylo prováděno na Farmakologickém ústavu 1. LF UK a VFN.

4.3 SOUBOR PACIENTŮ

• CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Klinická aplikace chirální analýzy tramadolu byla provedena ve dvou souborech pacientů. Obě klinické studie byly odsouhlaseny Etickou komisí VFN a probíhaly v souladu s platnými mezinárodními požadavky pro provádění klinických studií.

Do souboru dospělých pro stanovení fenotypu CYP2D6 se zařazovali zdraví dobrovolníci se známým genotypem CYP2D6. Do druhého souboru pacientů vyžadujících sledování hladin tramadolu byli zařazováni dětští pacienti po získání informovaného souhlasu rodiče nebo jeho zákonného zástupce.

• STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Pro prováděnou studii se vybírali pacienti, léčení pro hypertenzi, jejichž dosavadní léčebné postupy aplikované odborným lékařem v místě bydliště selhaly. Tito pacienti byli proto indikováni k vyšetření popř. hospitalizaci na specializovaném oddělení pro léčbu hypertenze III. Interní kliniky VFN a 1. LF UK v Praze. Pacientům byl odebrán vzorek krve při první návštěvě ambulance nebo při přijetí k hospitalizaci, přičemž byli seznámeni s účelem odběru.

4.4 METODY PRO STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT

Statistické vyhodnocení vlivu demografických údajů na compliance bylo prováděno testováním hypotéz použitím χ^2 na hladině významnosti $p < 0,05$. K porovnání rozdílů mezi skupinami jsme použili T test ($p < 0,05$). Výpočetní část byla provedena programem *STATGRAPHIC Plus*®.

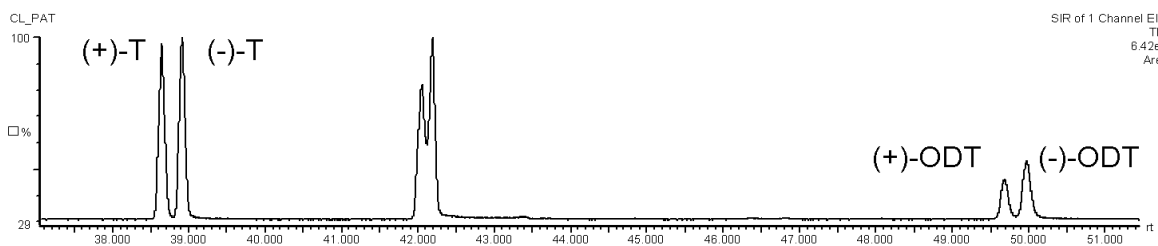
5. VÝSLEDKY

5.1 ANALYTICKÉ METODY

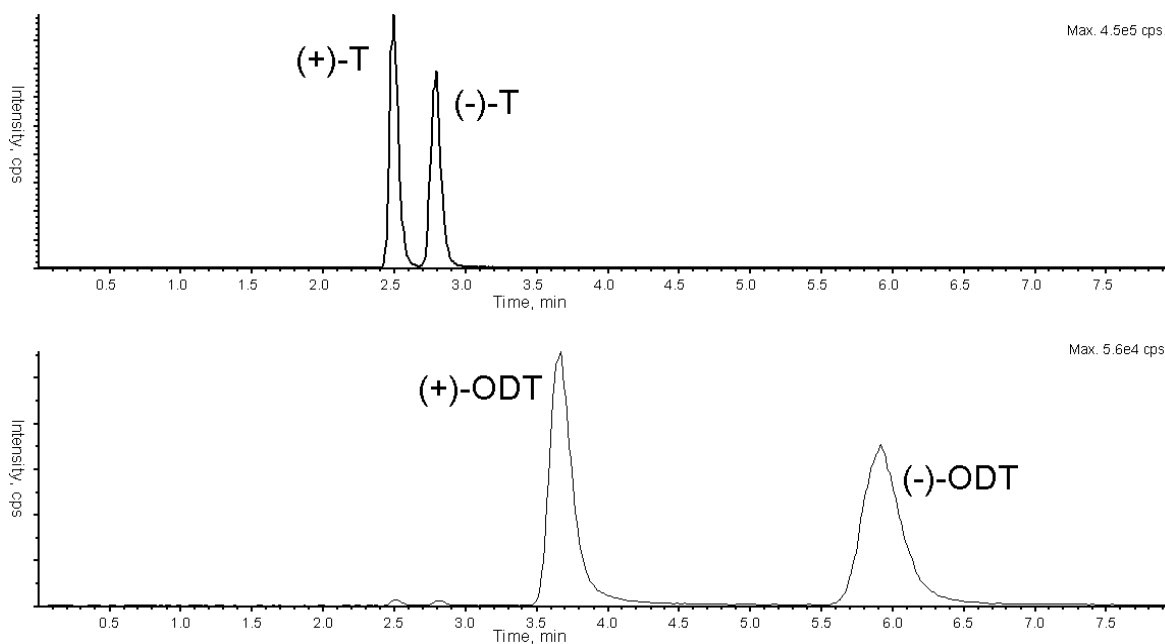
• CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Pro chirální stanovení tramadolu i ODT v moči byla použita kolona s cykloextrinovou fází. Chirální separace analytů v plazmě byla provedena na normálních fázích při použití kolony s náplní obsahující celulózu s navázaným chlorovaným derivátem metylfenylkarbamátu. Enantiomery mateřské látky i metabolitu byly dobře rozděleny jak při GC-MS analýze (Obrázek 1), tak při LC-MS/MS analýze (Obrázek 2). Extrakce sledovaných analytů z plazmy i moče byla provedena pomocí SPE. Metody byly validovány dle mezinárodně platných kritérií. Kalibrační závislost byla popsána lineární rovnicí v obecném tvaru $y = ax + b$. Vhodnost použití lineárního modelu byla ověřena pomocí korelačního koeficientu (r), který musí být větší než 0,99. Při opakované kalibraci ($n = 6$), charakterizují směrodatná odchylka parametrů a , b a r a relativní směrodatná odchylka (RSD) parametru a stabilitu kalibrace. Srovnáním těchto parametrů pro obě metody lze usoudit, že kalibrace byly stabilnější (nižší SD popř. RSD pro všechny parametry) a lineární korelace byly těsnější (vyšší průměry r) pro LC-MS/MS metodu.

V moči jsem kvantifikoval volnou i glukuronidovanou formu analytů, z jejichž srovnání bylo možné posoudit aktivitu glukuronyltransferázy pro každý enantiomer. Důležitou součástí bylo nalezení způsobu jak uvolnit vázanou formu analytů a připravit moč pro analýzu. Všeobecně se dekonjugace glukuronidů provádí buď chemicky (Maurer & Bickeboeller-Friedrich 2000), nebo působením enzymu β glukuronidázy (Moon et al 2008). V rámci optimalizace metody byly zkoušeny oba běžné postupy: dekonjugace pomocí kyseliny a pomocí β glukuronidázy. Při vývoji metody se kladl důraz na zaručení co největší účinnosti a na co nejlepší opakovatelnost, což zaručuje nejvyšší a konstantní výtěžek dekonjugace. Kyselá hydrolýza se ukázala jako nepoužitelná vzhledem k neuspokojivé opakovatelnosti metody. Naproti tomu enzymová hydrolýza vykazovala velmi dobré výsledky. Nejlepší výsledky byly docíleny dekonjugací pomocí 2% roztoku lyofilizovaného enzymu v acetátovém pufru (pH 5) při teplotě 60°C po dobu tří hodin.



Obrázek 1: GC-MS SIM (m/z 58) chromatogram moče dobrovolníka obsahující 1,93 $\mu\text{g/ml}$ (+)-tramadolu [(+)-T], 1,97 $\mu\text{g/ml}$ (-)-tramadolu [(-)-T], 0,73 $\mu\text{g/ml}$ (+)-ODT a 1,08 $\mu\text{g/ml}$ (-)-ODT.



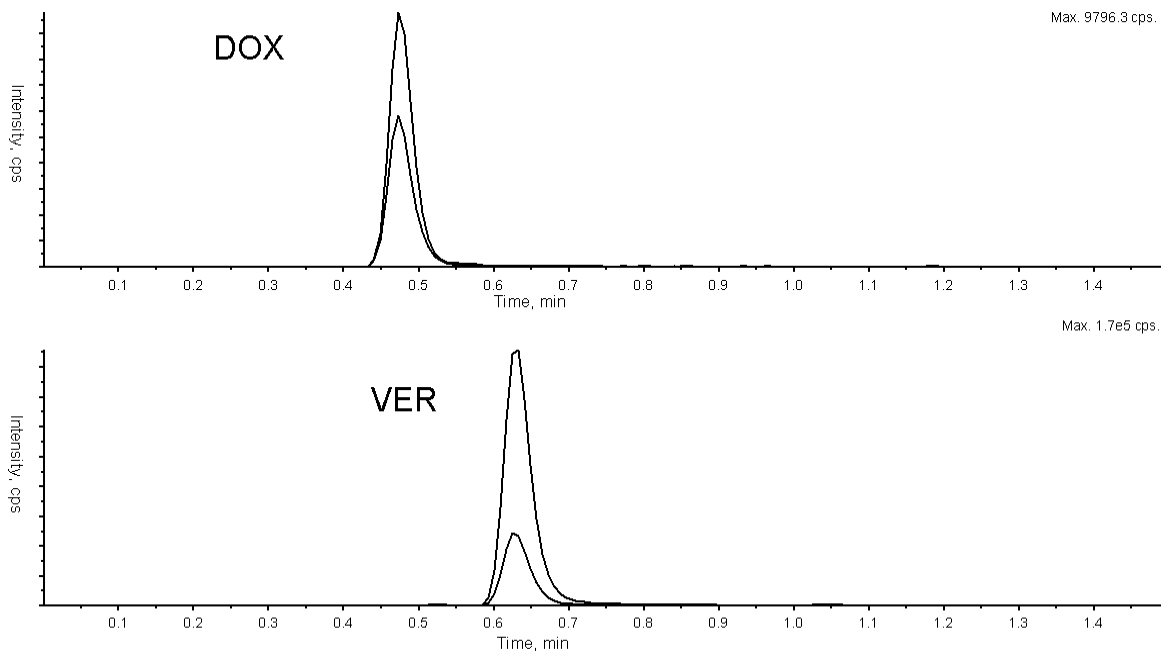
Obrázek 2: LC-MS/MS SRM chromatogramy získané analýzou plazmy dobrovolníka obsahující 83,5 ng/ml (+)-T, 78,2 ng/ml (-)-T, 9,9 ng/ml (+)-ODT a 11,3 ng/ml (-)-ODT.

• STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

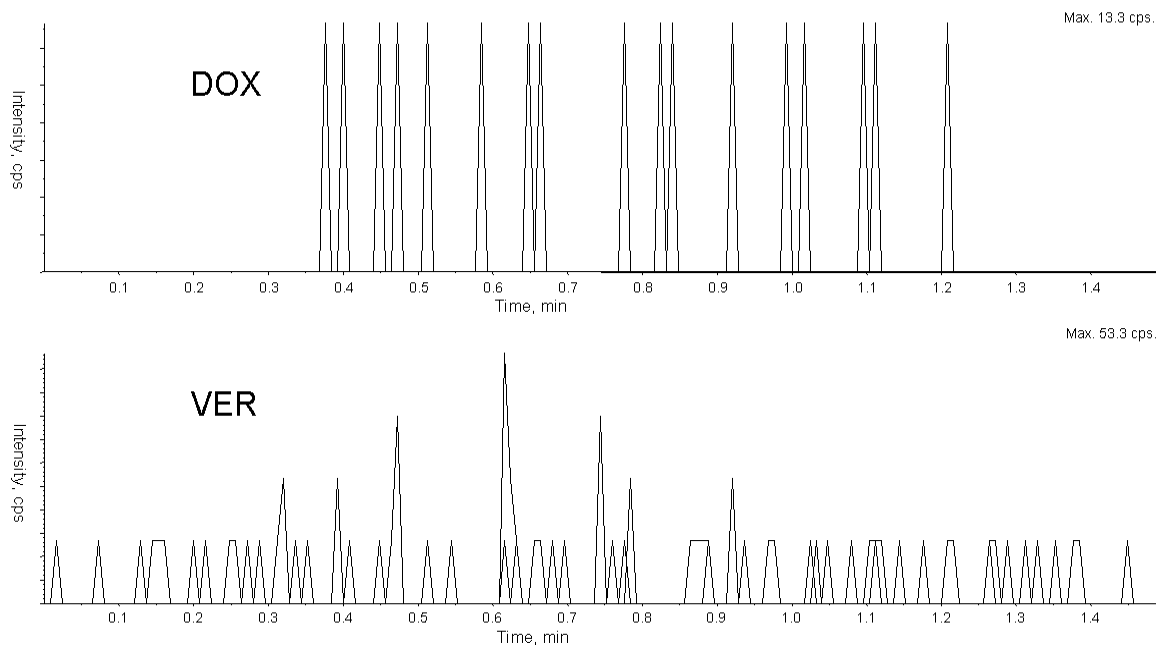
Použití LC-MS/MS se ukázalo jako výhodné, vzhledem k relativně jednoduché přípravě vzorku a relativně rychlému chromatografickému běhu (1,2–2 min). Hodnota koncentrace léčiva v neznámém vzorku byla vypočtena z lineární kalibrační závislosti, jejíž stabilita byla obdobně jako v případě stanovení tramadolu a ODT ověřována výpočtem parametrů SD a RSD pro a , b a r . Všechny metody splnily mezinárodně platná kritéria pro validaci chromatografických metod a staly se tak použitelnými v zamýšleném účelu.

Výsledek analýzy byl pak porovnán s terapeutickými rozmezími, která byla získána z literatury (Schulz & Schmoltdt 2003). Následně byl výsledek interpretován buď jako hodnota v terapeutickém rozmezí, nebo jako hodnota pod nebo nad terapeutickým rozmezím, nebo jako hodnota nedetekovatelná (nulová).

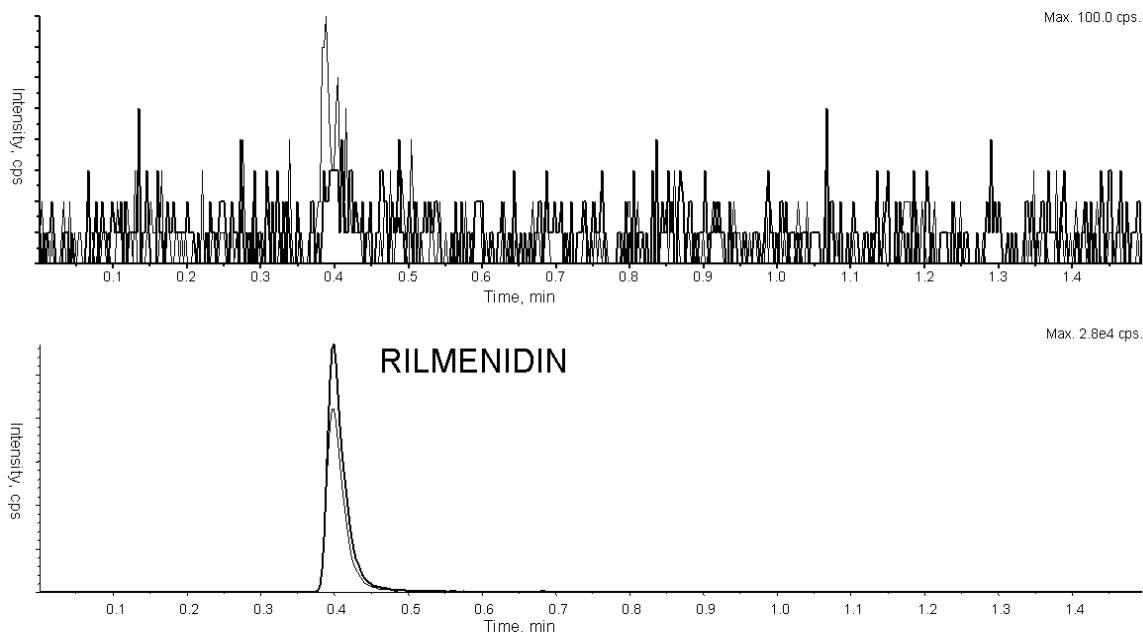
S každým vzorkem séra pacienta byl zároveň analyzován vzorek séra bez přítomnosti analytu (tzv. blank) pro porovnání s patientským vzorkem, což je mimo jiné nutné pro správné posouzení případné negativity. Chromatogramy pacientů s terapeutickou a nulovou hladinou verapamilu, doxazosinu a rilmenidinu v séru jsou znázorněny na Obrázcích 3,4 a 5.



Obrázek 3: LC-MS/MS SRM chromatogramy získané analýzou séra pacienta obsahující 21,4 ng/ml doxazosinu (DOX) a 44,8 ng/ml verapamilu (VER).



Obrázek 4: LC-MS/MS SRM chromatogramy získané analýzou séra pacienta s negativním nálezem doxazosinu a verapamilu.

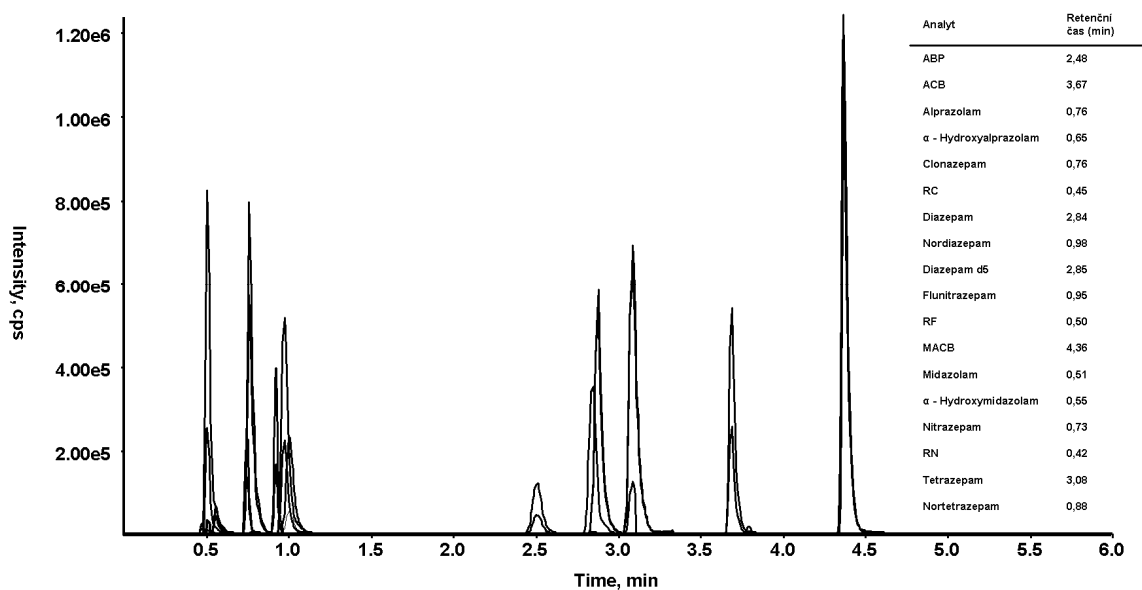


Obrázek 5: LC-MS/MS SRM chromatogramy získané analýzou séra pacienta s negativním nálezem rilmenidinu (nahore) a s nálezem 1,8 ng/ml.

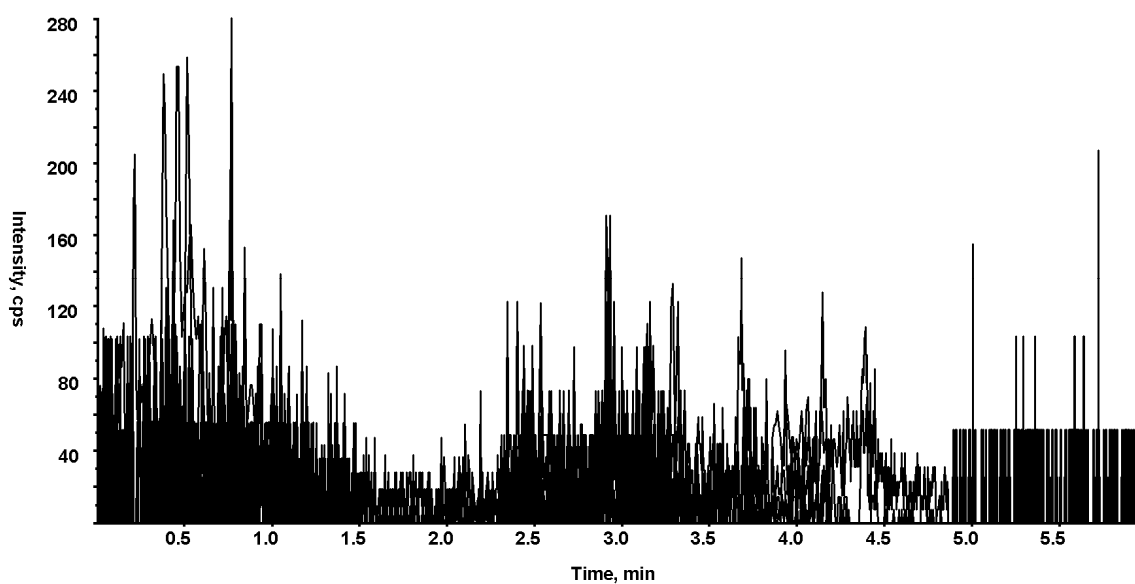
• PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI

Gradientová eluce, použitá pro chromatografickou separaci zaručovala poměrně dobré rozdělení analytů. Pouze v čase okolo 0,5 minuty docházelo k eluci většího počtu analytů, což nezměnila žádná úprava chromatografických podmínek. Tento zdánlivý nedostatek se kompenzoval specifickou tandemově-hmotnostní detekcí. Pro každý analyt byly vybrány dva SRM přechody, což spolu s retencí zaručilo dostatečný průkaz neznámé látky. Vzorek moče byl vždy porovnán s retenčními časy standardů analyzovaných látek (Obrázek 6). Metoda byla testována na reálných případech řešených na Toxikologickém oddělení Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN. Při testování metody byly zpočátku analyzované vzorky souběžně měřeny již ověřenými metodami. Tento způsob ověření funkčnosti metody byl zvolen vzhledem ke komerční nedostupnosti kontrolních vzorků moče s obsahem benzodiazepinových derivátů.

Pro extrakci sledovaných látek byla použita dvojitá extrakce kapalinou z bazického a neutrálního prostředí. Pro rozklad glukuronidů byla extrakci předřazena kyselá hydrolyza koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Tyto postupy se ukázaly jako účinné pro všechny analyty. Vzniklé extrakty obsahovaly značné množství nečistot, ale vzhledem k velmi malému objemu, který byl nastříkovan na kolonu a předřazenému kolonovému filtru, nedošlo ke znečištění analytického systému. Na chromatografických záznamech se nevyskytovaly interferenční peaky, které by ztěžovaly interpretaci naměřených dat (chromatografický záznam negativní moče viz Obrázek 7)



Obrázek 6: LC-MS/MS SRM chromatogram získaný analýzou zkušební testovací směsi benzodiazepinů a jejich metabolitů.



Obrázek 7: LC-MS/MS SRM chromatogram získaný analýzou negativní moči.

5.2 ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT

• CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Do skupiny zdravých dobrovolníků jsme zařadili celkem 12 subjektů. U šesti dobrovolníků byl fenotyp stanoven z moči a u šesti z krve. Ve skupině dospělých dobrovolníků jsme pro účely fenotypizace naměřili hodnoty sumarizované v Tabulce 1.

moč	(+)-ODT/(+)-T	(-)-ODT/(-)-T	(±)-ODT/(±)-T
EM (n = 2)	0,63±0,12	0,51±0,49	0,57±0,07
IM (n = 2)	0,38±0,01	0,30±0,02	0,34±0,02
PM (n = 2)	0,00±0,00	0,51±0,02	0,26±0,18
<i>plazma</i>			
EM (n = 3)	0,36±0,26	0,42±0,33	0,39±0,30
PM (n = 3)	0,02±0,01	0,05±0,01	0,03±0,01

Tabulka 1: Průměrné hodnoty poměrů ODT/T (±SD) v plazmě a moči pro skupinu dobrovolníků pro jednotlivé fenotypy.

Ve skupině fenotypizovaných z krve jsme zaznamenali hraniční statistickou signifikanci rozdílu mezi skupinou PM a EM pro poměry (+)-ODT/(+)-T ($p = 0,07$), (-)-ODT/(-)-T ($p = 0,09$) a (±)-ODT/(±)-T ($p = 0,08$). Trend k nižší tvorbě ODT a zejména (+)-ODT byl jasně pozorovatelný ve všech skupinách s predikovanou nižší aktivitou CYP2D6 a to při fenotypizaci z moči i z krve.

V celém souboru 64 dětských pacientů byli identifikováni 4 pomalí metabolizátoři (PM) s genotypem CYP2D6*4/CYP2D6*4. Ve skupině bylo dále 23 intermediárních metabolizátorů (IM, heterozygotů pro funkčně deficitní alely). Nejčastější deficitní alelou byla CYP2D6*4. V souboru se provedlo celkem 98 analýz. Průměrné hodnoty plazmatické koncentrace analytů ve vzorcích celého souboru a vzorcích bez zahrnutí pacientů s genotypem PM jsou uvedeny v Tabulce 2.

	(+)-T	(-)-T	(+)-ODT	(-)-ODT
Průměrné koncentrace [ng/ml]	140,7±139,4	138,8±135,5	21,7±20,3	40,3±40,4
Průměrné koncentrace bez PM [ng/ml]	139,8±143,1	138,6±139,6	22,5±20,3	42,6±41,0

Tabulka 2: Průměrné koncentrace (±SD) tramadolu a ODT v séru u dětských pacientů.

• STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Soubor pacientů a demografická data

Celkově bylo vyšetřeno 215 pacientů (104 žen), kteří měli užívat 1 až 5 přípravků pro léčbu vysokého krevního tlaku. Pacienti byli rozděleni do tří věkových skupin: do čtyřiceti let, od čtyřiceti let včetně do šedesáti let a konečně od šedesáti let výše. Nejvíce pacientů (118; 54,9 %) bylo pro obě pohlaví ve skupině mezi čtyřicátým a šedesátým rokem. Průměrný věk žen byl 54±14 let a průměrný věk mužů byl 53±11 let. Detailněji rozebírá demografická data Tabulka 3. Celkově bylo provedeno 496 analýz séra. Počet analýz pro určité léčivo shrnuje Tabulka 4.

věk	počet pacientů			počet analýz		
	muži	ženy	celkem	muži	ženy	celkem
do 40	16 (14,4 %)	13 (12,5 %)	29 (13,5 %)	38 (15,1 %)	25 (10,2 %)	63 (12,7 %)
40 - 60	61 (55,0 %)	57 (54,8 %)	118 (54,9 %)	128 (51,0 %)	142 (58,0 %)	270 (54,4 %)
od 60	34 (30,6 %)	34 (32,7 %)	68 (31,6 %)	85 (33,9 %)	78 (31,8 %)	163 (32,9 %)
celkem	111	104	215	251	245	496

Tabulka 3: Počet a zastoupení pacientů a analýz podle věku a pohlaví.

	amlodipin	betaxolol	bisoprolol	doxazosin	hchtz	kanrenon	losartan
57 (11,5 %)	17 (3,4 %)	5 (1,1 %)	127 (25,7 %)	66 (13,3 %)	4 (0,8 %)	23 (4,6 %)	
	metoprolol	perindoprilát	ramiprilát	rilménidin	telmisartan	verapamil	
50 (10,1 %)	30 (6,0 %)	8 (1,6 %)	3 (0,6 %)	19 (3,8 %)	87 (17,5 %)		

Tabulka 4: Počet a zastoupení jednotlivých léčiv (metabolitů) stanovovaných v séru pacientů.

Minimální (bez započtení nekvantifikovatelných a negativních vzorků), průměrné a maximální naměřené hodnoty koncentrace analytů shrnuje Tabulka 5 (bez kanrenonu a rilmenidinu). Hodnoty minimálních koncentrací, které nedosahují na terapeutické rozmezí, mohou být známkou nedostatečného dávkování, individuálně variabilní farmakokinetiky, lékových interakcí nebo nedostatečné compliance. Z farmakogenetického pohledu lze uvažovat i možnost, že pacienti s nízkými nebo naopak vysokými hodnotami mohou vykazovat dědičné odchylky v odbourávání léčiv, odpovědné za neobvykle rychlejší nebo pomalejší metabolizaci daných léčiv.

<i>léčivo v séru</i>	<i>amlodipin</i>	<i>betaxolol</i>	<i>bisoprolol</i>	<i>doxazosin</i>	<i>hchtz</i>	<i>losartan</i>
<i>minimum [ng/ml]</i>	1,4	1,1	16,3	1,0	4,9	7,0
<i>maximum [ng/ml]</i>	55,0	83,0	28,6	174,0	715,0	58,5
<i>průměr [ng/ml]</i>	13,6	26,8	20,5	41,0	92,6	28,9
<i>počet</i>	34	10	4	96	42	12
<i>léčivo séru</i>	<i>metoprolol</i>	<i>perindoprilát</i>	<i>ramiprilát</i>	<i>telmisartan</i>	<i>verapamil</i>	
<i>minimum [ng/ml]</i>	25,6	1,9	6,1	5,0	1,0	
<i>maximum [ng/ml]</i>	618,0	175,0	140,0	130,0	393,0	
<i>průměr [ng/ml]</i>	144,2	29,7	56,6	38,8	122,3	
<i>počet</i>	24	25	5	14	76	

Tabulka 5: Průměrné a extrémní naměřené hodnoty pro stanovovaná léčiva (s vyloučením nulových hladin).

Vliv počtu předepsaných léčiv na compliance pacienta

Nejvíce pacientů bylo léčeno dvojkombinací (116; 54 %), dále trojkombinací (35; 16,3 %), jedním léčivem (34; 15,8 %), čtyřkombinací (25; 11,6 %) a nejméně jich mělo kombinaci pěti léčiv (5; 2,3 %). Porovnáním počtu negativních výsledků v jednotlivých skupinách rozdělených podle počtu předepsaných léčiv lze vypočítat, že čím více léčiv bylo předepsáno, tím horší byla spolupráce pacienta ($\chi^2 = 22,05$; $p = 0,0002$). To je v souladu s dříve publikovanými pracemi (Hussein et al 2010; Benner et al 2009; Burnier et al 2009). Naproti tomu nejlepší spolupráce pacienta byla pozorována při užívání jediného antihypertenziva (85,3 % pacientů). Podrobněji shrnuje data Tabulka 6.

<i>počet léčiv</i>	<i>počet pacientů (%)</i>	<i>100% compliance (%)</i>	<i>non-compliance, počet negativních nálezů (%)</i>				
			<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
5	5 (2,3 %)	2 (40,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	2 (40,0 %)	1 (20,0 %)
4	25 (11,6 %)	10 (40,0 %)	3 (12,0 %)	3 (12,0 %)	1 (4,0 %)	8 (32,0 %)	
3	35 (16,3 %)	19 (54,3 %)	2 (5,7 %)	4 (11,4 %)	10 (28,6 %)		
2	116 (54,0 %)	88 (75,9 %)	18 (15,5 %)	10 (8,6 %)			
1	34 (15,8 %)	29 (85,3 %)	5 (14,7 %)				

Tabulka 6: Závislost počtu negativních výsledků na množství předepsaných léčiv.

Vliv pohlaví a věku pacienta na compliance

Pro hodnocení byli pacienti rozděleni podle pohlaví a věku do tří resp. šesti skupin. U těchto skupin byly vypočítávány podíly spolupracujících - 100 % compliance, částečně spolupracujících - negativní na jedno z předepsaných léčiv (s vyloučením negativních na jedno léčivo při současném podávání jediného léčiva) a zcela nespupracujících pacientů - totální non-compliance (viz Tabulka 7).

Statisticky bylo ověřeno, že compliance je závislá na pohlaví ($\chi^2 = 8,84$; $p = 0,0029$). Souvislost s věkem u obou pohlaví nebyla prokázána (muži: $\chi^2 = 4,39$; $p = 0,1112$, ženy: $\chi^2 = 2,97$; $p = 0,2226$).

Nicméně, porovnáním procentuálních zastoupení v daných skupinách, lze vyzorovat některé trendy. Spolupráce se u obou pohlaví zvyšuje s rostoucím věkem pacienta, přičemž v nejvyšší věkové skupině je u mužů vyšší než u žen (88,2 resp. 70,6 %). U mužů je nejvyšší celková non-compliance pozorována ve věkové skupině do 40 let (12,5 %), stejně jako u žen (30,8 %) a již v této skupině je rozdíl podílu nespolupracujících mezi pohlavími markantní. Ve skupině mezi 40. až 60. rokem je podíl nespolupracujících více než dvakrát větší u žen než u mužů (24,6 resp. 11,5 %). Rozdíl mezi pohlavími se dále prohlubuje ve skupině nad 60 let, u žen je šestkrát větší podíl totálně nespolupracujících než u mužů (17,6 resp. 2,9 %).

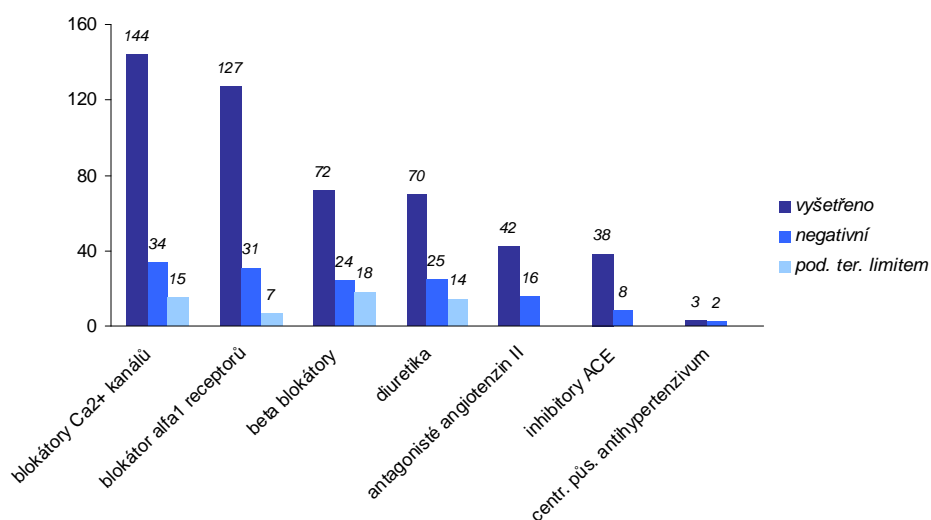
věková skupina	počet pacientů					
	muži			ženy		
	40	40-60	60	40	40-60	60
100% compliance	10 (62,5 %)	47 (77,0 %)	30 (88,2 %)	7 (53,8 %)	30 (52,6 %)	24 (70,6 %)
negativní na jedno léčivo	2 (12,5 %)	6 (9,8 %)	3 (8,8 %)	1 (7,7 %)	8 (14,0 %)	3 (8,8 %)
totální non-compliance	2 (12,5 %)	7 (11,5 %)	1 (2,9 %)	4 (30,8 %)	14 (24,6 %)	6 (17,6 %)

věková skupina	počet analýz					
	muži			ženy		
	40	40-60	60	40	40-60	60
v ter. Rozmezí	23 (60,5 %)	91 (71,1 %)	77 (90,6 %)	13 (52,0 %)	64 (45,1 %)	48 (61,5 %)
pod ter. Rozmezím	2 (5,3 %)	10 (7,8 %)	3 (3,5 %)	1 (4,0 %)	18 (12,7 %)	6 (7,7 %)
negativní	13 (34,2 %)	27 (21,1 %)	5 (5,9 %)	11 (44,0 %)	60 (42,2 %)	24 (30,8 %)

Tabulka 7: Shrnutí compliance pacientů podle věku a pohlaví.

Compliance pro jednotlivé skupiny léčiv

Podíl negativních analýz v jednotlivých skupinách léčiv není dramaticky odlišný ($\chi^2 = 8,3$; $p = 0,1402$). Sumární vyhodnocení nálezů zobrazuje Obrázek 8.



Obrázek 6: Počet a výsledky vyšetřovaných pacientů podle terapeutických skupin předepsaných léčiv.

Vliv druhu péče o pacienta na compliance

Z celkového počtu 215 pacientů bylo 131 (60,9 %) hospitalizováno a 84 (39,1 %) se jich léčilo ambulantně. Podíl spolupracujících pacientů byl mezi hospitalizovanými daleko vyšší než mezi

ambulantně léčenými ($\chi^2 = 16,17$; $p = 0,0001$). Pacientů, kteří byli alespoň na jedno léčivo negativní, bylo mezi hospitalizovanými podstatně méně než mezi ambulantními pacienty. Poměr totálně non-compliantních byl u ambulantních pacientů téměř dvojnásobný (viz. Tabulka 8).

druh péče	počet	100% compliance	1 negativní	totální non-compliance
hospitalizace	131 (60,9 %)	104 (79,4 %)	9 (6,9 %)	16 (12,2 %)
ambulantní	84 (39,1 %)	44 (52,4 %)	14 (16,7 %)	18 (21,4 %)

Tabulka 8: Závislost compliance pacientů na druhu péče.

Hodnota tlaku v závislosti na dodržování léčby

Verapamil a doxazosin jsou podávány pro jejich minimální ovlivnění sérových hladin hormonů podílejících se na regulaci tlaku, což bylo nápomocné pro diagnostiku sekundární hypertenze. Vzhledem k velkému počtu provedených stanovení (87 a 127) bylo možné vyhodnotit vztah mezi výsledkem analýzy a hodnotou systolického a diastolického tlaku. Střední hodnota systolického tlaku (\pm SD) byla u non-compliantních pacientů $190,0 \pm 24$ mm Hg ($n = 25$), zatímco u spolupracujících $161,5 \pm 22$ mm Hg ($n = 54$). Obdobná korelace platila i pro diastolický tlak: non-compliantní $110,0 \pm 17$ mm Hg, spolupracující $98,0 \pm 16$ mm Hg. Rozdíly mezi skupinami nedosáhly ani u systolického ani u diastolického tlaku hranice statistické významnosti. Pacienti s prokázanou nebo suspektní sekundární příčinou hypertenze ($n = 26$) byli vyloučeni z porovnávaného souboru.

• PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI

Vyvinutým analytickým postupem bylo analyzováno celkem 117 močí se záchytem po předchozím imunochemickém screeningu. 26 případů bylo negativních a ve zbylých 91 případech bylo prokázano 116 nálezů různých benzodiazepinů. Neshoda výsledku LC-MS/MS analýz a imunochemického screeningu byla v 16 případech vysvětlena přítomností sertralínu, který může způsobovat falešnou pozitivitu (Nasky et al 2009). U zbylých negativních vzorků se jednalo o příliš nízkou hodnotu hraničního záchytu screeningové metody. Výsledky provedených analýz shrnuje Tabulka 9 (pozn.: vzhledem k nejednotnosti způsobu interpretace nálezů ACB a MACB jsou tyto interpretovány jako metabolity benzodiazepinového derivátu typu diazepam a zahrnují diazepam, medazepam, chlordiazepoxid, oxazepam aj.). 30 případů bylo souběžně zpracováno a analyzováno pomocí jiných zaběhnutých metod (TLC, GC-MS), které se rutinně používají pro průkaz benzodiazepinů. Ve 29 případech byla zaznamenána shoda ve výsledcích. V jednom případě se ukázala kyselá hydrolyza glukuronidů jako nedostačující a vzorek musel být hydrolyzován enzymaticky (Balíková et al 1999). LC-MS/MS analýzou takto připraveného vzorku byla potvrzena přítomnost stopového množství α -hydroxymidazolamu, pro jehož uvolnění byla kyselá hydrolyza nedostačující.

nález	midazolam	alprazolam	met. derivátu typu diazepam	bromazepam	tetrazepam	klonazepam
počet (%)	14 (12,1 %)	21 (18,1 %)	50 (43,1 %)	8 (6,9 %)	2 (1,7 %)	21 (18,1 %)

Tabulka 9: Zastoupení výsledků LC-MS/MS analýz testovaných pro průkaz benzodiazepinů.

6. DISKUZE

6.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Stereoselektivní metody pro stanovení tramadolu a ODT jsme využili při farmakogenetické studii se zdravými dospělými dobrovolníky k ověření možnosti použití tramadolu jako modelového substrátu pro stanovení aktivity CYP2D6 *in vivo*. Ověřovali jsme možnost fenotypizace z krve i neinvazivně z moči. Získané výsledky odpovídaly predikovaným fenotypům založených na genotypu CYP2D6. Porovnávali jsme tři metody hodnocení výsledků fenotypizace pomocí metabolických poměrů (+)-ODT/(+)-T, (-)-ODT/(-)-T a (\pm)-ODT/(\pm)-T. Za nejsenzitivnější lze považovat poměr (+)-ODT/(+)-T, u kterého byl rozdíl

mezi PM a EM nejvýraznější. Toto pozorování je nejspíše způsobeno alternativní metabolickou cestou, která vede ke vzniku (-)-ODT, což ilustrují relativně vysoké naměřené koncentrace tohoto analytu ve sběrech moči u subjektů PM a IM. Díky tvorbě (-)-ODT nezávislé na aktivitě CYP2D6 je potom i metabolický poměr (\pm)-ODT/(\pm)-T méně senzitivní k identifikaci míry deficitu CYP2D6. Díky malým počtům subjektů v genotypových skupinách nedosáhly rozdíly mezi PM a EM statistické significance, které by jinak při nulových koncentracích (+)-ODT u PM bylo ve větším souboru bezpochyby dosaženo.

Hladiny enantiomerů tramadolu a ODT ve skupině dětí vykazovaly vysokou interindividuální variabilitu. Hlavním zdrojem variability hladin v tomto souboru byly proto nejspíše maturační a ontogenetické změny v metabolických cestách podílejících se na biodegradaci léčiva. Vzhledem k tomu, že pro ODT není stanoveno terapeutické rozmezí, nevěnoval jsem se v této práci charakterizaci a hodnocení vztahu hladin ke klinické odpovědi. Toto bude náplní pokračující studie až po získání většího množství pacientů, aby mohla být hodnocena farmakokinetika v jednotlivých věkových a genotypových skupinách pomocí strategie „sparse sampling“.

6.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Stanovení antihypertenziv u pacientů s rezistentní hypertenzí je velmi objektivní způsob ověřování dodržování předepsané farmakoterapie. Na rozdíl od jiných, nepřímých metod, jako je počítání otevření a zavření balení nebo kontrola lékárenské databáze, poskytuje stanovení léčiv ve většině případů uspokojivou a jasnou odpověď. Pro analýzu sér bylo nutné použití validovaných analytických postupů, které zaručují správnost naměřených dat.

Z parametrů, potenciálně ovlivňujících ochotu pacienta spolupracovat, byly zkoumány věk a pohlaví, počet a terapeutické skupiny předepsaných léčiv a druh lékařské péče. U pohlaví byly prokázány zřetelné trendy, které poukazují na rozdílný přístup a zodpovědnost mužů a žen. Při dodržování compliance se ukázali muži jako podstatně zodpovědnější. Porovnáním dat u různých věkových skupin se jako spolehlivější ukázali starší pacienti (nad 60 let). Terapeutická skupina předepsaného léčiva nehrála významnější roli, z čehož plyne univerzálně zamítavý postoj nespolupracujících pacientů k jakémukoliv druhu medikamentózní antihypertenzní terapie. Počet předepsaných léčiv hrál významnou roli: čím více léčiv bylo pacientovi předepsáno, tím horší spolupráce byla pozorována. Způsob péče o pacienta ovlivňoval ochotu spolupracovat. Sérum pacientů, kteří byli léčeni ambulantně, bylo podstatně častěji hodnoceno jako negativní na předepsaná léčiva, naopak pacienti, jimž bylo analyzováno sérum při přijetí k hospitalizaci, byli častěji shledáni jako spolupracující. U pacientů, kteří byli vyhodnoceni jako negativní, bylo doporučeno kontrolované podávání předepsaných léčiv a následná analýza séra pro ověření možnosti odchylek v metabolismu léčiv, které by potenciálně mohly mít za následek negativní výsledek analýzy. Alternativně bylo rovněž doporučeno farmakogenetické vyšetření molekulárně-biologickými metodami k vyloučení ultrarychlého typu metabolismu léčiv. Přestože jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl v hodnotách průměrného systolického a diastolického tlaku u pacientů dodržujících a nedodržujících léčbu, měli pacienti s hladinami léčiv v terapeutickém rozmezí obě hodnoty nižší. V absolutních číslech byl rozdíl průměrných hodnot mezi skupinami 28,5/12,0 mmHg, což je rozdíl klinicky velmi významný. Bez ohledu na nedosažení statistické significance (pravděpodobně z důvodu malé velikosti souboru) lze z klinického pohledu očekávat významně vyšší rizika spojená s nedostatečně kompenzovaným krevním tlakem ve skupině nespolupracujících pacientů.

V současnosti se stanovování hladin antihypertenziv přesouvá z oblasti experimentální do klinické praxe, přičemž stále zůstává nevýhodou relativní nedostupnost a vysoká cena vyšetření.

6.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI

Uvedená metoda byla připravena pro měření vzorků, které jsou podrobovány analýze v rámci STA v laboratoři klinické i forenzní toxikologie. Vývoj metody byl požadován z důvodu nahrazení dosavadního systému tenkovrstevné chromatografie, který je rozšířen zejména v České republice. Při tenkovrstevné chromatografii se zpracovává minimálně 20 ml moče pro kyselou hydrolýzu a 50 ml pro extrakci z alkalického prostředí. Takové množství biologického materiálu může být samo o sobě značně komplikující např. při požadavku na analýzu moče u oligourických/anurických pacientů. Další

nevýhodou TLC je častá přítomnost interferujících skvrn v chromatogramu, což ztěžovalo, nebo úplně znemožňovalo interpretaci nálezu. Navíc při běžném postupu nebylo možné prokázat alprazolam a midazolam, k čemuž se musela použít buď odlišná chromatografická soustava pro vývoj TLC chromatogramů (v případě midazolamu) nebo dokonce GC-MS analýza (v případě alprazolamu). Provedení GC-MS ovšem předchází zdlouhavá enzymatická hydrolýza, extrakční procedura a derivatizace. Navíc při analýze produktů enzymatických hydrolýz dochází k nevratnému poškození kolony plynového chromatografu, což značně zkracuje obvyklou životnost této důležité a nákladné části měřicího systému. LC-MS/MS analýza se ve více jak ročním provozu osvědčila a zdá se, že nic nebrání její plné implementaci mezi běžně užívané postupy. Po rozšíření parametrů hmotnostní detekce o všechny původní formy (clobazam, bromazepam aj.) se může metoda testovat pro analýzu séra na přítomnost benzodiazepinů, což by dále prokázalo univerzálnost vyvinutého postupu.

7. ZÁVĚR

Předkládaná práce se zabývala aplikacemi chirální a achirální chromatografie ve farmakologii a toxikologii. Tři příklady aplikací ilustrují důležitost moderní kvalitativní a kvantitativní analýzy biologického materiálu pro terapeutické i výzkumné účely.

Výsledky lze obecně shrnout v těchto bodech:

- chirální stanovení léčiv v biologických matricích přináší velmi cenné poznatky o průběhu stereoselektivního odbourávání léčiv, což může být významné při hledání příčiny sníženého účinku nebo naopak toxicity u individuálních pacientů
- chirální stanovení léčiv v biologických matricích poskytuje senzitivnější metodu pro fenotypizaci aktivity metabolické přeměny u modelových substrátů se stereoselektivní farmakokinetikou než achirální analýza
- pomocí stanovení sérových hladin antihypertenziv lze stanovit rozsah compliance pacientů s doporučeným terapeutickým režimem na individuální i populační úrovni
- pomocí stanovení sérových hladin antihypertenziv jsme zjistili zastoupení nespolupracujících pacientů ve skupině hypertoniků s diagnostikovanou rezistencí ke kombinované antihypertenzní léčbě a zároveň jsme popsali rozdíl v průměrných hodnotách krevního tlaku ve skupině pacientů nedodržujících a dodržujících doporučené terapeutické režimy
- vyhodnocením naměřených dat jsme zjistili, že pohlaví, rozsah medikace a způsob péče o pacienta mají vliv na ochotu dodržovat předepsanou farmakoterapii, zatímco vliv věku a terapeutické skupiny předepsaného léčiva je menší a v našem souboru nebyl statisticky významný
- metoda kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí pro průkaz celé škály benzodiazepinů se ukázala jako dostatečně citlivá a spolehlivá, což ji předurčilo k zavedení do klinické praxe

8. LITERATURA

- ANDREJAK, M., GENES, N., VAUR, L., PONCELET, P., CLERSON, P., CARRE, A. (2000) Electronic pill-boxes in the evaluation of antihypertensive treatment compliance: comparison of once daily versus twice daily regimen. *Am J Hypertens* **13**: 184-90
- BADEN, L. R., HOROWITZ, G., JACOBY, H., ELIOPOULOS, G. M. (2001) Quinolones and false-positive urine screening for opiates by immunoassay technology. *JAMA* **286**: 3115-9
- BALÍKOVÁ, M., MAREŠOVÁ, V., VEČERKOVÁ, J. (1999) Sensitivity of GC-MS in the detection of benzodiazepines in the urine in the form of trimethylsilyl derivatives. *Soud Lek* **44**: 34-42
- BECK, O., LAFOLIE, P., ODELIUS, G., BOREUS, L. O. (1990) Immunological screening of benzodiazepines in urine: improved detection of oxazepam intake. *Toxicol Lett* **52**: 7-14
- BENNER, J. S., CHAPMAN, R. H., PETRILLA, A. A., TANG, S. S., ROSENBERG, N., SCHWARTZ, J. S. (2009) Association between prescription burden and medication adherence in patients initiating antihypertensive and lipid-lowering therapy. *Am J Health Syst Pharm* **66**: 1471-7

- BLANK, A., HELLSTERN, V., SCHUSTER, D., HARTMANN, M., MATTHEE, A. K., BURHENNE, J., HAEFELI, W. E., MIKUS, G. (2009) Efavirenz treatment and false-positive results in benzodiazepine screening tests. *Clin Infect Dis* **48**: 1787-9
- BURNIER, M., BROWN, R. E., ONG, S. H., KESKINASLAN, A., KHAN, Z. M. (2009) Issues in blood pressure control and the potential role of single-pill combination therapies. *Int J Clin Pract* **63**: 790-8
- DAYER, P., DESMEULES, J., COLLART, L. (1997) [Pharmacology of tramadol]. *Drugs* **53** Suppl 2: 18-24
- DERIENZ, R. T., HOLLER, J. M., MANOS, M. E., JEMIONEK, J., PAST, M. R. (2008) Evaluation of four immunoassay screening kits for the detection of benzodiazepines in urine. *J Anal Toxicol* **32**: 433-7
- FERREIROS, N., DRESEN, S., ALONSO, R. M., WEINMANN, W. (2007) Validated quantitation of angiotensin II receptor antagonists (ARA-II) in human plasma by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry using minimum sample clean-up and investigation of ion suppression. *Ther Drug Monit* **29**: 824-34
- FRANKUS, E., FRIDERICHS, E., KIM, S. M., OSTERLOH, G. (1978) [On separation of isomeres, structural elucidation and pharmacological characterization of 1-(m-methoxyphenyl)-2-(dimethylaminomethyl)-cyclohexan-1-ol (author's transl)]. *Arzneimittelforschung* **28**: 114-21
- GARRIDO, M. J., VALLE, M., CAMPANERO, M. A., CALVO, R., TROCONIZ, I. F. (2000) Modeling of the in vivo antinociceptive interaction between an opioid agonist, (+)-O-desmethyltramadol, and a monoamine reuptake inhibitor, (-)-O-desmethyltramadol, in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **295**: 352-9
- GILLEN, C., HAURAND, M., KOBELT, D. J., WENNDT, S. (2000) Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human mu-opioid receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**: 116-21
- GONZALEZ, O., IRIARTE, G., FERREIROS, N., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M., JIMENEZ, R. M. (2009) Optimization and validation of a SPE-HPLC-PDA-fluorescence method for the simultaneous determination of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* **50**: 630-9
- GONZALEZ, O., IRIARTE, G., RICO, E., FERREIROS, N., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M., JIMENEZ, R. M. (2010) LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 2685-2692
- HALLING, J., WEIHE, P., BROSEN, K. (2008) CYP2D6 polymorphism in relation to tramadol metabolism: a study of faroese patients. *Ther Drug Monit* **30**: 271-5
- HUSSEIN, M. A., CHAPMAN, R. H., BENNER, J. S., TANG, S. S., SOLOMON, H. A., JOYCE, A., FOODY, J. M. (2010) Does a single-pill antihypertensive/lipid-lowering regimen improve adherence in US managed care enrollees? A non-randomized, observational, retrospective study. *Am J Cardiovasc Drugs* **10**: 193-202
- IRIARTE, G., GONZALEZ, O., FERREIROS, N., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M., JIMENEZ, R. M. (2009) Validation of a fast liquid chromatography-UV method for the analysis of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 3045-53
- IRIARTE, G., FERREIROS, N., IBARRONDO, I., ALONSO, R. M., MAGUREGI, M. I., GONZALEZ, L., JIMENEZ, R. M. (2006) Optimization via experimental design of an SPE-HPLC-UV-fluorescence method for the determination of valsartan and its metabolite in human plasma samples. *J Sep Sci* **29**: 2265-83
- KIRCHHEINER, J., KEULEN, J. T., BAUER, S., ROOTS, I., BROCKMOLLER, J. (2008) Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *J Clin Psychopharmacol* **28**: 78-83
- KOVATSI, L., POULIOPOULOS, A., PAPADAKI, A., SAMANIDOU, V., TSOUKALI, H. (2010) Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the evaluation of niflumic acid cross-reactivity of two commercial immunoassays for cannabinoids in urine. *J Anal Toxicol* **34**: 229-232
- MARIN, S. J., MOORE, C., MCMILLIN, G. A. (2009) Cross-reactivity of phentermine with an immunoassay designed to detect amphetamine in a meconium specimen. *Clin Chem* **55**: 589-90
- MAURER, H. H., BICKEBOELLER-FRIEDRICH, J. (2000) Screening procedure for detection of antidepressants of the selective serotonin reuptake inhibitor type and their metabolites in urine as part of a

- modified systematic toxicological analysis procedure using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **24**: 340-7
- MAURER, H. H., TENBERKEN, O., KRATZSCH, C., WEBER, A. A., PETERS, F. T. (2004) Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Chromatogr A* **1058**: 169-81
- MOON, J. Y., KIM, J. Y., MOON, M. H., CHUNG, B. C., IN, M. K., CHOI, M. H. (2008) Validated gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary cannabinoids purified with a calcium-hardened beta-cyclodextrin polymer. *J Chromatogr A* **1204**: 87-92
- NASKY, K. M., COWAN, G. L., KNITTEL, D. R. (2009) False-Positive Urine Screening for Benzodiazepines: An Association with Sertraline?: A Two-year Retrospective Chart Analysis. *Psychiatry (Edgmont)* **6**: 36-9
- PAAR, W. D., FRANKUS, P., DENGLER, H. J. (1992) The metabolism of tramadol by human liver microsomes. *Clin Investig* **70**: 708-10
- PEDERSEN, R. S., DAMKIER, P., BROSEN, K. (2005) Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. *Clin Pharmacol Ther* **77**: 458-67
- PEDERSEN, R. S., DAMKIER, P., BROSEN, K. (2006) Enantioselective pharmacokinetics of tramadol in CYP2D6 extensive and poor metabolizers. *Eur J Clin Pharmacol* **62**: 513-21
- PEGON, Y., POURCHER, E., VALLON, J. J. (1982) Evaluation of the EMIT Tox enzyme immunoassay for toxicological analysis of benzodiazepines in serum. *J Anal Toxicol* **6**: 1-3
- PETERS, F. T., DRUMMER, O. H., MUSSHOFF, F. (2007) Validation of new methods. *Forensic Sci Int* **165**: 216-24
- POULSEN, L., ARENDT-NIELSEN, L., BROSEN, K., SINDRUP, S. H. (1996) The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* **60**: 636-44
- ROHRICH, J., ZORNTLEIN, S., LOTZ, J., BECKER, J., KERN, T., RITTNER, C. (1998) False-positive LSD testing in urine samples from intensive care patients. *J Anal Toxicol* **22**: 393-5
- SCHULZ, M., SCHMOLDT, A. (2003) Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie* **58**: 447-74
- SLANAŘ, O., NOBILIS, M., KVĚTINA, J., MIKOVINY, R., ZIMA, T., IDLE, J. R., PERLÍK, F. (2007) Miotic action of tramadol is determined by CYP2D6 genotype. *Physiol Res* **56**: 129-36
- STAMER, U. M., STUBER, F. (2007) Codeine and tramadol analgesic efficacy and respiratory effects are influenced by CYP2D6 genotype. *Anaesthesia* **62**: 1294-5; author reply 1295-6
- STAMER, U. M., STUBER, F., MUDERS, T., MUSSHOFF, F. (2008) Respiratory depression with tramadol in a patient with renal impairment and CYP2D6 gene duplication. *Anesth Analg* **107**: 926-9
- STROCCHI, E., PRANDIN, M. B., ANTONIOLI, P., LISI, L., MALINI, P. L., AMBROSIONI, E., MAGNANI, M. (1996) Compliance to anti-hypertensive therapy: analysis of data available from prescriptions. *American Journal of Hypertension* **9**: 1
- WU, W. N., MCKOWN, L. A., CODD, E. E., RAFFA, R. B. (2002) In vitro metabolism of the analgesic agent, tramadol-N-oxide, in mouse, rat, and human. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **27**: 193-7

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Sumární IF: 13,413

A. Seznam publikací, které jsou podkladem dizertační práce

CHYTIL, L., ŠTÍCHA, M., MATOUŠKOVÁ, O., PERLÍK, F., SLANAŘ, O. (2009) Enantiomeric determination of tramadol and *O*-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 1937–1942. **IF (2009): 2,777**

CHYTIL, L., MATOUŠKOVÁ, O., ČERNÁ, O., POKORNÁ, P., VOBRUBA, V., PERLÍK, F., SLANAŘ, O. (2010) Enantiomeric determination of tramadol and *O*-desmethyltramadol in human plasma by fast liquid chromatographic technique coupled with mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 481–486. **IF (2009): 2,777**

CHYTIL, L., CVAČKA, J., MAREŠOVÁ, V., ŠTRAUCH, B., WIDIMSKÝ, J., JR., ŠTÍCHA, M., SLANAŘ, O. (2010) Development of a fast LC-MS/MS method for quantification of rilmenidine in human serum: elucidation of fragmentation pathways by HRMS. *J Mass Spectrom* **45**: 1179–1885. **IF (2009): 3,411**

CHYTIL, L., ŠTRAUCH, B., CVAČKA, J., MAREŠOVÁ, V., WIDIMSKÝ, J., JR., HOLAJ, R., SLANAŘ, O. (2010) Determination of doxazosin and verapamil in human serum by fast LC-MS/MS: application to document non-compliance of patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 3167–3173. **IF (2009): 2,777**

CHYTIL, L., MAREŠOVÁ, V., SLANAŘ, O. (2011) Průkaz benzodiazepinů v moči pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. *Soud lék.* **56**: 10–16.

B. Seznam ostatních publikací

MATOUŠKOVÁ, O., SLANAŘ, O., CHYTIL, L., PERLÍK, F. (2010) Pupillometry in healthy volunteers as a biomarker of tramadol efficacy. *J Clin Pharm Ther.* **IF (2009): 1,671 (v tisku)**

MATOUŠKOVÁ, O., SLANAŘ, O., CHYTIL, L., PERLÍK, F. (2010) Pupilometrie jako bioindikátor účinku léčiv. *Čas Lék Česk* **149**: 66–68.