



TÜRK FARMAKOLOJİ DERNEĞİ

XVII. Farmakoloji Eğitim Sempozyumu

Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi Eğitimi

28 Mayıs 2010

Yakın Doğu Üniversitesi

Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

**Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi Eğitimi Toplantı Programı
(28 Mayıs 2010)**

- 09:00–09:30:** KAYIT
- 09:30–10:00:** AÇILIŞ
- 10:00–10:45:** **Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi**
Doç. Dr. Dr. Sinan Çavun (Uludağ Üni. Tıp Fak. Farmakoloji Ab.D.)
- 10:45–11:00:** Tartışma
- 11:00–11:45:** **Terapötik İlaç Düzeyi İzleminde ve Terapötik Alan Dışı İlaç/Madde Analizlerinde Gereksinim Duyulan Temel Farmakokinetik Bilgi ve Bu Bilginin Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi Pratiğine Uyarlanması**
Prof. Dr. Hakan Ergün (Ankara Üni. Tıp Fak. Farmakoloji Ab.D.)
- 11:45–12:00:** Tartışma
- 12:00–13:30:** ÖĞLEN YEMEĞİ ve YAKINDOĞU ÜNİVERSİTESİ TANITIM TURU
- 13:30–14:15:** **Terapötik İlaç Düzeyi İzleminde Analiz Yöntemleri ve Çalışma İlkeleri**
Doç. Dr. Başar Sırmagül (Osmangazi Üni. Tıp Fak. Farmakoloji Ab.D.)
- 14:15–14:30:** Tartışma
- 14:30–15:15:** **Bağımlılık Yapan ya da Kötüye Kullanılan İlaç/Madde Analizleri**
Doç. Dr. Serap Annette Akgür (Ege Üni. BATI Enstitüsü)
- 15:15–15:30:** Tartışma
- 15:30–16:00:** KAHVE ARASI
- 16:00–17:15:** **Panel: Terapötik İlaç Düzeyi İzleminde Farmakologların Yeri**
Moderatör : Prof. Dr. Ersin Yarış (Türk Farmakoloji Derneği Yönetim Kurulu Üyesi; Karadeniz Teknik Üni. Tıp Fak. Farmakoloji Ab.D.)
Uzm. Dr. Yusuf Cem Kaplan (Atatürk Devlet Hastanesi, İzmir)
Uzm. Dr. Alaattin Dilsiz (Sağlık Bakanlığı Sağlık Eğitim Genel Müdürlüğü)
- 17:15–17:30:** KAPANIŞ

Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi (TİDİ)

Doç. Dr. Sinan Çavun

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab.D.

Geçmişten günümüze yeni ilaç geliştirilmesinin amacı terapötik etkisi yüksek olan, buna karşın yan ve/veya toksik etkileri olmayan veya en az olan ilaç tedavilerini kliniğe sokmak olmuştur. İlaçların gerek terapötik gerek istenmeyen etkilerinin ilaç dozu ile çok yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Birçok ilaç için gözlem ve deneylere dayanılarak elde edilen standart doz uygulaması genelde bir sorun oluşturmaz. Buna karşın kalp hastalıkları, bakteriyel enfeksiyonlar, epilepsi, astım, KOAH, immün supresyonun gerektiği durumlar veya psikiyatrik hastalıklarda kullanılan ilaçlar için ise çok daha karmaşık ve kesin doz seçimi yöntemlerinin olması gerekmektedir. Bu yönüyle TİDİ hastanın klinik izlemi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir.

Genel tanım olarak, tedavi sırasında erişilen plato konsantrasyonu hakkında bilgi edinmek ve ilaç konsantrasyonunun yeterli düzeye çıkıp-çıkmadığını kontrol ederek tedavi etkinliğini artırmak veya toksisiteyi önlemek amacıyla vücut sıvılarında bulunan ilaç düzeylerinin ölçülmesine Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi (*Therapeutic Drug Monitoring*) adı verilmektedir.

Önemi ve Tarihsel gelişimi:

İlaçların eliminasyon ve/veya metabolizmasını etkileyen bir çok faktöre bağlı olmak üzere dolaşımdaki ilaç konsantrasyonunun ve buna bağlı olarak ilaç etkisinin değiştiği bilinmektedir. Bütün bu faktörlerle ilişkili olarak özellikle bazı ilaçlar veya ilaç grupları için dolaşımdaki ilaç düzeyinin yakından izlenmesi hastanın klinik takibi açısından bir zorunluluktur. Aksi takdirde organ yetmezliklerinden ölüme, kardiyak rahatsızlıklardan, aritmilere, epilepsi nöbetlerinden organ reddine kadar çok ciddi komplikasyonların ortaya çıkması kaçınılmaz bir sonuçtur.

TİDİ terapötik cevabın derecesini değerlendirmek veya olası toksik ve yan etkileri engellemenin yanında, ilaç tedavisinin uygunluğu hakkında bilgi edinmek, ilaç etkileşimleri ve advers etkileri ortaya koymak bakımından da etkin bir şekilde klinik izlemde kullanılmakta ve laboratuvarlar arasında giderek artan bir öneme sahip olmaktadır.

Tarihte plazmadaki ilaç düzeylerinin analizi ilk olarak 1950'li yılların sonlarında yapılmaya başlanmıştır. Bu yıllardaki ölçümler rutin klinik servislere hizmet etmekten daha çok, araştırma amacı ile yapılmıştır.

“Biyolojik sıvıların içindeki ilaç konsantrasyonu ile ilacın etkisi arasında bir ilişki varsa, biyolojik sıvıların ilaç konsantrasyonlarının ölçülmesi hasta bakımı için yararlı olacaktır” ilkesinin temel alınmasıyla birlikte 1970’li yıllarda Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi rutin klinik kullanıma girmiş ve hastanın klinik takibinin önemli bir parçası olmuştur.

İlk olarak ABD’de, daha sonra Avustralya, Kanada’da ve ardından da İspanya, Hollanda başta olmak üzere Avrupa’da klinik kullanıma giren Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi servisi başlangıç dönemlerinde yalnızca hafta içi çalışma saatlerinde hizmet vermekteyken, sahip olduğu önemin ortaya çıkması ile birlikte 7 gün 24 saat hizmet veren üniteler haline gelmişlerdir.

Ülkemizde Terapötik ilaç düzeyi izlemi ilk olarak Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesinde, Farmakoloji Anabilim Dallarının öncülüğünde 1980’li yılların başlarında yapılmaya başlanmıştır. O tarihlerden günümüze Türkiye’de birçok merkez ilaç düzeylerini, uluslararası standartlara sahip laboratuvar altyapısını oluşturarak bu hizmette yerini almış durumdadır.

Hangi durumlarda TİDİ yapmak gerekir?

- İlacın terapötik penceresi (güvenlik aralığı) dar olduğunda,

- Plazmadaki ilaç ve/veya ilaç metabolitleri ile terapötik veya toksik etkiler arasında direkt bir ilişki söz konusu ise,

- Terapötik etki klinik gözlemlerle değerlendirilemiyorsa,

- Plazma kararlı durum konsantrasyonu bireyler arası büyük farklılıklar gösteriyorsa,

- Belirli bir terapötik konsantrasyon aralığı hedefleniyorsa,

- Terapötik yetmezlik veya uyumsuzluk söz konusu ise,

- Yukarıda belirtilen koşullar yanında, uygun bir analiz yönteminin olması TİDİ için olmazsa olmaz bir koşul veya gerekliliktir.

Yukarıda saydığımız tüm özelliklerin yanında, genel olarak ilaçların farmakokinetiğini etkileyebilecek çeşitli durumlarda da terapötik ilaç düzeyi izlemine gereksinim söz konusu olabilir. Buna göre; ilaç eliminasyon ve metabolizmasını olumsuz etkileyen böbrek ve karaciğer yetmezlik olgularında veya ilaç etkisinin değişmesine neden olabilecek hastalık veya faktörlerin mevcut olması durumunda (hematolojik anomaliler, belirgin kardiyak disfonksiyon, ciddi hava yolu hastalıkları, diabetes mellitus, malnütrisyon, diyaliz hastaları, yaşlılar, çocuklar, obezler gibi) yan etkilerin ortaya çıkması, etkileşme olasılığının artması ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarının gelişmesi söz konusu olabilir.

Özellikle bu ve benzer durumlarda kliniğe yeni girmiş ilaçların kullanılmaları sırasında terapötik ilaç düzeylerinin izlemi çok daha fazla önemlidir.

Hangi durumlarda TİDİ yapılmasına gerek yoktur?

- Çok geniş terapötik aralığa sahip ilaçlar söz konusu ise,

- Dozajın bireyselleştirilmesine gerek yoksa,
- Farmakolojik etki klinik olarak takip edilebiliyorsa,
- İlacın serum konsantrasyonu terapötik veya toksik etki ile ilişkili değilse ilaç düzeylerinin takip edilmesine gerek yoktur.

Terapötik düzeyi takip edilen ilaçlar:

Çeşitli ilaç gruplarında izlemi yapılan ilaçların özeti aşağıdaki listede gösterilmiştir;

1	Kardiyoaktif ilaçlar	Digoksin, digitoksin, amiodaron, lidokain, prokainamid, kinidin, propranolol, flekainid, disopramid
2	Antibiyotikler	Amikasin, gentamisin, tobramisin, vankomisin, netilmisin
3	Antidepresanlar	Lityum, trisiklik antidepresanlar
4	Antiepileptik ilaçlar	Fenitoin, fenobarbital, karbamazepin, valproik asit, etosüksimid, lamotrijin
5	İmmunosüpresif ilaçlar	Takrolimus, sirolimus, siklosporin, evorilimus, mikofenolik asit (MPA)
6	Kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar	Metotreksat
7	Bronkodilatatör ilaçlar	Teofilin, aminofilin
8	Suistimal edilen ilaçlar	Amfetamin, metamfetamin, kokain, metadon, kodein, morfin, meperidin, oksikodon, propoksifen, LSD, fensiklidin
9	Toksikolojik açıdan takip edilenler	Parasetamol, salisilik asit, etanol
10	Proteaz inhibitörleri	İndinavir, ritonavir, lopinavir, atazanavir, nelfinavir,

Genel işleyiş:

Hasta izleminde önemli bir yere sahip olan TİDİ, istekte bulunan doktorun yanı sıra, farmakologun, kan örneklerinin alımında rol alan hemşire, laboratuvar teknisyeni ve teknik destek sağlayan diğer personelin oluşturduğu bir ekibin yürüttüğü sistemdir.

Fiziksel mekan ve altyapı:

Sistemin işletilmesinde gerekli olan temel şartlardan birisi fiziksel mekân ve bunu tamamlayan gerekli altyapıdır. Bu açıdan TİDİ'nin yapıldığı laboratuvarın klimatizasyonunun sağlanmış olması önemli bir ayrıntıdır. Ölçümlerin gerçekleştiği ortamın sürekli sabit bir ısıda olması sonuçların standardizasyonu açısından mutlak bir zorunluluktur. Bu koşulların sağlanamadığı durumlarda TİDİ'nin daha henüz ilk aşamaları olan kalibrasyon ve standart değerlerinin elde edilmesi aşamasında sıkıntılar oluşabilir ve bunun sonucunda da hem zaman kaybı, hem de maliyet artışı söz konusu olabilir.

TİDİ yapılan laboratuvarlar için gerekli altyapının maliyeti oldukça düşüktür. Yukarıda belirtilen klima desteği yanında, santrifüj, mikrosantrifüj, buzdolabı, kesintisiz güç kaynağı ve vorteksin yanı sıra, deiyonize su tesisatının olduğu bir odanın bulunması hasta bakımında son derece önemli bir yere sahip TİDİ için başlıca ekipmanlardır.

Düzeyi takip edilecek ilaçların

belirlenmesi ve satın alınması:

TİDİ yapılan laboratuvarlarda analizi yapılacak ilaçların belirlenmesi, yukarıda bahsettiğimiz ekibin birlikte alması gereken bir karardır. Burada istekte bulunan hekimlerle, analizi gerçekleştirecek laboratuvarın sorumlularının ortak hareket etmeleri, kurumu hem maliyet, hem de gereksiz iş yükü altına sokmamak açısından önemlidir.

Karşılıklı görüşme ve talepler sonucunda düzeyi takip edilecek ilaçların belirlenmesinden sonraki aşama satın alma sürecinin gerçekleşebilmesi için gerekli şartnamenin oluşturulmasıdır. Bu aşamada dikkat edilmesi gereken başlıca noktalar aşağıda özetlenmiştir;

- Kullanılacak kalibratör, kontrol ve sarf malzemelerin temin kolaylığı,
- Teslim edilen kitlerin raf ömürleri,
- Bakım ve onarım hizmetinin güvence altına alınması,
- Teknik destek hizmetinin güvence altına alınması,
- Cihazın Laboratuvar İşletim Sistemi (LİS) ve Hastane Otomasyon (İşletim) Sistemine (HİS) bağlanabilirliği,
- Dış kalite kontrol sistemlerinin temin edilmesi,
- Kitiyle toplu veya ayrı ayrı teklif verilir-verilmeyeceği,

- Testin süresi, getirebileceği ek masraf ve işlemler
- Cihazın kapasitesi gibi konuların detaylı bir şekilde belirlenmesi ve şartnamede yer alması sağlanmalıdır.

Doktorun istemi, örneğin alınması ve laboratuara ulaştırılması:

TİDİ yalnızca laboratuvar ortamında örnekteki ilacın düzeyini tespit etmeye yönelik bir sistem değildir. Analiz öncesi, analiz ve analiz sonrası dönem olmak üzere kendi içinde 3 farklı döneme ayrılan bir sürecin tamamı TİDİ olarak kabul edilip, doktor-hemşire-farmakolog ve teknisyen arasında üst düzey koordinasyonun sağlanması gereklidir.

İlk aşama, doktorun otomasyon sistemi üzerinden veya matbu evrakla, özel bir neden olmadığı sürece ilacın kararlı düzeye ulaşmasından sonra (4-5 yarılanma ömrü), istekte bulunması ile başlar ve hastadan alınan kan örneğinin laboratuara ulaştırılmasıyla son bulur.

Örneğin alınma zamanı TİDİ'nin önemli bir kısmıdır. Bilindiği gibi, ilaç alındıktan sonra kan ilaç düzeyi yükselmeye başlar, t_{maks} kadar bir süre sonra maksimuma ulaşır (pik yapar). Bunun ardından kan ilaç düzeyi düşmeye başlar ve genel olarak da bir sonraki dozdan hemen önce en düşük düzeyine (çukur / trough) geriler. Tekrarlanan dozlarda ilaç alındığı durumlarda değişkenliğin en az olduğu nokta, bir sonraki dozdan hemen önceki

(çukur) zaman dilimidir. Bu nedenle yarılanma ömrü kısa olan ilaçlar için örnekler, bir sonraki dozun hemen öncesinde alınmalıdır. Fenitoin, fenobarbital, amiodaron gibi uzun yarılanma ömrüne sahip ilaçlar için ise herhangi bir zaman diliminde kan örneği alınması herhangi bir sorun oluşturmaz. Sonuç olarak kan örneklerinin alınması için en ideal zaman, ilacın kan konsantrasyonunun kararlı düzeye ulaşmasından sonraki dönemdir. Bununla birlikte örnekleme zamanı özellik arz eden ilaçlar da mevcuttur. Bunların başlıcaları aşağıda belirtilmiştir;

İLAC	ÖRNEK ALINMA ZAMANI
Aminoglikozidler ve vankomisin	İV bolus uygulandıında görülen ciddi yan etkiler yanında, etki mekanizması direkt olarak serumdaki tepe ilaç konsantrasyonuna bağılı olduğu için çukur düzey ile birlikte ilacın pik yaptığı zamanlarda da ölçüm yapılması gereklidir. <i>İV verilmesini takiben 15. ya da 30. dakikalarda örnek alınmalıdır</i>
Siklosporin	Biyoyararlanımının bireyler arasında geniş farklılıklar göstermesi ve klinik sonuçlarının plazma düzeyi ile yakın ilişki göstermesi nedeniyle, <i>ilaç verildikten sonra 2. saatte ölçüm yapılması, çukur zamanda kan örneği alınmasına göre tercih edilmektedir</i>
Digoksin	Toksik seviyelerden kaçınmak amacıyla <i>doz sonrası 6. saatten sonra ölçüm için örnek alınmalıdır</i>
Lityum	Doz ayarlaması için en doğru yönlendirmenin <i>doz sonrası 12. saatte alınan örneğin olduğu gösterilmiştir</i>
Teofilin	Öngörülemeyen bir doz yanıt ilişkisi olması nedeniyle, <i>infüzyon yapıldığı durumlarda, infüzyondan 2-6 saat sonra örnek alınmalıdır</i>

TİDİ için kullanılan örnekler genel olarak serum ve plazmadır. Bunun yanında, diğer vücut sıvıları (tükürük, idrar, gözyaşı vb) ve biyolojik materyaller de ilaç ve suistimal edilen maddelerin analizinde kullanılmaktadır.

Analitik dönem:

TİDİ'nin ikinci aşaması olan analitik dönem üç basamaktan oluşmaktadır. Bunlardan birincisi analiz öncesi örneğin

hazır hale getirilmesidir (santrifüj, sulandırma vb). Bunu çeşitli tekniklerle analiz işleminin gerçekleştirilmesi ve sonunda çıkan sonucun doğrulanması takip eder.

Analiz yöntemleri:

- (1) Radioimmunoassay (RIA)
- (2) Enzym Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)

- (3) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique (ELISA)
- (4) Apoenzym Reactivation Immunoassay System (ARIS)
- (5) High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)
- (6) Turbulent Flow Chromatography (TFC)
- (7) Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA)
- (8) Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS)

Bu dönemin en son basamağı ise test sonuçlarının güvenilirliğinin gösterilmesidir. Bu amaçla;

- Test yöntem ve ekipmanlarının performansının standart bir şekilde çalıştığını göstermek için rutin olarak kalibrasyon ve kalite kontrol testleri (genellikle her gün) yapılmalıdır.
- Laboratuvarlar dış (eksternal) kalite kontrol programlarına katılarak ölçümlerini düzenli aralıklarla dış merkezlerdeki yetkin birimlere göndermeli ve doğruluklarını kanıtlamalıdır
- TİDİ laboratuvarları, doktorun isteminden, sonuçların rapor edilmesine kadar olan tüm aşamaların nasıl yürütüldüğünü gösteren ve bu sayede sistemin standart bir şekilde işlemlerini sağlayan talimat ve prosedürlere sahip olmalıdır.

Analiz sonrası (post-analitik) dönem:

Test sonuçları yazılı veya elektronik ortamda terapötik aralık ile birlikte rapor

edilmelidir. Burada en önemli nokta, test sonuçları toksik bir düzeyi (panik değer) işaret ediyorsa, bunun en kısa zamanda ilgili hekime veya bölüme bildirilmesidir. Bu konuyla ilgili standart bir işleyişin olması mutlaka sağlanmalıdır.

Sonucun yorumlanmasında klinisyen ile birlikte hareket edilmelidir. Bu süreçte her ilaç için geniş hasta gruplarında belirlenmiş tedavi aralığı (tedavi penceresi) referans alınmalıdır. Ancak bazen serumdaki ilaç düzeyinin tedavi aralığında olmasına rağmen terapötik etkinin görülmediği ya da ilaç toksisitesinin geliştiği hastalar olabilir. Benzer şekilde, bu aralığın dışındaki değerler için de bazı hastaların kliniği ilaç düzeyi ile bağdaşmayabilir. Tüm bu nedenlerle, elde edilen serum ilaç düzeylerinin hastanın kliniği göz önüne alınarak yorumlanması gereklidir. Bu yorumlama sırasında sonucu etkileyebilecek faktörlere kesinlikle dikkat edilmelidir. Bu faktörlerin başlıcaları aşağıda sıralanmıştır;

- Son dozla ilişkili olarak örneğin alındığı zaman
- Mevcut dozla tedavinin süresi
- Doz aralığı
- Hastanın yaş ve cinsiyeti
- Aldığı diğer ilaçlar
- Yandaş hastalıkları
- Kilo ve boy olarak sayılabilir.

TİDİ sırasında gözlenen aksaklıklar:

TİDİ sırasında çeşitli basamaklarda çok sayıda problemin çıkma olasılığı söz konusu olabilir. Sorumluların bu ihtimali sürekli göz önünde bulundurarak hareket etmeleri hata oranını azaltmak açısından önemlidir. Bu süreçte yaşanması olası aksaklıklar aşağıda özetlenmiştir;

Analiz öncesi:

- Örnek alım zamanının yanlış olması
- Yanlış örnek alınması
- Yanlış hasta
- Örnek miktarının yetersiz olması
- Hemoliz

Analiz sırasında:

- Cihaz kalibrasyonunun gün içinde bozulması
- Cihazla ilgili teknik hatalar
- Dilüsyonun doğru yapılamaması
- Ortam sıcaklığı gibi çevresel etmenler

Analiz sonrasında:

- LİS ve HİS sistemindeki olası kesintiler
- Hasta sonuçlarının karışması
- Toksik düzey bildirim sırasında yaşanan sıkıntılar
- Sonucu etkileyen etmenlerle ilgili yanlış veya eksik bilgilendirme
- Test sonuçlarının yorumlanmasında hekim-laboratuvar arasındaki iletişim sorunu

Farmaekonomik boyutu:

TİDİ gerek hastane ve sosyal güvenlik kurumu (SGK) harcamaları yönünden,

gerekse hasta yönünden ciddi ekonomik katkıları olan bir sistemdir. Hastaların almış oldukları tedavi sonrası ilaç düzeylerinin etkin ve düzenli bir şekilde denetim altına alınması olabilecek toksik etkileri veya yetersiz tedavileri engelleyerek önemli bir maliyet etkinlik sağlayabilir.

Toksik etkileri engellemek suretiyle, oluşabilecek komplikasyon ve ciddi riskleri azaltarak SGK, hastane ve hasta üzerine ek bir maliyet oluşmasını engeller. Uyum problemleri, subterapötik doz, biyoyararlanım farklılıkları, ilaç etkileşimleri gibi çeşitli nedenlerle etkili olmayan tedavilerin saptanması da, yine gereksiz ilaç tedavisinin ve sonuçta ekonomik kaybın önlenmesi açısından önemlidir.

TİDİ’de gelecek:

Bugün için TİDİ yapan laboratuvarların test yoğunluğu klinik laboratuvar test yoğunluğunun yaklaşık %3-5’lik kısmını oluşturmaktadır. Ancak, insanların yaş ortalamasının yükselmesi ve buna bağlı olarak devamlı alınması gereken veya izlenmesi zorunlu olan ilaçların kullanılması nedeni ile bu oranın çok daha yüksek düzeylere çıkması beklenmelidir.

Belirtilen nedenler yanında, gerek hasta bakımını ve yaşam kalitesini daha yüksek düzeylere çıkarmak, gerekse hasta güvenliği ve maliyet etkinlik açısından TİDİ laboratuvarlarının gelecekte daha fazla öneme sahip olması kaçınılmaz bir sonuçtur. Bu bakımdan, terapötik ilaç

düzeyi izlemi yapan laboratuvarların bu süreçte yalnız ölçümün yapıldığı yerler olarak değil, aynı zamanda klinik süreçte sonuçların yorumlanmasında daha etkin bir role sahip olduğu yapılanma modeline dönüştürülmesine gereksinim vardır.

Terapötik İlaç Düzeyi İzleminde ve Terapötik Alan Dışı İlaç/Madde Analizlerinde Gereksinim Duyulan Temel Farmakokinetik Bilgi ve Bu Bilginin Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi Pratiğine Uyarlanması

Prof. Dr. Hakan Ergün

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

“Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi” (TİDİ) konusu içerisinde ilk vurgulanması gereken temel ilke “kan ilaç düzeyi değil hasta tedavi edilir” ilkesidir. Bu temel ilkeden de anlaşılacağı üzere ilaç kan düzeyi ölçüm sonucu sadece bir rakamdır ve diğer veriler olmaksızın bu rakamı temel alarak yapılan girişimler tıbbi bir anlam ifade etmemektedir (günümüzde hastanın değil laboratuvar bulgularının tedavi edilmesi sorununa benzer şekilde). Diğer bir ifadeyle bu rakamın tıbbi bir anlam taşıması için yorumlanmaya gereksinimi bulunmaktadır. Yorumun doğru yapılabilmesi ise tedavisi yapılan hastalık, hastanın tıbbi durumu, ilaçla tedaviye başlama zamanı, dozu, doz aralıkları, hastanın bu ilaç dışında kullandığı diğer ilaçlar, hastanın cinsiyeti, boyu, ağırlığı gibi fiziksel özellikleri ile en önemlisi söz konusu ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin ayrıntılarıyla bilinmesi gibi temel unsurlardır. Sonuç olarak kan ilaç düzeyinin ölçümüne “TİDİ” denilebilmesi için bu ilaç düzeyi ile ilgili yorumun “eş zamanlı” verilmesi kaçınılmazdır.

Yorumsuz olarak yapılacak olan ilaç düzeyi analizi bu kavram kapsamında değil rutin bir kan düzeyi analizi olarak değerlendirilmelidir. Kavram birliği olması açısından klinisyenler, farmakologlar ve biyokimya uzmanlarının konuyu bu şekilde ele almaları son derece önemlidir. Ancak ne yazık ki sadece Türkiye’de değil tüm dünyada bu kavramın tam oturmaması nedeniyle sıklıkla sorunlar yaşanabilmektedir.

Konuya gösterilen özeni en açık biçimde ortaya koymak açısından Bussey ve Hoffman’ın çalışma sonuçları yol göstericidir¹. Retrospektif olarak yapılan bu çalışmada kan toplanması aşamasında %43 oranında hata yapıldığı, bunun dışında ilaç düzeyi ve önerilerin klinisyenler tarafından yanlış algılanması ile sonuçta tüm izlemlerin %70’inde hataların var olduğu görülmüştür. Her ne kadar bu veriler 1983 yılında yayınlanan bir çalışmaya ait olsa da TİDİ ile ilgilenen kişilerin tanık olduğu üzere bu sorunlar halen yüksek oranlarda devam etmektedir. TİDİ, diğer bir bakış açısıyla güvenli ilaç kullanımının bir aracıdır.

Şu anda ruhsatlı bulunan veya bundan sonra tıbbi kullanıma sunulacak olan ilaçların etkili ve güvenli bir şekilde kullanılabilmesi ile ilgili olarak değişik kapsam ve içerikte risk yönetim planları oluşturulmaktadır. Özellikle kişiler arası etkililik veya advers etki bağlamında geniş varyasyon gösteren ilaçlar için uygun bir dozun bulunması amacıyla ilaç kan düzeylerinin ölçümü risk yönetim planı içerisinde de değerlendirilebilir. Şu anda sıklıkla antiepileptikler, aminoglikozid grubu antibiyotikler, digoksin, vankomisin gibi oldukça uzun zamandır tıbbi kullanımda olan ilaçlar için TİDİ yapılmakla beraber immünoşüpresan ilaçlardan siklosporin, metotreksat, takrolimus gibi nispeten yeni ilaçlar için de TİDİ etkili ve akılcı görünmektedir. TİDİ ile izlenmesi gereken ilaç sayısının daha da artacağı kuşkusuzdur. Bu nedenle TİDİ'nin hastanın tedavisinin planlanmasında, optimize edilmesindeki rolü sürecektir. Bazı ilaçlar için ise etkililik bakımından kişiler arasında varyasyon bulunmakla birlikte, bu ilaçların etkileri doğrudan klinik veya biyokimyasal olarak gözlemlenebilmektedir. Kişiler arası varyasyondan sorumlu olabilecek farmakokinetik özelliklerin dışında farmakodinamik özellikleri de içinde kapsayan ve terapötik hedefin iyi bir ön belirteci (surrogate) olan klinik parametre doğrudan değerlendirilebiliyorsa (kan

basıncı, vücut sıcaklığı, kardiyak ritim, ağrı vb.) veya biyokimyasal olarak gösterilebiliyor ise (kan şekeri, kolesterol vb.) TİDİ'nin rolü azalmaktadır. Ancak epilepsi, immünoşüpresyon gibi birçok klinik durumda yol gösterici olabilecek klinik veya biyokimyasal ön belirteçlerin olmaması bu tür ilaç gruplarında ilaç kan düzeyinin izlenimini vazgeçilmez kılmaktadır.

Melmon'un 1971 yılında ortaya koyduğu ve ilaç advers etkilerinin %70-80'nin doz bağımlı olduğu ile ilgili bilgi, günümüzde rakamsal olarak azalmış olmakla birlikte yüksek bir oranı teşkil etmeye devam etmektedir². Aynı dozun kişiler arası varyasyonunun nedenleri arasında ilaçların farmakokinetik özellikleri ağırlıklı rol almaktadır. TİDİ ile ilişkili olabilecek farmakokinetik parametreler ise ilaçların bu özelliklerini belirleyen ana basamaklarda sırasıyla emilim, dağılım, biyotransformasyon ve eliminasyon bölümlerinde özetlenmiştir.

Emilim

İlaçların emilimi değişik mekanizmalar aracılığıyla olmakla beraber genellikle pasif difüzyonla gerçekleşmektedir. TİDİ açısından emilim basamağında en önemli parametre ilaçların biyoyararlanımıdır. Emilim basamağında biyoyararlanım parametresi kişiler arası varyasyonun en önemli nedeni olduğu gibi aynı hastanın,

hastalık dönemlerine göre de değişkenliğin önemli nedenlerindedir. Buna iyi bir örnek digoksinin sağ kalp yetmezliğinin de eşlik ettiği klinik tablodaki kullanımınıdır. Kalp yetmezliği bulgularının yoğun olduğu tedavinin başlangıç döneminde alınan digoksin'in biyoyararlanımı periferde ve özellikle barsaktaki ödeme bağlı olarak düşük düzeydeyken kalp fonksiyonlarının normale dönmesi sonrasında barsaktaki ödemin azalması dolayısıyla emilim oranı yani biyoyararlanımı artmaktadır. Bunun dışında ilk geçiş etkisine yüksek oranda maruz kalan ve biyoyararlanımı düşük olan bazı ilaçların uzun süre kullanılmalarıyla gelişen doygunluğa bağlı olarak zaman içinde azalan ilk geçiş etkisi biyoyararlanımlarının artması ile sonuçlanabilmektedir (Ör: oral morfin).

Emilim düzeyinde rutin TDM olmayan maddeler ve yine ilaçların oral yol dışında özellikle kas içi veya transdermal olarak uygulanmalarına bağlı olarak önemli sorunlar yaşanabilmektedir. Bu uygulamalardan özellikle kas içine uygulama ve/veya uygulanan ilacın depo, yavaş salınım gibi farklı formları olduğunda, standart tek bir zaman noktasından yapılan örnekleme ile elde edilen kan düzeyi sonucu yeterli ve gerçek yorumlamaya uygun olmayabilir. Bu bağlamda gerek alan içi (TİDİ yapılan ilaçlar) gerek alan dışı (rutin olarak kan ilaç düzeyi analizi yapılmayan) ilaçlarla

ilgili farklı uygulama durumlarında (kas içi, depo farmasötik form, yavaş salıveren tabletler) kan alım zamanlarının iyi belirlenmesi ve yorumlanması gerekmektedir.

Dağılım

Sanal dağılım hacmi hesabı ilaçların dağıldıkları toplam alanı göstermesi bakımından önemli bir farmakokinetik parametredir. İlacın verildikten sonra homojen olmayan, farklı kan akım hızları olan ve yapısal olarak molekülün geçişine farklı düzeyde izin veren özellikleri dolayısıyla ilacın organizmada denge haline gelmesi moleküle göre değişkenlik gösteren bir süreyi almaktadır. Bu süreç ilacın “dağılım fazı” olarak ifade edilmektedir. Örneğin digoksinin i.v. yoldan verilmesinden sonra kan digoksin düzeyi nispeten hızlı bir düşüş göstermekte ve sonradan daha yavaş bir azalma ile zaman boyunca konsantrasyon eğrisi çizmektedir. İlk dönemde ortaya çıkan hızlı düşüş, digoksinin “dağılım fazı” iken 2. ve nispeten daha yavaş olan düşüş ilacın ağırlıklı olarak “eliminasyon fazı”nı yansıtmaktadır. Kan düzeyinin aksine doku digoksin düzeyi ise tedricen artmakta (dağılım fazında olan kan digoksin düzeyinin tersine) ve sonra kan digoksin düzeyi ile beraber paralel bir düşüşe geçmektedir. Digoksin etkisini göstereceği miyokard dokusunda (biyofaz) olan

düzeyi, aynı şekilde zaman içinde artmakta ve dolaylı olarak etkisi de zaman içinde ortaya çıkmaktadır. Digoksin için tanımlanan terapötik pencere dağılım fazını geçtikten ve miyokard dokusu ile kan düzeyi arasında paralelliğin kurulduğu eliminasyon fazında olması gereken düzeyi yansıtmaktadır. Digoksinde farklı olarak bazı ilaçların (tiopental, lidokain) dağılım fazının çok daha kısa sürede tamamlanabildiği de göz önünde bulundurulmalıdır. TİDİ sürecinde kan alma döneminin zamanlamasının bu temel farmakokinetik ilkelere uygun yapılması gerekmektedir.

Bir diğer önemli parametre ilaçların plazma ve doku proteinlerine bağlanmasıdır. Molekülün özelliğine bağlı olarak ilaçların önemli bir kısmı dolaşımda plazma proteinlerine bağlanmaktadır. TİDİ’de ölçülen kan ilaç düzeyi pratikte genellikle serbest ve bağlı fraksiyonunun toplamıdır. Oysa ilacın etkisinden sorumlu olan fraksiyonun serbest fraksiyon olduğu ve yorumlama sırasında özellikle hipoproteinemili hastalar ve/veya yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanan ilaçlarda bu özellik de göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca ilaç etkileşimi bağlamında eş zamanlı olarak kullanılan ve yüksek oranda proteine bağlanma oranı gösteren ilaçların proteinlere bağlanmak için yarışması nedeniyle aynı konsantrasyonun ölçülmesine karşın toksik

etkilerin görülmesinin nedeni olabileceği de akılda tutulmalıdır.

Biyotransformasyon

İlaçların biyotransformasyonundan sorumlu enzimlerin polimorfizm göstermelerinin, kişiler ve ırklar arası varyasyonun önemli bir nedeni olduğu son yıllardaki çalışmalarla açık biçimde ortaya konulmuştur. Bu temel bilgi diğer tüm basamaklarda olduğu gibi doz-yanıt ilişkisi yerine konsantrasyon-yanıt ilişkisinin çok daha düşük varyasyon yaratacağı sonucuna açıklık getirmektedir. Bunun dışında biyotransformasyondan sorumlu enzimlerin diğer ilaç, besin ve/veya kişisel alışkanlıklar (sigara) ile indüklenbildiği veya inhibe edilebildiği de göz önüne alındığında daha da karmaşık olmaktadır. Ancak tüm bu özellikler nedeniyle bilinen tüm ilaçların kan düzeyinin ölçümü ile optimum terapötik etki ve minimal advers etki görülmesi gibi ideal bir tablo çizmek mümkün değildir. Böyle bir yaklaşım ne yazık ki bir tür ütopya olmaktan öteye gidemeyeceği gibi akılcı bir uygulama da değildir. Kişiler arası varyasyonun ortaya çıkmasında tek neden olmadığını açıklama bağlamında digoksin ile ilgili örnek verilebilir. Digoksin için kararlı durum vadi kan düzeyi 0,8-2,0 ng/ml aralığında olduğunda etkili ve toksik olmadığı kabul edilir. Oysa yapılan çalışmalarda bu konsantrasyon aralığında dahi hastaların

yaklaşık onda birinde toksik etkiler tespit edilebilmektedir³. Terapötik aralığın daraltılması halinde (Ör: 0,8-1,6 ng/ml) bu minimize edilebilmektedir. Bu şekilde optimum ilaç düzeyinin daraltılması akılcı gibi görünse de ortaya çıkan toksik bulguların hangi alt grupta olduğunun tespiti daha doğru bir yaklaşımdır. Digoksin örneğinde 1,6 ng/ml'nin altında olan hiçbir hasta toksik bulgu göstermezken 3,0 ng/ml düzeyinin üzerindeki hastaların tamamında toksik etki görülmektedir. 1,6 - 2,0 ng/ml arasında olup toksisite gösteren hastalar kendi içinde değerlendirildiğinde bunların tamamının aynı zamanda miyokardın duyarlılaşmasına neden olan koroner kalp hastası olduğu görülmektedir. Bu bilgi ışığında ilaç düzeyi ile ilgili yorumda hastanın sağlık özgeçmişinde olan ve mevcut durumu değiştirebilen koroner arter hastalığı gibi durumların göz önünde bulundurulması daha akılcı görülmektedir. İzlenen ilaç inaktif metabolit(ler)e dönüştürülüyorsa, bu ilacın eliminasyonunu sağlayan temel basamak olarak değerlendirilebilir (eliminasyon başlığında ele alınmıştır). Ancak ilaçların biyotransformasyonu sonucu açığa çıkan

metabolit farmakolojik olarak aktif ise bu molekülün de ölçülmesi optimum yorumun yapılabilmesi için önem kazandığı gibi hastanın durumunun irdelenmesinde de yol gösterici olacaktır.

Eliminasyon

Eliminasyon ilaçların farmakokinetik özellikleri içerisinde ve terapötik ilaç düzeyi izleminde biyotransformasyon ile birlikte en önemli adımları oluşturmaktadır. Bu basamakta açıklanması gereken en önemli kavram ise klirenstir. Möller ve arkadaşları idrar akımının 2 ml/dk'nın üzerinde olduğu durumda böbrek üre ekskresyonunun sabit bir kan hacmi üre düzeyi ile orantısal olduğunu belirlemişlerdir. Bu sabiti tanımlamak için klirens ve dakikada üreden temizlenen kan hacmi olarak üre klirensi ifadesini kullanmışlardır⁴. Bu tanımlamaların ardından böbrek fonksiyonunun gösterimi için kreatinin klirens değeri klinik kullanıma girmiştir. Tanım böbreklerin 1 dakika içerisinde kreatinini arındırdığı plazma hacmi olarak özetlenebilir. Klirens değerinin birimi ml/dk ve hesaplanması ise aşağıdaki formüle göre yapılır.

$$\text{Kreatinin klirensi (Cl}_{CR}\text{)} = \frac{\text{İdrar kreatinin konsantrasyonu (mg / ml)} \times \text{İdrar hacmi (ml / dk)}}{\text{Plazma kreatinin konsantrasyonu (mg / ml)}}$$

Klinik pratikte idrar kreatinin düzeylerinin ölçümü pratik değildir. Bu nedenle hesaplanırken birçok farklı yöntem bulunmakla beraber genellikle

nomogramlardan veya Cockroft ve Gault'un formülünden yararlanılmaktadır. Bu formül:

$$Cl_{CR} \text{ (ml/dakika)} = \frac{(140-\text{yaş}) \text{ (ağırlık kg)}}{72 \text{ (serum kreatinin mg/ml)}}$$

Bu formülün çıktısı erkekler için geçerli olduğundan kadınlar için düzeltmede, hesaplanan değer %15 oranında azaltılması gerekmektedir.

Çocuklarda yeterli kas kütlesi olmaması dolayısıyla bu formülün vücut alanına göre hesaplanması ve yaş gruplarına uygun sabitlerin kullanılması gerekmektedir⁵.

Bu formül:

$$Cl_{CR} \text{ (ml/dakika/1,73m}^2\text{)} = \frac{K \text{ (boy cm)}}{\text{(serum kreatinin mg/ml)}}$$

k değerleri (yaş ve cinsiyete göre):

yeni doğandan 1 yaşa kadar:	0,45
çocuklar (1-13 yaş):	0,55
kız (13-20):	0,57
erkek (13-20):	0,70

Ancak tüm bu formüller başta kas kütlesi azalmış ve dolayısıyla kreatinin üretimi düşen geriatric yaş grubu için uygun olmadığı gibi kreatinin üretiminin düşük olduğu siroz, kaşeksi gibi klinik durumlarda da hatalı sonuçlar verebilir.

Eliminasyon sürecinde TİDİ için diğer çok önemli bir farmakokinetik parametre ilaçların yarılanma ömrüdür. Pratik olarak kan ilaç düzeyinin yarı düzeyine inmesi için geçen süreyi ifade etmektedir.

İlacın yarılanma ömrü biliniyor ise yükleme dozunun ardından bir yarılanma ömrü sonunda daha önce verilen dozun yarısının yerine konması (biyoyararlanım göz önünde bulundurularak) her yarılanma ömrü sonunda elimine edilen miktarın yerine konması ile tedavi sürdürülebilir gibi gözükmektedir. Ancak ilaçların yarılanma ömürleri pratik bir dozlama şeması yaratamayacağı gibi yükleme dozu da klinik pratikte pek tercih edilmeyen bir yöntemdir. Yarılanma ömrü ile ilaçların kararlı durum konsantrasyonuna ulaşmaları arasında ilişkiyi ortaya koymak ve buna göre izlemin yapılması daha pratiktir. İlaçlar sabit doz ve doz aralıklarında uygulanmaya başlandıktan sonra 4-5

yarılanma ömrü kadar bir süre geçince kararlı durum konsantrasyonuna ulaşmaktadır. İlaçların dozu ve dozlama aralıkları ulaşılan kararlı durum konsantrasyonunu belirleyen etmenler olmakla birlikte ilacın kararlı durum konsantrasyonuna ulaşma zamanını belirlememektedir. Düzenli aralıklarla her bir dozu 100 birim olan bir ilaç verildiğinde (biyoyararlanımı %100 kabul edilerek) bu ilacın %50'si bir yarılanma ömrü sonucunda elimine edilecektir. Eklenen 100 birim toplam miktarı 150'ye çıkaracak ve bir sonraki yarılanma ömründe yine %50'lik azalma ile 75 birime düşecektir. Bu basit hesaplama devam edildiğinde 4. yarılanma süresi sonunda 94 birim 5. yarılanma süresi sonunda 96 birim maddenin organizmada kaldığı bulunacaktır. Dolaylı olarak ilacın uğrayacağı dağılıma paralel olarak da bir kan konsantrasyonu oluşacaktır. Pratik olarak 94-100 birim aralığı aynı kabul edilebileceğinden kararlı duruma ulaşma zamanı 4-5 yarılanma süresi kabul edilmektedir. Burada en önemli ve sıklıkla hatalara neden olan konu ilaçların doz aralığı veya dozu değiştirildiğinde bu değişikliklerin her birinin yeni bir kararlı durum konsantrasyonu oluşturmaları bakımından yeni bir 4-5 yarılanma süresine gereksinimleri olduğu bilgisidir. Oysa klinik pratikte sıklıkla tanık olunan durum; doz değişimi sonrası ilacın yarılanma

zamanı göz önünde bulundurulmadan kontrol amacıyla ölçümü istenen kan örnekleridir.

İlaçların yarılanma zamanı olarak ifade edilen parametre, tedavi sürerken ve eliminasyonun ağırlıklı olduğu dönemde ölçülen yarılanma zamanıdır. Oysa bazı ilaçların ölçülen bu değer dışında, zaman boyunca konsantrasyon eğrilerinin sonunda terminal yarılanma ömrü olarak ifade edilen ve ilacın organizmadan uzaklaştırılmasının geç dönemlerini yansıtan çok daha farklı yarılanma zamanı tespit edilebilir. Bu terminal yarılanma zamanı bazı ilaçlar (bifosfonatlar) için yıllar ile ifade edilebilir düzeydedir. Ancak TİDİ'de kullanılan önemli bir farmakokinetik parametre değildir.

Genel bir değerlendirme ve ideal bir durum tasvirinde bir hastaya verilen ilacın ve/veya aktif metabolitlerinin dolaşım içinde an ve an izlenmesi ve oluşturduğu etki ile karşılaştırılarak terapötik doz ve dozlama aralıklarının belirlenebilmesi çok akılcı gibi görünmektedir ancak pratik olarak ulaşılamaz bir durumdur (analitik sorunlar da göz önünde bulundurulduğunda). Ayrıca kan ilaç düzeyi çok önemli bir gösterge olmakla birlikte tek belirleyici değildir. İlaçların farmakokinetik özellikleri dışında farmakodinamik özellikleri de kişiler arası ciddi varyasyon göstermektedir. Her ne kadar hastaların ilacı tolere edebilirlikleri veya verdikleri

yanıtlar genellikle normal bir dağılım gösteriyor ve farmakokinetik/farmakodinamik ilişki genellikle lineer görünüyor ise de istisnalar azımsanmayacak düzeyde yüksektir. Buna en çarpıcı örnek olarak, ilaç etki mekanizması irreversibl (geri dönüşümsüz) enzim inhibisyonu ile olan bir ilacın plazma düzeyi ile etkisi arasında hiçbir korelasyon bulunmaması verilebilir.

İlaçların hem farmakokinetik hem de farmakodinamik özelliklerinin belirlenmesinde aracı olan basamaklar genetik olarak ortaya konulabilmekte, kişilerarası varyasyonlar kadar cinsiyet ve ırklar arasındaki farklılıklar gösterilebilmektedir. Bu tür farklılıkları inceleyen ve günümüzde gittikçe daha da gelişen farmakogenetik isimli bir alan bu soruna yanıt aranmasından doğmuştur. Bu bağlamda bir ilacın hastaya uygulandıktan sonra (oral veya parenteral) kan düzeyinin izlenmesinin yaratacağı faydanın öncelikle ortaya konulması gereklidir. Olası faydanın dışında, kolaylıkla ve yaygın olarak kullanılacak bir analitik yöntem ve ilgili ilaçlar için kabul edilmiş terapötik bir aralığın olması da ön koşullardır. Bu ilaç kan düzeyi aralığı, hastaların kabul edilebilir bir oranında etkiyi oluşturabilecek ve advers etkilerin minimum düzeyde görüldüğü bir aralığı tanımlamalıdır (“terapötik pencere” veya “terapötik aralık”). TİDİ uygulanan ilaçlar

genellikle terapötik penceresi dar olan ilaçlardır. Terapötik penceresi geniş ve kişiler arası varyasyonun yoğun olmadığı koşullarda TİDİ istenilen düzeyde fayda sağlamamaktadır.

Sonuç ve özet olarak TİDİ için endikasyon teşkil edebilecek özellikler aşağıdaki durumlar ile sınırlıdır ve bunların dışında eklenecek endikasyonların farmakokinetik ve farmakodinamik ilkeler bağlamında rasyonellerinin önceden ortaya konması kaçınılmazdır:

1. Kan ilaç düzeyi ile terapötik etki ve/veya toksisite arasında belirlenmiş bir ilişki.
2. Kan ilaç düzeyi ile doz arasında zayıf bir ilişki.
3. Klinik olarak kan ilaç düzeyinin ölçümü için iyi bir endikasyon: tedaviye yanıtızlık, şüpheli uyunç sorunu, toksisite işaretleri.
4. Terapötik etkisizliğin ciddi çıktıları olabilen hastalıklar.
5. Analitik olarak uygulanabilir bir tekniğin varlığı.

Kaynakça

1. Bussey HI, Hoffman EW. A prospective evaluation of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 1983; 5(3):245-8.
2. Melmon KL. Preventable drug reactions - causes and cures. *N Engl J Med.* 1971; 284(24):1361-8.
3. Smith TW, Haber E. Digoxin intoxication: the relationship of clinical

presentation to serum digoxin concentration. J Clin Invest. 1970; 49(12):2377-86.

4. Möller E, McIntosh JF, Van Slyke DD. Studies of urea excretion. II. Relationship between urine volume and the rate of urea

excretion in normal adults. J Clin Invest 1929; 6:427-65.

5. Schwartz GJ, Gauthier B. A simple estimate of glomerular filtration rate in adolescent boys. J Pediatr. 1985; 106(3):522-6.

Terapötik İlaç Düzeyi İzleminde Analiz Yöntemleri ve Çalışma İlkeleri

Doç. Dr. Başar Sırmagül

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab.D.

Terapötik ilaç düzeyi izlemi (TİDİ), ilaç düzeyi ölçümünün 1950'li yıllarda antiepileptik ilaçların gaz kromatografisi (GC) ile kan düzeyinin belirlenmesi ile başlayan, 1959 yılında immunoassaylerin öncüsü olan radioimmunoassay (RIA) (Yalow ve Berson) ve 1960'lı yıllarda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile devam eden tarihçesinde; 1970'li yıllarda immunoassay yöntemlerinin uygulanması ile hız kazanmıştır.

İmmunoassayler, çözücüdeki bileşiğin konsantrasyonu ile ilişkili, ölçülebilen bir sinyal üreten çok spesifik antijen-antikor komplekslerini kullanan hassas analitik testlerdir. İmmunoassayler ayrıca, vücutta bir bileşiğin varlığına ve yokluğuna dayalı kalitatif veri de üretirler. İmmunoassay yöntemlerinin TİDİ'de kullanılması, rutin açıdan kolay, basit ve hızlı sonuç alınması nedeniyle oldukça yaygınlaşmıştır.

Fakat klinik uygulamada yer alan ve terapötik açıdan düzey izleminin yapılması gerekli önemli sayıdaki ilaç için halen immunoassay kitlerinin istenen düzeye ulaşmadığını görmekteyiz. Bu alanda daha sofistike olan HPLC ve GC'nin ardışık kütle spektrometrisi uygulamaları rutin yanında farklı biyolojik örneklerden ilaç

düzeyi ölçümlerinde referans yöntem konumundadırlar.

İLAÇ DÜZEYİ ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN ANALİTİK YÖNTEMLER

İdeal olarak uygulanan analitik yöntem;
Benzer yapılara sahip bileşikleri (değişmeyen ilaç ve metabolitlerini) ayırt edebilmeli

Küçük miktarları saptayabilmeli

Rutin olarak uygulanabilmeli

Uygulanan diğer ilaçlardan etkilenmemeli

1. İMMUNOASSAYLER

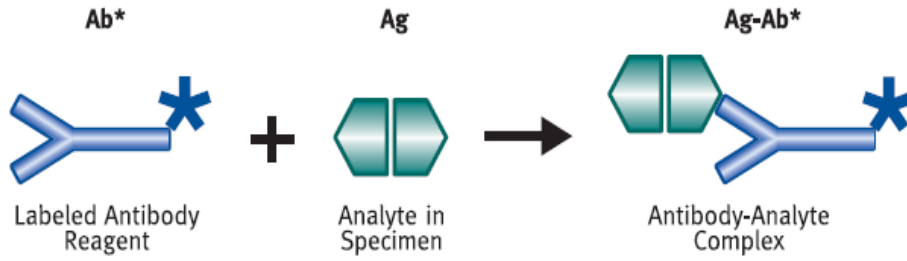
Günümüzde TİDİ'de immunoassay uygulaması ile ön işlemsiz, tam otomatize, süreğen, kolay erişimin söz konusu olduğu süreçler söz konusudur. Burada 100µL'nin altında örnek hacmi ile çalışan, reaktifleri (miyarları) barındırabilen, bünyesinde kalibrasyon eğrilerini saklayabilen sistemler söz konusudur.

İmmunoassay tekniğinin ilkesi: Burada analitik olarak ilaç molekülü ve spesifik antikorun yaptığı kompleksin tanınmasına dayalı bir analiz söz konusudur.

Bu yöntemde analizi yapılacak maddeye (antijen) karşı geliştirilen spesifik "antikor" ve analizi yapılacak bu maddenin

işaretlenmiş şekli kullanılır. Tayini yapılacak moleküllere karşı antikorların elde edilmesi immunoassayin en önemli bölümüdür.

Analizi yapılacak kimyasal maddeyi (ilacı) içeren biyolojik sıvıya, belirli konsantrasyonda antikor ve işaretlenmiş ilaç ilave edildiğinde karışımla aşağıdaki reaksiyon gerçekleşir:



Şekil 1: İmmünoassayde ilaç için antijen (Ag) ve antikor (Ab) ilişkisi.

İmmunoassaylerin sınıflandırılması:

İlacın işaretlenmesi çeşitli tekniklerle yapılır. İmmunoassay teknikleri bu işaretleme yöntemlerine göre de birçok alt sınıflara ayrılır:

Radyo immunoassay (RIA) : Antijen radyoaktif madde ile işaretlenir. Miktar tayini radyoaktivitenin ölçülmesi ile yapılır.

Enzim immunoassay (EIA) : İşaretleme enzim ile yapılır. Enzim aktivitesi tayin edilerek analizi yapılacak maddenin miktarı saptanır.

Floro immunoassay (FIA) : İşaretleme florofor bir madde ile yapılır. Miktar tayini spektrofotometre ile saptanır.

Antikor yarışmalı olarak serbest işaretlenmiş ilaç (ilaç*) ve analizi yapılacak ilaçla kompleks (bağlı ilaç) oluşturur (Şekil 1). Bu karışımda "bağlı işaretlenmiş ilaç" moleküllerinin, "bağlı işaretlenmemiş ilaç" moleküllerine oranı serbest ilacın miktarı ile ters orantılıdır.

İmmuno kemiluminesans : İşaretleme kemiluminesans veren bir madde ile yapılır.

İmmunoassay tekniği, karışıma doğrudan uygulanabiliyorsa "homojen immunoassay", eğer karışımdan işaretli ilacın ayrılmasından sonra uygulanabiliyorsa "heterojen immunoassay" adı verilir. RIA heterojen; EIA, FIA ise homojen immunoassay'lere örnek olarak verilebilir.

İmmunoassay teknolojileri oldukça farklılaşmış ticari sunumları olan geniş bir ailedir. Kompetitif ve immunometrik (sandviç) olarak temel anlamda immunoassay formatını ikiye ayırabiliriz:

Kompetitif immunoassay sistemler küçük molekül ağırlıklı analitlerde spesifik antikor varlığında çalışırken, sandviç immunoassayler daha büyük moleküler ağırlıklı analitlerde (protein, peptid) ve iki ayrı spesifik antikor varlığında çalışan bir sistemdir. TİDİ'de genelde daha küçük moleküller söz konusu olduğundan kompetitif immunoassayler ilaç düzeyi ölçümünde daha yaygındır.

Antijen veya anikor miktarını ölçmek için işaretli materyallerin kullanımına ihtiyaç duyarlar. Label (belirteç), assayin bir bölümü olarak rol oynayan bir moleküldür ve çözeltide ölçülebilen bir sinyal üretir. Bu bir radyoaktif bileşik (RIA) veya çözelti renginde veya floresansında bir değişikliğe sebep olan bir enzim (EIA) olabilir.

Heterojen immunoassayde; aksine bağlı ve serbest belirteçlerin ayrışımı sinyal olarak ölçülür. Bu ayrışım sıklıkla manyetik olarak ölçülür. Miyar analiti veya analogu paramanyetik partikül (PMP) bağlı ve antikor etiketli olarak sağlanır. Tersine antikor PMP'ye konjuge olarak ve miyar analiti belirteci içeriyor şekilde de olabilir. Ayrışım ve yıkama sonrasında bağlı belirteç diğer reaktiflerle reaksiyona girerek sinyali oluşturur. Kemilüminesan immunoassaylerin çoğunda bu mekanizma geçerli olup belirteçler küçük moleküllerdir.

Homojen yöntemler genellikle suistimal edilen veya terapötik ilaçlar gibi küçük miktar analitlerin ölçümü için uygulanırlar. Serbest Ag*’den Ab-Ag* bağlanmasının ayrışmasına ihtiyaç duymayan homojen yöntemlerin uygulanabilirliği daha kolay ve daha hızlıdır.

Belirteçlerin enzim olduğu ELISA sisteminde kemilüminesan, flourometrik, kolorimetrik sinyaller oluşur.

Daha eski immunoassay formatlarında belirteçlerin radyoaktif maddeler olduğu RIA yöntemi kullanılmaktaydı. Radioimmunoassayler (RIA), beta veya gama sayacı ile ölçülebilen radyasyon yayan bir radyoaktif işaretten (^{125}I , ^3H , ^{14}C) faydalanırlar. Enzimle birleştirilmiş immunoassaylerde (EMIT), örnekteki ilaç ve Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz ile işaretlenmiş ilaç antikor bağlayıcı bölgeler için yarışır. Bağlanma enzim aktivitesini inhibe eder, serbest enzim etkileşim için aktif olarak kalır. Enzim aktivitesi/absorbansı direkt olarak ilaç konsantrasyonu ile orantılıdır.

Polistiren partiküllerin kullanıldığı heterojen immunoassaylerde mikro ölçülerde partiküllerin varlığı mikroenzim immunoassay (MEIA) olarak adlandırılmasına neden olmuştur. İmmunoassaydeki ana reaktif, bağlayıcı molekül olup analit spesifik antikor veya fragmanları şeklindedir.

Günümüzde çok sayıda farklı antikor kullanılmaktadır. Hayvanlardan poliklonal antikorlar, analitin kendisi veya büyük moleküllu adjuvan kompleksi ile hayvana enjeksiyonu sonrasında elde edilir. Daha sonra hayvanın serumundan bu antikorlar alınır. Daha yenilerde mast hücresi aracılı tümör hücresine inokülasyonla tek klonlu monoklonal antikorların spesifik antikor üretimi amaçlı kullanımı söz konusudur.

Monoklonal antikorların poliklonal olanlara üstünlükleri;

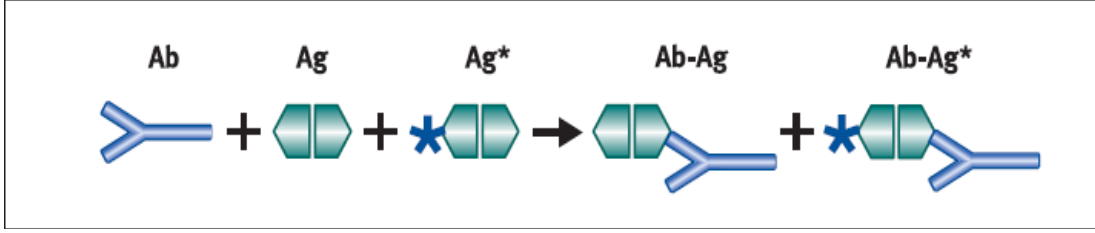
Poliklonal antikorlarda üretimin oluştuğu canlı hayvanın her defasında farklı özellikler gösteren bireyler olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Analit için monoklonal antikorlarla karşılaştırıldığında poliklonal olanlar çok sayıda ve daha az spesifik görünüm oluşturmaktadır.

Poliklonal antikorlar, genelde yanlış pozitif sonuç verirler çünkü antijen epitoplarına daha az spesifiktirler ve değişken bağlanma afinitelerine sahiptirler. Antijenlerine benzer başka moleküllere de bağlanabilirler. Bazen reaktif içerisinde bir peptidaz kullanılarak tam antikor yerine onun fragmanları kullanılır (Fab antikorları). Antikorların üretimi immunoassaylerin kullanımında önemli bir işlemdir. Çünkü cihazın sonuçları oluşturmada kullandığı oluşan antijen antikor kompleksleridir.

Monoklonal antikorlar, antikor üreten hücre ile miyelom hücrelerini kaynaştırarak elde edilirler. Sonuç hücresine hibridoma denir.

Hibridomalar çok miktarda antikor içerirler. Tanınan antikorları içeren hücre popülasyonlarında kültürleri kolayca yapılabilir. Bu antikorlar monoklonal antikorlar olarak adlandırılırlar çünkü tek bir antikor klonu oluşturan hücrenin döllemesinden elde edilirler.

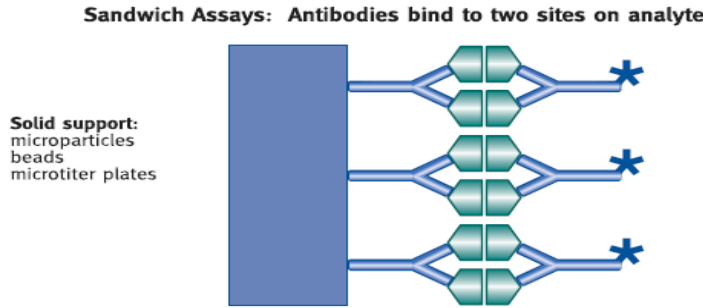
Kompetitif immunoassaylerde, test örneğindeki işaretlenmemiş analitin sınırlı sayıdaki antikor bağlayıcı bölge için işaretlenmiş antijen ile yarışmaya girme yeteneğine göre ölçülür. İşaretlenmemiş antijen, işaretlenmiş antijenin bağlanmasını bloke eder çünkü antikor üzerindeki bağlanma bölgesi önceden işgal edilmiştir. Burada spesmen içindeki ölçülecek analit ile miyarda (reagent) bulunan işaretli bir analitin veya analogunun sınırlı sayıdaki spesifik antikor ile yarışması söz konusudur. Antikora belirtecin bağlanması, ölçümü yapılan analitin miktarı ile ters orantılı olduğundan sinyalin miktarına göre antijen ve antikor etkileşimi prensibinden hareketle miktar tayini yapılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2: Kompetitif immünoassaylerde antijen (Ag) – antikor (Ab) ilişkisi.

Non-kompetitif immünoassaylerde (Şekil 3), işaretli analitin miktarı antijenin miktarıyla doğru orantılıyken; kompetitif immunoassaylerde ters orantılıdır. Nonkompetitif immunoassayler, genellikle en üst seviyedeki sensitivite ve spesifiteyi sağlarlar. Bu format, sandviç assay olarak anılır çünkü analit iki yüksek spesifiteye sahip antikor çözeltisi arasında bağlanır.

Reaksiyon karışımı, artan işaretli antikor içerir yani tüm bağlı ilaç/metaboliti gösterir. Antijen antikor kompleksinin miktarı örnekte varolan ilaç miktarını belirlemek için ölçülür. İşaretli analitin ölçümü (genellikle antikorun) örnekte varolan antijen miktarıyla doğru orantılıdır.



Şekil 3: Non-kompetitif immünoassayler için şematik gösterim.

Heterojen immunoassayler, bağlı sinyal ölçülmeden önce bağlı olmayan belirteçlerin ayırımına dayalıyken, homojen immunoassayler bu ayırma ihtiyaç duymazlar çünkü sinyal, bağlanma meydana gelirken oluşur. Heterojenlere oranla homojen olanlarda ng/L

seviyelerinde bir sensitivite söz konusudur ki bu da heterojenlere oranla daha düşük bir sensitivite demektir.

Bağlı ve serbest konjugatın ayrılması ve yıkama basamaklarının olmaması nedeniyle arka plan gürültüsü çok olan bir sistemdir.

Ayrıca peroksidazların belirteç olarak kullanıldığı modellerde immün komplekslere nonspesifik bağlanma sonucu enzim benzeri aktivite oluşumu ile çapraz reaksiyon sıklığı da artmaktadır.

Burada sinyal; optik absorbans, floresans, kemilüminesans prensipleri ile tayin edilmektedir. Homojen prensipte; bağlı belirteç ile serbest belirtecin farklı özellikler göstermesi söz konusudur. Örneğin; FPIA' da rölatif olarak daha küçük olan serbest belirteç (1000 Daltona kadar) büyük antikorlarla (140000 D) kompleks yapmış bağlı belirtece oranla farklı Brownian hareket gösterir.

1- Radyoimmunoassay (RIA):

Radyoimmunoassay, radyoaktif atomların immüno-kimyasal reaksiyonlarda kullanılarak maddelerin miktar tayinlerinin yapıldığı yöntemdir. RIA ilk kez 1959 yılında plazmada insülin tayini için kullanılmıştır. Sınırlı da olsa biyolojik sıvılarda ilaç analizinde de (amfetaminler, barbitüratlar, digoksin, metadon, morfin, nikotin, penisilinler, fenitoin, tetrahidrokannabinol, tübokürarin gibi) kullanılmıştır. RIA yöntemi duyarlı, mikro bir yöntem olup 10-100 pl numuneye ön işlem uygulanmadan madde analizine imkan vermektedir.

RIA Yönteminin prensibi ve uygulama tekniği: Radyoimmunoassay yönteminde temel komponentler; uygun bir

radyoizotopla işaretlenmiş analiz yapılacak madde (ilaç) ile hazırlanmış standartlar, bu ilaca karşı önceden hazırlanmış antikor içeren antiserumdur.

İlacın radyoaktif izotopla işaretlenmesinde en çok trityum (3H), karbon-14 (14C) ve iyot-125 (125I) kullanılır. Bu radyoizotoplarda trityum ve karbon- 14, β -ışınması, iyot-125 ise X ve γ ışınları yayınlar. Ancak az sayıda ilaç molekülünde iyot bulunduğundan, sentez sırasında molekülün iyotlu türevi hazırlanır. Örneğin I-125 ile işaretli digoksin hazırlanmasında molekülüne iyot ilave edilmiş tirozinle digoksin türevi hazırlanır.

Uygulamada, bir tüpe belirli bir miktarda antikor ve belirli miktardaki radyoaktif işaretlenmiş ilaç (standart) ve analizi yapılacak ilaç içeren numune (serum veya idrar) konur. Bu karışımda, işaretli ve işaretlenmemiş ilaç aynı antikora bağlanmak için yarışır. İşaretsiz ilacın miktarı ne kadar çoksa, o kadar az işaretli ilaç antikorla bağlanır. Bu nedenle radyoaktif işaretlenmiş bağlı ilaç moleküllerin miktarı işaretlenmemiş ilaç moleküllerinin miktarı ile ters orantılıdır. Karışımda reaksiyon dengeye ulaşıncaya, ayırma işlemine geçilir (heterojen immunoassay). RIA tekniğinde, ilacın konsantrasyonu, antikorla bağlı işaretlenmiş ilacın veya serbest ilacın radyoaktivitesinin ölçülmesine dayanır.

Radyoaktivite ölçümünde (sıvı sintilasyon veya gama sayıcısı) serbest veya bağlı ilacın ayırımı yapılamaz. Bu nedenle yukarıda açıklanan ve dengeye ulaşmış karışıma ayırma işlemi uygulanır. Bu amaçla aktif kömürle adsorbsiyon, çift antikor tekniği gibi yöntemler uygulanır. Radyoaktivite ölçümü bu ayırma işleminden sonra yapılır.

RIA' da analiz yöntemi radyoaktivitenin ölçülmesine dayanır. Bu amaçla (3- veya γ ışını veren radyoaktivite (3- sıvı sintilasyon sayıcısı; yalnız γ - ışını veren radyoaktivite ise γ katı sintilasyon sayıcısı ile ölçülür.

Enzim veya floresan bir madde ile işaretleme yapılan immunoassay yöntemleri ile ölçme ise ultraviyole absorpsiyonunun, floresans veya luminesansın ölçülmesine dayanır. Bu yöntemlere de "optik immunoassay" adı verilir.

Aşağıda bazı önemli immunoassay yöntemlerinin prensibi ve uygulama alanları kısaca açıklanmıştır.

Optik immunoassay'ler: Optik immunoassay'ler RIA'ya göre birçok üstünlük taşır. Bu yöntemlerde kullanılan reaktifler dayanıklıdır ve ayırma işlemi yapılmaksızın analiz yapılabilir. İşaretleme enzimlerle, floresan ve kemilmünesan maddelerle yapılabilir ve bu nedenle uygulama alanları daha geniştir. Analitik yöntemler maddenin optik özelliğine

(ultraviyole absorpsiyonu, bulanıklık, floresans) dayandığı için bu yöntemlere "optik immunoassayler" adı verilmiştir. Bunlar içinde en çok kullanılan enzim immunoassay (EIA) ve floresans immunoassay (FIA) yöntemleridir.

Homojen EIA'da analiz yapılacak ilaç, uygun bir enzimle kovalan olarak işaretlenir. Bu yöntemle antiepileptik ilaçların, astma ilaçlarının, antineoplastik ilaçların, suistimal edilen ve bağımlılık yapan bir çok ilacın analizi yapılabilir.

2- Enzimle birleştirilmiş immunoassay tekniği (EMIT):

Syva firması patent altında bu yöntemi geliştirmiştir. EMIT antikor ve enzim işaretli antijenden (konjugat) oluşur. EMIT yönteminde enzim aktivitesinin artması veya azalmasına dayanan iki yöntem vardır. Enzim aktivitesinin azalması enzimin katalitik bölgesinde yapısal değişim nedeniyle konjugata antikor bağlanmasını azaltması nedeniyle oluşur.

EMIT'de enzim G6PD olup bu enzimin aktivitesi çalışılan örnekte antikor antijene (ilaç molekülü) bağlandığında, bir sonraki basamakta enzim substratı ile reaksiyon oluşurken, aksine örnekte ilaç yokluğunda enzim işaretli antijen ve reaktifteki antikor reaksiyonu oluşacağından sonraki basamakta substrat varlığında enzimatik reaksiyon oluşmayacaktır (Şekil 4).



Şekil 4: EMIT yöntem şeması

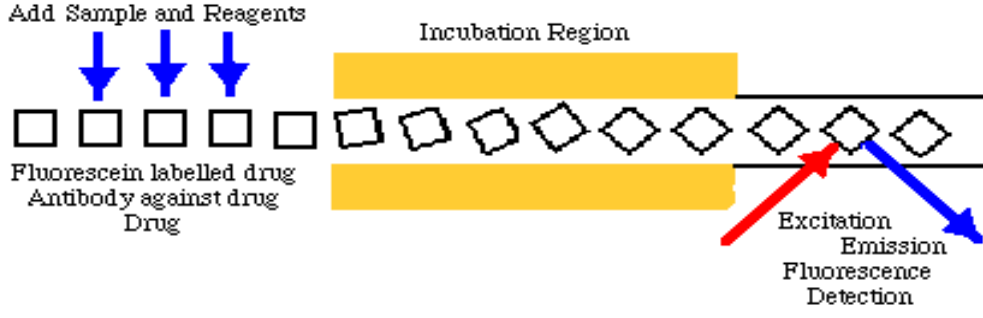
3- Floresans polarizasyon immunoassay (FPI) tekniği:

Bu teknikte, bağlı ve serbest florofor molekülle işaretlenmiş ilacın polarize ışık düzlemini çevirme farkı ölçülür. Işık polarize edici bir mercek veya prizma aracılığı ile demet halinde düz bir zemin üzerine düşürülür. Polarize ışık, floroforla işaretli ilaç üzerine düşürüldüğünde ışığın şiddeti (eksitasyon) molekül tarafından polarize ışık düzleminde emisyon yapar. Floresans eksitasyon ışınına dik olarak giden emisyon ışınının ölçülmesi ile saptanır.

Floresans mekanizması ile ilk defa 1970 yılında Dandliker ve arkadaşları tarafından denenmiştir. Floresans veren bir maddeyle (florofor) işaretlenmiş olan ilaç serbest halde iken çok yavaş bir floresans polarizasyonu yapar. Antikorla

bağlandıktan sonra kompleks molekülün hareketi yavaşlar ve floresans polarizasyonu artar. Polarizasyondaki bu değişim ilaç konsantrasyonu ile orantılıdır. Yöntem otomasyona yakındır. İlk kez 1981 yılında Abbot firması tarafından bu yöntem otomasyona adapte edilmiştir. TDX cihazı olarak bilinen bu cihaz "terapötik ilaç izlenmesi" ve bir çok ilaçlarla akut zehirlenmelerde ilaç düzeylerinin tayininde kullanılmıştır.

Floresans polarize immunoassayde (FPIA), örnekteki ilaç fluoresein ile işaretlenmiş ilaçla antikor bağlayıcı bölgeler için yarışır (Şekil 5). Reaksiyon karışımı düzlem-polarize ışık tarafından uyarılır. Belirteç (tracer) daha düşük enerji durumuna geçtiğinde ışık yayar ve polarizasyon ölçülür. Örneğin polarizasyon değeri analit konsantrasyonu ile ters orantılıdır.



Şekil 5: Floresans polarize immünoassayın şematik gösterimi.

Enzimlerin belirteç olarak kullanıldığı homojen immunoassaylerde serbet ve bağlı antikor koşullarında farklı aktiviteler söz konusudur. Bu mekanizma EMIT ve CEDIA'nın temelidir. EMIT'de belirteç enzim G6PD'dır ve serbest iken aktif olup, antijen(ilaç) antikor kompleksi oluştuğunda inaktiftir. Aktif enzim substratı ile reaksiyonu sonrasında kofaktör NAD'ı NADPH'a indirir. Sonuçta oluşan absorbans 340nm'de izlenir.

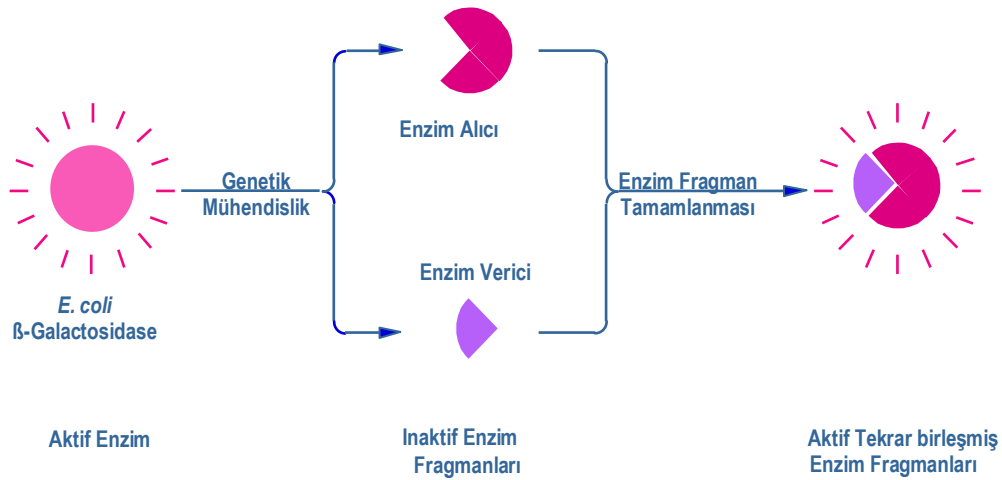
Burada serbest kısım sinyalden sorumludur. Bundan dolayı denge fazında serbest enzim bağlı analit miktarı ile direkt

olarak ilaç konsantrasyonu arasında oran kurulacaktır.

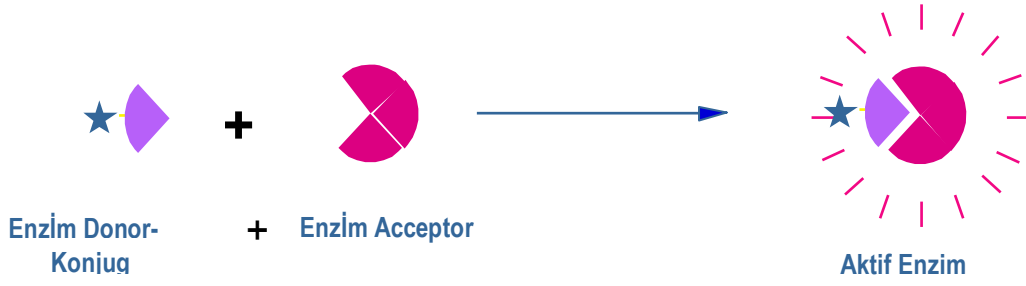
4- Klonlanmış Enzim Donör

İmmunoassay (CEDIA):

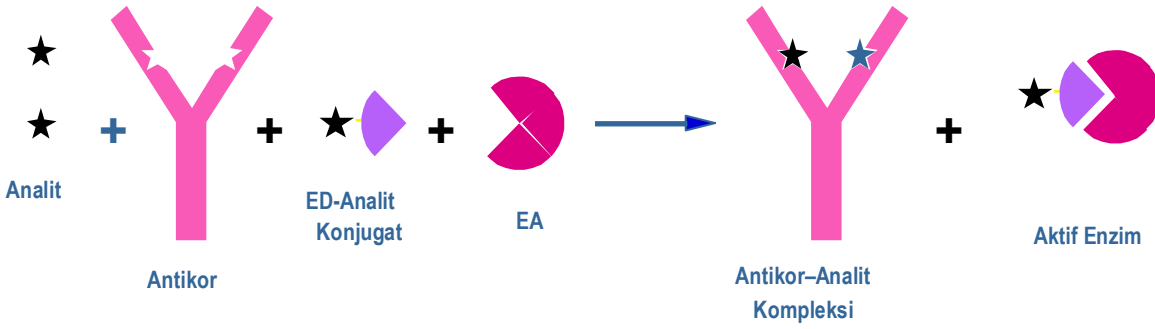
Beta galaktozidaz enziminin genetik mühendisliği temelinde üretilen iki ayrı inaktif parçası antijen ve antikor bağlantısı içinde miyarda bulunur. Bu antijen antikor reaksiyonu oluştuğunda aktif enzim ile kromojenik galaktozid türevi olan substrat etkileşimi ölçümün sinyalini oluşturur (Şekil 6,7,8). Enzim fragmanlarının genetik üretimi esasına dayanır.



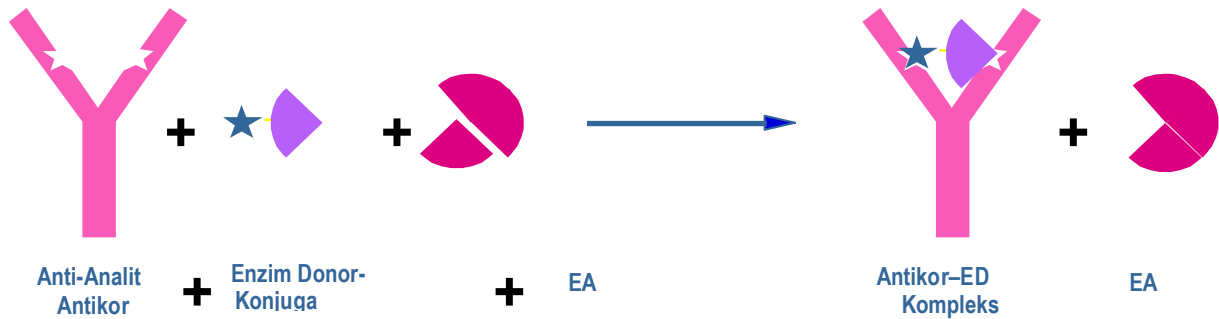
Şekil 6: Klonlanmış enzim donör immünoassayın şematik gösterimi. EA ve ED-analit konjugat aktif enzim oluşturabilir.



Şekil 7: Klonlanmış enzim donör immünoassayın şematik gösterimi. Numunedeki analit antikora bağlanmak için yarışır, ED-analit konjugatın enzim formasyonunu sağlar.



Şekil 8a:



Şekil 8b:

Şekil 8: Klonlanmış enzim donör immünoassayın şematik gösterimi. Anti-analit antikor ED-analit konjugata bağlanabilir ve aktif enzim oluşmasını bloke eder.

CEDIA UYGULAMASI

1- İlaç veya ilaç metaboliti, enzim verici-ilaç konjugatı ile anti-ilaç antikor bağlanma bölgesi için yarışır; komple, aktif beta-galaktozidaz molekülleri, ortamdaki ilaç veya ilaç metabolitlerinin miktarına orantılı olarak oluşur, aynı zamanda substratın renk oluşturması da numune içindeki ilaç konsantrasyonu ile orantılıdır.

2- Oluşturulan enzim miktarı, o-nitrofenil-beta-d-galactopiranozid veya klorofenol red-beta-d-galaktopiranozid gibi uygun bir enzim substratının hidrolizi ile izlenir.

3- İdrar veya serum numunesinde serbest ilaç veya ilaç metabolitinin olmaması durumunda, komple tetramerik beta-galaktozidaz enzim formasyonu engellenir ve reaksiyon karışımına substrat eklenmesinden sonra hiç bir renk üretilmez.

CEDIA® Teknolojisinin Genel Avantajları

1- Diğer enzim immunoassayler gibi 340 nm'de değil 570 nm dalga boyunda absorbans okunur. Bundan dolayı bulanık idrar veya hemaglobinden etkilenmez. Serum, tam kan, idrar ve post-mortem kan numune olarak kullanılabilir.

2- Teknik olarak arka plan reaksiyonu (gürültü) yoktur çünkü komple enzim yoktur; çok düşük ölçüm seviyelerinin saptanmasına izin verir (örn. 6-MAM / LSD).

3- Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik (CV) özelliği yüksektir.

4- Lineer kalibrasyon eğrisi 4 haftalık stabilite ile kalitatif ve yarı-kantitatif ölçümlerin yüksek doğrulukla yapılmasına imkan sağlar.

5- Kullanılan antikorların özgünlüğü ile çok daha az yalancı pozitiflik oranına sahiptir. İdrar pH'ı değişiminden etkilenmez.

5. Türbidimetrik İmmunoassay:

Homojen immunoassaydir. Analit, antijen veya analogu lateks gibi koloidal partiküllere bağlıdır. Lateks partiküller antikor varlığında aglutine olur, spesimende serbest analit olduğunda daha az aglutinasyon olur ve böylece spektrofotometrede aglutinasyona bağlı türbidite hız ve miktar olarak monitorize edilebilir.

İmmunoassay Yöntemlerin

Sınırlayıcılıkları

Antikorların spesifikliği bunların başında gelir. Örneğin analitimiz ilaç olduğunda bunun bir çok metaboliti kendisi gibi yapısal özellikler gösterdiğinden spesifite problemi oluşabilmektedir.

Bu metabolitler çapraz reaktan olarak adlandırılabilir. Böylece pozitif ve negatif yanlış sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca spesimdeki endojen antikorların varlığı reaktif komponentleri ile gereksiz

reaksiyonlara girerek antikor veya antijenlere bağlanıp sonucun yanlış yorumlanmasına neden olabilmektedir.

Genel olarak RIA ve EMIT idrarda çok çeşitli ilaçların analizi için uygundur. Ancak geliştirilen çeşitli antikorlar diğer ilaçlarla çapraz reaksiyon verirler. Geniş bir spesifikliğı olan antikor, numunede olan bir veya birden fazla aynı grup ilaca bağlanabilir. Bunu ayırt etmek için her ilaç ve metaboliti yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fraksiyonlara ayrılarak immunoassay yöntemine adapte edilebilir.

Akut zehirlenmelerde immunoassay uygulanmasında da benzeri girişimler olabilir. Örneğın akut zehirlenmelerde benzodiazepin grubu ilaçların EMIT ile taranmasında farmakolojik olarak aktif metabolitler de antikorla etkileşirler. Tek bir ilacın birden fazla metabolitinin çapraz reaksiyon vermesi, sonucun yorumlanmasını zorlaştırır.

Zorluğuna karşın, benzodiazepinleri immunoassay yöntemi ile ayırt etmek mümkün olduğı halde, barbitüratlar ancak grup olarak tayin edilebilir. Bu durumda pozitif sonuç alındığında, diğer yöntemlerle hangi barbitürat olduğı ayırt edilmelidir.

2. GAZ KROMATOĞRAFİSİ

Gaz-Sıvı kromatografisi sıklıkla GC olarak tanımlanmakta olup 1952'de James Martin

tarafından ilk defa tanımlandığında bir ayırma tekniğı olarak gündeme gelmiştir. Zaten birçok GC kolonunda sabit faz sıvı olup mobil faz inert bir gazdan oluşmaktadır. Tipik olarak sabit faz düşük buhar basıncına sahiptir ve kolon sıcaklığında uçucu değildir.

GC analiz piklerinde kapiller kolon uygulaması rezolüsyonu iyileştirmektedir. Sabit faz kompozisyonuna bağlı olarak GC kolonlarının düşük, orta ve yüksek polariteli farklı tipleri vardır ve yeni polimerlerin keşfiyle bu sabit fazlar da farklılaşmaktadır. Otomatik ısı ayarlayıcı sistem ve otomatik örnek enjeksiyon tekniklerinin GC ünitelerine adaptasyonu klinik laboratuarlardaki kullanımı açısından kolaylık getirmiştir.

GC ile ilaç analizlerinde dedektör seçimi sistemin hassasiyetini ve spesifitesini belirleyen en önemli unsurdur.

Gaz kromatografisinin toksikolojik analizlerde kullanılması

Gaz kromatografisi analitik ve forensik toksikolojide biyolojik materyalden izole edilen kimyasal maddelerin tarama testlerinde ve kantitatif analizlerde kullanılır. İTK ve UV ile ön taramalara tabi tutulan maddelerin kalitatif analizlerinde gaz kromatografisi destekleyici (confirmatory) deney olarak önem taşır.

Gaz kromatografisinde hareketli faz gazdır. Sabit faz ise kolon içine yerleştirilmiş

adsorban bir maddedir. Bu durumda gaz-katı kromatografisi adını alan sistemde (GK) maddelerin ayrılması adsorbsiyona dayanır ve daha çok basit gazların analizlerinde kullanılır.

Gaz kromatografisinin daha çok kullanılan şekli gaz-sıvı kromatografisi (GSK) dir. Bu sistemde kolon içindeki yüzeyi geniş deaktive edilmiş katı madde, kaynama noktası yüksek yağimsı bir sıvı ile kaplanır. Burada maddelerin dağılım katsayısına göre ayrılmalarını sağlayan bu sıvı sabit faz görevini görür. 700'ün üstünde olan bu sıvı maddeler kaynama noktaları ve polaritelerine göre sınıflandırılmışlardır. Maddelerin sistematik ayrılmasında sabit faz maddesi çok önem taşır.

Gaz kromatografisinde kolon çeşidi de önem taşır. Normal kromatografik analizlerde dolgulu kolon kullanılır. Cam veya çelik olan kolonların iç çapı 3.2 mm. İle 4 mm; dış çapları 3.2 mm. İle 6.4 mm; uzunlukları da 0.5 m. ile 4 m. arasında değişir. Kapiler kolonlarla ayırma işlemi daha etkin olur. Alıkonma zamanı (Retention time) çok yakın olan maddeler ayrılabilirler. Kapiler kolonlar çok ince (0.2 mm-0.5 mm iç çapında) ve çok uzundurlar (10 m.- 60 m. uzunluğunda).

Toksikolojik analizlerde (Head-Space) denilen düzenekleri içeren gaz kromatografisi tekniğinden de çok yararlanır. Bu teknikle doğrudan kan,

serum gibi biyolojik sıvılarda uçucu maddelerin tanımlanmaları yapılabilir ve bu şekilde kolon materyalinin kirlenmesi minimuma indirgenir. Küçük bir cam tüpe (7 ml. kadar sıvı alabilecek büyüklükte), 0.2 – 0.5 ml. numune konur, ağzı politetrafloroetilen yapısında bir kapakla sıkıca kapatılır. Bu şekilde hazırlanan numuneler kromatografteki “head-space” düzeneğine yerleştirilerek uygun bir sıcaklıkta 10 dakika dengeye bırakılır. Böylece uçucu madde gaz fazına geçmiş olur.

Bu gaz fazındaki numune minimum otomatik sistemle kolona enjekte edilir. Bu düzenekle kanda alkol ve diğer uçucu bileşikleri, evlerde vernik, cila gibi karışımların içindeki uçucu maddelerin analizleri yapılabilir. Gaz kromatografisinde maddelerin ayrılmasında sıvı fazın cinsi, taşıyıcı gazın hızı, kolonun etkinliği, boyutları ve sıcaklığı, kullanılan dedektör tipi rol oynayan önemli faktörler arasındadır.

Gaz kromatografisi ayrıca kantitatif amaçla da kullanılır. Kütle spektrometrisi gaz kromatografisi ile kombine edilebilmekte ve herhangi bir bileşiğe ait kütle spektrumunun belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu şekilde nitrojen fosfor dedektörleri nitrojen ve fosfor içeren ürünlere spesifiktir ve çok hassastır. Benzer şekilde elektron yakalayıcı dedektörler halojen içeren bileşimleri

yakalamada kullanılır ayrıca alev iyonizasyon ve ısı iletken dedektörler de GC'de kullanılırlar.

GC'nin en önemli dezavantajı; uygulandığında düşük moleküler ağırlıklı uçucu maddelerin tespitinde ortaya çıkar. Polar maddeler bu yöntemle analiz edilemezler ve kimyasal olarak non-polar bileşenlere dönüştürülme sonrası analizleri yapılabilir.

3. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ

(Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ayırma gücü ve duyarlılığı gaz kromatografisine göre daha yüksek olan bir tekniktir. İlk kez 1969'da kullanılmaya başlanmıştır. 1970'lerin sonunda rutin analiz yapan pek çok laboratuarda kullanıma geçmiştir.

HPLC, sütun kromatografisinin bir şeklidir. Bazı yönleri ile gaz kromatografisine benzemesine karşın (kalitatif ve kantitatif tayinin aynı işlemle gerçekleştirilmesi, karışımdaki maddelerin ayrı ayrı pikler vermesi gibi), mobil fazın sıvı olması ve yüksek basıncın güçlü bir pompayla sağlanması bakımından gaz kromatografisinden ayrılır. Güçlü bir pompa ve basınca dayanıklı bir sistemle mobil fazın kolonda bulunan sabit fazdan geçişi kolaylaşmakta ve kısa zamanda bu ayrılma sağlanabilmektedir. Mobil faz

olarak kullanılan çözücü önce güçlü bir pompa yardımı ile tüm sistemden geçirilir. Daha sonra ayrılması istenen karışım, bir mikroenjektörle sisteme verilir. Mobil fazla sürüklenen maddeler kolona geçerler, kolonda (sabit faz içerir) maddeler dağılım, adsorbsiyon, iyon değiştirme özelliklerine göre ayrılırlar. Kolonu bu şekilde terkeden maddeler gaz kromatografisinde olduğu gibi uygun bir dedektörle (UV absorpsiyonu, refraksiyon, floresans ölçen) kalitatif ve kantitatif değerlendirmeleri (kaydedici ile piklerden alınan kromatogramlar ile) yapılır.

HPLC'nin gaz kromatografisine göre üstünlüğü, daha iyi bir ayırma ve duyarlık dışında, bozunan maddeler, iyonik maddeler ve yüksek molekül ağırlıklı maddelerin (proteinler, peptitler gibi) analizinde kullanılabilmesidir.

Toksikolojik analizlerde HPLC'nin geniş bir uygulama alanı vardır. Birçok organik çözücünün biyolojik izlenmelerinde (metil alkol, benzen, toluen, ksilen gibi), fenolik maddelerin birbirlerinden ayrılmasında (fenol ve krezoller gibi) HPLC tercih edilmektedir.

GC'nin uçucu molekülleri ayırma konusundaki yetersizliği yanında HPLC hem polar hem de non-polar bileşikleri ayırabilmektedir. HPLC'de hem mobil hem de sabit faz sıvı niteliktedir.

1941 yılında ilk defa kolon kullanılan sıvı kromatografi tanımlanmıştır. Normal sıvı

kromatografide sabit faz polar olup mobil faz non-polardır. Ters faz sıvı kromatografide sabit faz non-polar, mobil faz polardır. HPLC'de UV, floresans, iletken, refraktör indeks dedektör gibi çok çeşitli dedektörler kullanılabilir.

Klinik laboratuvarlarda UV dedektörler sıklıkla kullanılmakta bunun yanında floresans ve elektrokimyasal tespit teknikleri de kullanılmaktadır.

4. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ

Özel bir düzenek kullanarak pozitif ve negatif yüklü parçacıklar meydana getirilmesi, bu parçacıkların m/e (kütle/yük) oranlarına göre ayrışmaları, belirlenmeleri ve bunlardan yararlanarak numunenin teşhis edilmesi üzerine kurulmuş olan metotlar topluluğuna kütle spektrometrisi denir. Yüklü tanecikler, bir molekül iyonu ve metal iyonu olabildiği gibi molekülün parçalanmasıyla meydana gelen herhangi bir parçacık da olabilir. Bu taneciklerden her biri spektrumda m/e değerlerine göre birer pik verirler.

Bir maddenin kütle spektrumunun elde edilmesi için bunun önce gaz fazına geçirilmesi ve daha sonra da iyonlaştırılması gerekir. Gaz fazına geçirme işlemi ısıtılarak gerçekleştirilirken, iyonlaştırma işleminin çeşitli yolları vardır. En çok kullanılan iyonlaştırma işlemi, ısıtılmış bir flamanın yayılan ve elektrik alanından geçirilerek

hızlandırılan elektron demeti ile bombardıman etmektir.

Bunun dışında, moleküllerin bir elektriksel ark veya kıvılcım içinden geçirilmesi, uygun enerjili fotonlarla karşılaştırılması, molekülleri başka iyonlarla çarpıştırarak, lazer ışması yardımı, elektriksel alan içerisinde püskürtmek ve sadece ısıtma ile de iyonlaştırma işlemi gerçekleştirilebilir.

Kütle spektrofotometreleri, molekülü iyonlaştırdıktan sonra parçalara ayırıp her bir parçayı ayrı dedekte edebilmektedir. Bu nedenle yapı tayinlerinde de kullanılabilirler.

Kütle spektrumunda en şiddetli pik, temel pik adını alır ve parçalanma ürünleri içinde en kararlı olan iyonla aittir. Öteki piklerin yüksekliği ya bu pikin yüksekliğine bölünerek veya toplam pik yüksekliğine bölünerek verilir.

Kütle spektrometrisi yapısı belli maddeleri teşhis ve tayin etmek amacıyla kullanılabilir gibi, yapısı belli olmayan yeni maddelerin yapısını aydınlatmak amacıyla da kullanılabilir.

Ayrıca, karışım halinde bulunan bileşenlerin kütle spektrometrisiyle kantitatif analizleri de mümkündür ancak bu amaçla kullanıldığı durumlarda kütle spektrometresi, kromatografi aletine dedektör olarak kullanılır (GC-MS, LC-MS). Bazı durumlarda ise, duyarlılığı arttırmak için iki kütle spektrometresi birbirine bağlanarak kullanılabilir.

GC ve HPLC'den geçen biyolojik sıvılardan ayrılan saf madde kütle spektrometresine sunulur. Tipik bir kütle spektrometresi, iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektöründen oluşan kapalı bir sistemdir. İyon kaynağı molekülün yapısal özellikleri açısından karakteristiğini ortaya koyan fonksiyonel alt gruplarının ayrıştırılmasından sorumludur.

Kütle spektrumu bileşikler için bir moleküler parmak izi anlamını taşır. Küçük molekülleri yanında protein ve DNA gibi makromoleküller için de geçerli bir yöntemdir. Kütle spektrometresi HPLC için bir kolon gaz kromatografisi için bir dedektör rolünü de üstlenir.

5- ATOMİK ABSORBSİYON SPEKTROFOTOMETRİSİ (AAS)

1955 yılından sonra geliştirilmiş olan atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) yüksek sıcaklıkta gaz halinde bulunan element atomlarının elektromanyetik ışınları absorblaması üzerine kurulmuştur. Absorblanan elektromagnetik ışınlar genellikle ultraviyole ve görünür alan ışınlarıdır.

AAS, genelde alev spektroskopisinin bir şeklidir. Alev spektroskopisi, serbest atomlar üzerine kurulmuş bir spektroskopi dalıdır. Alev spektroskopisinde, moleküler spektroskopide görülen absorpsiyon

bantları yerine absorpsiyon ve emisyon çizgileri görülür.

Serbest atomlar elde etmek için madde ya alevde veya bir elektrik düzeneğinde ısıtılır. Bunun için analiz yapılacak elementi bileşik halinde (tuzu) içeren çözelti, özel bir düzeneğe çok küçük kürecikler halinde alev içine püskürtülür. Alev içine püskürtülen çözeltinin önce suyu buharlaşır, geride kalan tuzlar gaz molekülleri haline dönüşürler. Gaz halindeki tuz molekülleri ise ayrılarak serbest element atomlarını verirler.

Gaz halindeki atomların alev sıcaklığında termal enerji absorblaması ve ondan sonra absorbladığı enerjiyi kısmen veya tamamen spektral çizgi halinde vermesi olayı atomik emisyon veya alev emisyon spektroskopisi adını alır. Alev içinde bulunan, bir atom türünün, dışarıdan başka bir kaynaktan alev içine gönderilen kendine özgü ışın demetini kısmen absorblaması ve geride kalan karakteristik ışın şiddetinin derecesini ölçme üzerine kurulmuş spektroskopi dalına da atomik absorpsiyon spektroskopisi denir. Bu amaçla geliştirilmiş cihazlara da atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) adı verilir.

AAS, adli bilimlerde (patlayıcı madde kalıntısında antimon, baryum, kurşun gibi elementlerin tayininde), adli ve analitik toksikolojide ağır metal zehirlenmelerinin biyolojik materyalde tayininde sık

kullanılan bir cihazdır. Ayrıca ağır metallere mesleksi maruziyetin biyolojik izlenmesinde de kullanılır.

6. GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (GC-MS)

Klinik toksikoloji laboratuvarlarında çeşitli biyolojik sıvılarda (örn: idrar) olası maddeleri ve miktarlarını tayin amacıyla kullanılır. GC-MS, kütle spektrumu açısından geniş bir kütüphaneye sahiptir ve ilaç suistimali tespitinde de spesifikite ve sensitivite açısından yeterli bir perspektif sağlar. HPLC-MS ile yüksek molekül ağırlıklı polar ve ısı değişkenliği gösteren bileşikler analiz edilebilir, bunlar GC-MS de tayin edilemezler.

Terapötik ilaç analizlerinde, ilaç suistimali tespitinde, GC-MS ünitesi içerisinde bulunan elektron iyonizasyon özelliği sıkça kullanılmaktadır. Elektron püskürtme arayüzü HPLC-MS analizörlerinde sıklıkla kullanılan bir komponenttir. Bu arayüz, ısı ve basınç mekanizmaları yardımıyla güçlü elektrik alanı ortamında iyonların çözücü sistem içerisinde etkin bir şekilde dağılmalarını sağlar böylece uçucu olmayan polar bileşiklerin iyonizasyonu gerçekleşir. Analitten yüklü partiküller ürettikten sonra bu partiküller, kolon tarafından ayrıştırılır. Kütle spektrumu bu yüklü partiküllerin tespiti ile mümkündür bu da dedektör ile gerçekleşir. Dört

kutuplu dedektörler ile ilaç miktarı belirlenir.

7. GC, GC-MS, HPLC, HPLC-MS'in İLAÇ ANALİZİNDE UYGULANMASI

Klinik laboratuvarlarda rutin TİDİ uygulanmasında immunoassaylerin yaygın olmasına rağmen bir çok ilacın tespiti ve miktar tayininde GC, GC-MS, HPLC, HPLC-MS kullanılır. Yapı benzerliğinin, hook etkisinin ve sensitivite probleminin olduğu durumlarda immunoassay yöntemlere alternatifirler. Anti-retroviral tedavide düzey izleminde ilk seçeneği oluştururlar. Burada özellikle HPLC-MS oldukça güvenilir bir yöntemdir. Ayrıca, trisiklik antidepresanların düzey izleminde FPIA kitlerinin olmasına rağmen çapraz reaksiyonlarının bu yöntemde çokça gözlenmesi nedeniyle GC-MS, HPLC-MS yöntemi tercih edilmektedir. Aynı şekilde immunosupresanlar için de HPLC-MS yöntemi halen en yaygın yöntemlerdendir.

8. KAPİLLER ELEKTROFOREZİN İLAÇ ANALİZİNDE KULLANILMASI

Kapiller (zone) elektroforezde, nanolitre ölçüsünde spesimenler tamponla doldurulmuş silika kaplanmış kapiller kolonlar (15-100cm uzunluğunda, internal çapı 25-75 µm) içinde yüksek voltajlı doğru akım alanı oluşturulduğunda katılar migrasyona uğrar, elektroforetik ve elektroozmotik akım sonucunda kolonu

terk ederken dedeksiyon gerçekleşir. Bu terk etme esnasında floresans dedektörle miktar tayini yapılır.

Radyometrik, amperometrik bazen de kütle spektrometrik ölçüm yapılabilir. Sadece yüklü patiküller kapiller elektroforezde ayrılabilir, nötr bileşikler bu yöntemle analiz edilemez. Bu teknik immunoassay ve HPLC yöntemleri ile uyumlu sonuçlar veren güvenilir bir yöntemdir. Sülfometaksazol ve trimetoprimin bu yönteme ait güzel örnekleri söz konusudur. Ayrıca metotreksat, lökovorin ve folik asit için de tanımlanmış spesifik kapiller kolonlar söz konusudur. Lamotrijinin immunoassay ölçüm yöntemleri tanımlanmıştır fakat elektron püskürtmeli iyonizasyon kütle spektrometrisi ile ölçümü de mümkündür. Çok sayıda antiinflamatuvar ilaç için kapiller elektroforez yöntemleri uygulanmıştır.

9. DİĞER ANALİTİK TEKNİKLER

Lityum manik depresif hastalıkta 1970'lerden beri kullanılan bir ajandır. Dar terapötik indeksi dolayısıyla terapötik düzey izlemi önemlidir. İnsan serum ve plazma örneklerinden atomik emisyon

spektrometrisi, alev atomik emisyon spektroskopisi, alev atomik absorpsiyon spektroskopisi, potansiyometri, iyon selektif elektrod ve kolorimetrik ölçümler lityum için tanımlanmış, kolorimetrik metod temelde aromatik organik reaktif crown eter ve amid iyonofor kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Crown eter ve kriptanlar lityum için yüksek selektivite sağlayan maddelerdir. Platin düzeylerinin kanser tedavisinde izlenmesi önemlidir. Burada da alev atomik absorpsiyon spektrofotometrik ölçümleri yardımcıdır. Sonuçta immunoassay yöntemleri hızlı sonuç vermesi yanında çapraz reaksiyonlar ve spesifikite problemleri taşıyan bir uygulama alanı olup tüm ilaçlar için de kitlerin mevcut olmaması nedeniyle HPLC, GC-MS ve özellikle HPLC-MS terapötik ilaç izlemi için referans laboratuvarlarda olmazsa olmaz uygulamalardandır.

TERAPÖTİK İLAÇ GRUPLARINDA ANALİZ:

Antikonvülzanların Analizi

Antiepileptik ilaçlardan fenitoin, karbamazepin, fenobarbital, etosüksimid, pirimidon ve valproik asit için yaygın immunoassay kitleri söz konusudur. Önceleri, GC ve HPLC bu ilaçların düzeylerinde kullanılan yöntemlerdi. Immunoassay yöntemlerinin GC sonuçları ile iyi korelasyonlar göstermesi yanında kesinlik açısından immunoassay yöntemlerinin de güçlü olduklarının belirlenmesi ve maddeler arası girişimin az olması nedeniyle ön plana çıktıkları görülmektedir.

Bu alanda immunoassay yönteminin sınırlılıkları açısından karbamazepinin aktif metaboliti olan karbamazepin-10,11 epoksit türevinin renal yetmezliği olan hastalarda birikimi söz konusu olup immunoassay kitleri metabolit ile ilacı birbirinden ayıramadığından bu noktada sınırlılık oluşmaktadır. Çapraz reaksiyon yüzdesi oldukça geniş bir yelpazede gözlenmektedir (%4-%94).

Berg-Buckley'in tanımladığı HPLC protokolü karbamazepin-karbamazepin-10,11 epoksit, fenitoin ve fenobarbitalin serum ve plazma düzeylerini UV deteksiyon yardımıyla göstermektedir. Ayrıca GC-MS, HPLC-MS, Kapiller GC de bu amaçla kullanılmaktadır. Yeni

antiepileptik ilaçlar, HPLC-MS yöntemi ile tayin edilebilmektedir ve ticari kitleri bulunmamaktadır. Gabapentin, lamotrijin, okskarbazepin, felbamatin plazma düzeyleri ters faz HPLC kolonu ve UV dedektörü ile tespit edilebilmektedir. Pregabalin için HPLC'de C8 kolonu aracılığıyla pikrosülfonik aside dönüşümü sonrası düzey ölçümü tanımlanmıştır.

Kardiyovasküler ilaçların Analizi

Digoksin, prokainamid, lidokain, kinidin ve dizopiramid için immunoassay kitleri mevcut olup FPIA yöntemiyle dizopiramidin total ve serbest konsantrasyonları serumda saptanabilmektedir. Bu ilaç için HPLC ve FPIA ölçümlerinin korelasyonları dikkat çekicidir. Immunoassay yöntemleri digoksin ölçümünde interferans gösterebilmekte HPLC-MS yöntemin digoksin ölçümünde çok spesifik olduğu bilinmektedir. Hızlı HPLC katı faz ekstraksiyon yöntemi ile farklı antiaritmik ilaçların (amiodaron, aprindin, dizopiramid, filakainid, lidokain, lorkainid, meksiletin, prokainamin, propafenon, sotalol, tokainid, verapamil) plazma düzeyi tayini gerçekleştirilmiştir.

Bu ilaçların çoğu bazik yapıda olduklarından kolonun alkalinizasyonu, ekstraksiyon kolonundan çok iyi absorpsiyon edinmelerine sebep olur.

Meksiletinin serum konsantrasyonlarının GC-MS ile ölçümü mümkündür. Burada, kütle spektrometresinde iyon izlem modunun seçilmesi gereklidir.

İmmunosüpresiflerin Analizi

İmmunosüpresif ilaçların izleminin yapılması organ transplantasyonu sonrasında organ reddi, profilaksi uygulamaları ve immunsupresyon yapılan

diğer durumlarda rutin bir uygulamadır. Bu gruptaki ilaçların dar terapötik penceresi vardır, ilaç etkileşimine açıktırlar ve dozun kişiselleştirilmesi sıklıkla gerektiğinden düzey izlemleri önemlidir.

İmmunosüpresifler için tanımlanmış yöntemler

Siklosporin	Takrolimus	Sirolimus	Everolimus
<ul style="list-style-type: none">• mFPIA- TDx- AxSYM• pFPIA• EMIT• mRIA• Cedia+• ACMA• Integra• HPLC/UV• HPLC-MS	<ul style="list-style-type: none">• MEIA• EMIT• Cedia• HPLC-MS	<ul style="list-style-type: none">• MEIA• Cedia• HPLC/UV• HPLC-MS	<ul style="list-style-type: none">• FPIA• HPLC/UV• HPLC-MS

Çeşitli İlaç Grupları İçin Analizler:

Antiastmatik ilaçlardan teofilin ve kafein için immunoassay kitleri mevcuttur. FPIA yönteminde, TCA düzeyinin tespitinde kişi yüksek doz karbamazepin almışsa yanlışlıkla TCA seviyeleri yüksek olarak ölçülebilir ki bu TCA- karbamazepin arasındaki çapraz reaksiyonun sonucudur. HPLC ve GC-MS analizleri ile böyle bir şüpheli ekarte edilebilir. Ayrıca, bu yöntemlerle venlafaksin, fluoksetin,

viloksazin, fluvoksamin, mianserin, mirtazepin gibi çok sayıda antidepresanın ölçümü de mümkündür. HPLC, elektron püskürtmeli iyonizasyon kütle spektrometrisiyle kombine edildiğinde fluoksetin, sitalopram, paroksetin ve venlafaksin plazma düzeyleri net bir şekilde tespit edilebilmektedir.

Antibiyotiklerin Analizleri

Amikasin, gentamisin, tobramisin ve vankomisin için immunoassay kitleri mevcut olup GC ve HPLC uygulamalarında uçuculuk, renk değişikliği ve hidrofilik özelliklerden yoksun olan aminoglikozidler bu yöntemlerle analizlerinde türevlendirilmeleri gerekmektedir.

Ayrıca LC-MS ile metronidazol, spiramisin'in bir çok farklı dokudaki konsantrasyonu ölçülebilmektedir. Ornidazol internal standart olarak kullanılmaktadır. Amfoterisin B'nin invaziv fungal enfeksiyonlardaki kullanımı göz önüne alındığında düzey tayini için C18 kolonu ve HPLC analizi ile biyolojik örneklerde çalışılması mümkündür. Azitromisin için elektrokimyasal dedektör ile HPLC uygulaması ve ardışık MS ile kantitatif tayin söz konusudur.

Antineoplastik ilaçların analizi

Metotreksat için immunoassay kitleri mevcut olup çok düşük düzeyler bu yöntemle tayin edilememekte bunun için HPLC-MS kullanılması gerekmektedir. Metotreksat maruziyetinde sağlık personeli için idrar düzeylerinin tespiti önem arz etmektedir. Ayrıca katı faz ekstraksiyonu ile HPLC analizinde silika kolonların kullanımı da söz konusudur. HPLC yöntemi ile doksorubisin, etoposid, 5-florourasil, mensa, mitoksantron, taksol,

tamoksifen, akrolein tespiti de yapılabilmektedir.

Kapiller kolonlu GC; siklofosamid, lomustin, karmustin analizinde kullanılmaktadır. Doketaksiel ve paklitaksiel konsantrasyonları UV dedektörlü HPLC sistemi sayesinde plazmadan yapılabilmektedir. Yine, imatinibin plazma düzeyleri HPLC-MS ile tanımlanmıştır.

Antrasiklinlerin serum düzeylerini elektron püskürtmeli kütle spektrometri-sıvı kromatografi kombinasyonunda ölçmek mümkündür, bununla aktif metabolitler de ölçülebilmektedir. İnternal standart olarak aklorubisin kullanılmaktadır. Ters faz C18 kolon bu tayin için gereklidir.

ANALİTİK YÖNTEMLERDE ÖNE ÇIKAN BAŞLIKLAR

SPEKTROMETRİ VE FLOROMETRİ

GC ve HPLC ortaya çıkmadan önce ilaç örnekleri spektrofotometrik metodlarla analiz edilmekteydi. Yöntem, µg/ml düzeylerinde halen basit bir uygulanabilirliğe sahiptir. Dezavantajları; yüksek hacimli örnek ihtiyacı, kompleks ekstraksiyon işlemleri ve diğer bileşiklerle karıştırılabilmeleridir.

İNCE TABAKA KROMATOGRAFİSİ

Pek çok ilacı tayin edebilmekle birlikte yetersiz hassasiyete sahip ve zaman alıcıdır. Fakat toksikoloji laboratuvarları açısından faydalı bir tekniktir.

HPLC VE GC

Bu yöntemler spesifik, kesin ve hassastır. Çoklu analizler de yapmaya olanak sağlarlar. Dezavantajları:

- Ekstraksiyon işlemine ihtiyaç duyulması
- Yavaş analiz
- Zamanla kolonun bozulması
- Kompleks analizler fazla miktarda işleme ihtiyaç duyarlar.

Bu iki sistemden HPLC daha iyidir çünkü termolabil bileşiklerin analizini yapmaya olanak sağlar.

RIA

Hassas ve kesin bir yöntem olmakla birlikte radionükleotitlerin kullanımına ihtiyaç duyar. Bu teknikte diğer ilaçlarla çapraz reaktivite önemli bir problemdir. Ayrıca optikçe aktif izomeri bulmak her zaman mümkün değildir. Radyoaktif materyalin kullanımı bu yöntemde sınırlayıcı faktördür.

ELISA

Bu teknik RIA ile aynı avantajlara sahip olmakla birlikte radyoaktif madde kullanımına ihtiyaç duymaz ve bağlı ile bağlı olmayan fraksiyonları ayırmaya gerek yoktur. Fakat çapraz reaktivite problemi mevcuttur. Burgess fenitoinin plazma konsantrasyonunu normal ve son evre renal hastalığa sahip hastalarda EMIT

ve GLC kullanarak karşılaştırmıştır ve renal yetmezliğe sahip hastalarda EMIT sonuçları GLC'den %90 yüksek çıkmıştır. RIA digoksinin tayini için oldukça güvenilir yöntemdir.,

FPIA

Bu analizin prosedürü ayırım işlemine gerek duymaksızın floresans polarizasyon ile yarışmalı protein bağlanmasını içerir. Bu metodun avantajları, doğruluğu, kesinliği ve kısa uygulama zamanıdır. FPIA, EMIT ve HPLC'i kullanarak üremik hastalarda total ve serbest fenitoin düzeyleri karşılaştırılmış EMIT analizlerinde karışmanın minimal olduğunu ve HPLC ile FPIA saptamalarının birbiriyle uyduğu tespit edilmiştir.

DOZAJIN AYARLANMASI

Etki anındaki ilaç konsantrasyonunun etkisini pek çok faktör değiştirebilmektedir, örneğin pek çok hasta için terapötik düzeyde olan digoksin konsantrasyonu hipokalemi varlığında yüksektir. Ayrıca beraber verilen ilaçların sinerjistik veya antagonistik etkileri söz konusu olduğunda da serum ilaç konsantrasyonunun düzenlenmesi gerekmektedir.

HASTALARDA BEKLENMEYEN SERUM KONSANTRASYONLARININ BAŞLICA NEDENLERİ

Uyunc gösterilmemesi, uygunsuz dozaj, malabsorpsiyon, düşük biyoyararlanım, ilaç etkileşimleri, protein bağlanmasını değiştiren hepatik ve renal hastalıklar ve genetik faktörler başlıca sebepleri oluşturur. Bu faktörler elimine edilemezse dozaj ayarlaması şarttır.

ÖRNEK TOPLANMASININ ZAMANLAMASI

En iyi örnekleme zamanı, doz öncesi veya idame dozundan hemen önce gelen fazdır. Bu prensip sabahları birer kez uygulanan dijitalis için önemlidir. Fenitoin gibi uzun yarılanma ömrüne sahip ilaçlar için en az 4 veya 5 yarılanma ömrünün örnek alınmadan önce geçmiş olması beklenir.

BAZI ÖNEMLİ İLAÇLAR İÇİN ÖRNEK ALINMA ZAMANLARI

Fenitoin: uzun yarı ömre sahip olduğundan tek günlük dozun ardından konsantrasyon izlem zamanı uygundur.

Karbamazepin: yarı ömrü tek dozu takiben 48 saat kadar uzundur. Pik seviyenin 3 saat ardından konsantrasyonun tespiti uygundur.

Digoksin: uygunsuz yüksek seviyeleri önlemek için dozun 6 saat ardından ölçüm yapılmalıdır.

Teofilin: Dar terapötik pencereye sahip bir ilaçtır. Yavaş salımlı formülasyonu kullanan hastalarda, örnekleme zamanı kritiklik teşkil etmez.

Lityum: 12 saatlik örnek dozaj ayarlaması için en kesin değeri verir.

Fenobarbital: her hangi bir zaman örnekleme için uygundur.

Gentamisin: ön doz piki, i.v uygulamadan yarım saat sonra ve i.m uygulamadan 1 saat sonradır.

İLAC	Kararlı Duruma Ulaşma Zamanı (Gün)	Mak. Klinik Etki	Aktif Metabolit	Örnek Alma Zamanı	Hedef Aralık	Min.Plazma/ Serum Hacmi (mL)
Amitriptilin	7-10	4-6 hafta	Nortriptilin	Doz Alınımından Hemen Önce	100-250 µg/L	2.0

Kafein	2			Doz Alınımından 1-2 Saat Sonra	12-36 mg/L	0.2
Karbamazepin	14-28			Doz Alınımından Hemen Önce	4-12 mg/L	0.5
Klomipramin	28-42		Norklomipramin	Doz Alınımından Hemen Önce	150-800 µg/L	2.0
Desipramin	10-14	4-6 hafta		Doz Alınımından Hemen Önce	100-250 µg/L	2.0
Digoksin	5-7			Doz Alınımından 6-24 Saat Sonra	0.8-2.0 µg/L	0.5
Dotiyepin	7-10	4-6 hafta	Nordotiyepin	Doz Alınımından Hemen Önce	100-300 µg/L	2.0
Etosüksimid	7-14			Doz Alınımından Hemen Önce *	40-100 mg/L	0.5
Fluoksetin	28-42		Norfluoksetin	Doz Alınımından Hemen Önce	150-800 µg/L	2.0
Gabapentin	1-2			Doz Alınımından Hemen Önce	2-20mg/L	0.5
İmipramin	7-10 gün	4-6 hafta	Desipramin	Doz Alınımından Hemen Önce	150-300 µg/L	2.0
Lamotrijin	4-6 gün			Doz Alınımından	1-4 mg/L	0.5

				Hemen Önce		
Nortriptilin	10-14 gün	4-6 hafta		Doz Alınımından Hemen Önce	50-150 µg/L	2.0
Fenobarbiton	10-20 gün			Doz Alınımından Hemen Önce *	15-40 mg/L	0.5
Fenitoin	7-35 gün			Doz Alınımından Hemen Önce *	10-20 mg/L	0.5
Teofilin (Erişkin)	2 gün			Doz Alınımından 2-4 Saat Sonra	10-20 mg/L	0.5
Teofilin (Yenidoğan)	2 gün			Doz Alınımından 2-4 Saat Sonra	5-10 mg/L	0.5
Valproik asid	2-3 gün			Doz Alınımından Hemen Önce	100mg/L'ye kadar	0.5
Vigabatrin	5-10 gün			Doz Alınımından Hemen Önce	5-35 µg/L	0.5

DOZ REJİMİ

İlaç terapisinin süreci, dozajı ve alınan son dozun zamanı TİDİ açısından önemlidir.

AKTİF METABOLİT

Pek çok ilaç farmakolojik olarak aktif metabolitlere dönüşürler. Böyle ilaçların terapötik etkileri değerlendirilirken

serumda bulunan tüm aktif maddelerin katkıları düşünülmelidir. Örneğin imipramin aktif metaboliti desipramine dönüşmektedir.

HASTALIK DURUMUNUN

ETKİLERİ

Akut veya kronik hastalıklar ilaç klirensini değiştirirler. Dolayısıyla ilişkili sistemin patofizyolojik durumuna göre ilaç konsantrasyonları artar veya azalır. Karaciğer hastalığı, suda daha çok çözünen formlara dönüşen ilaçların klirensini bozar. Konjestif kalp yetmezliği, hepatik klirens ve kısmen de renal klirensi dolaylı olarak etkileyeceğinden artmış ilaç düzeyleri söz konusu olabilir.

SERBEST İLAÇ İZLEMİ

Yeni filtrasyon cihazlarının (equilibrium diyaliz, ultradiyaliz, ultrasantrifüjasyon) geliştirilmesi serumda serbest bağlanmamış ilaç seviyelerini ölçmeyi mümkün kılmıştır. Avantajlar; serbest konsantrasyonlar plazma proteinlerinden bağımsızdır ve farmakolojik olarak aktif konsantrasyonu verir. Dezavantajları ise; zaman alıcı, pahalı ve terapötik aralıkların pek çok ilaç için bulunmamasıdır.

YAŞIN ETKİSİ

İlaçlara cevap yaşla beraber değişkenlik gösterir. Yaşlı hastalar santral sinir sistemi ilaçlarına daha duyarlıyken propranololün kardiyovasküler etkilerine daha az duyarlıdırlar. Genç çocuklar ise morfinin santral depresyon yapıcı etkisine daha duyarlıdırlar. Fakat yaşa göre

bireyselleştirmeyi başarabilmek için çok daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

GEBELİK

Fenitoin ve fenobarbitalin plazma ilaç seviyeleri hamilelik sırasında azalmıştır.

Kaynakça

1. Jolley ME, Stroupe SD, Schwenzer KS, Wang CJ, et al. Fluorescence Polarization immunoassay III. An automated system for therapeutic drug determination. Clin Chem 1981; 27: 1575–1579.
2. Hawks RL, Chian CN, eds. Urine Testing for Drugs of Abuse. Rockville, MD: National Institute of Drug Abuse (NIDA), Department of Health and Human Services; 1986. NIDA research monograph 73.
3. Jeon SI, Yang X, Andrade JD. Modeling of homogeneous cloned enzyme donor immunoassay. Anal Biochem 2004; 333: 136–147.
4. Datta P, Dasgupta A. A new turbidimetric digoxin immunoassay on the ADVIA 1650 analyzer is free from interference by spironolactone, potassium canrenoate, and their common metabolite canrenone. Ther Drug Monit 2003; 25: 478–482.
5. Dai JL, Sokoll LJ, Chan DW. Automated chemiluminescent immunoassay analyzers. J Clin Ligand Assay 1998; 21: 377–385. Chapter 3 / Assay of Therapeutic Drugs 83
6. MEIA Montagne P, Varcin P, Cuilliere ML, Duheille J. Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay with microsphere-antigen conjugate. Bioconjugate Chem 1992; 3: 187–193.
7. Datta P, Larsen F. Specificity of digoxin immunoassays toward digoxin metabolites. Clin Chem 1994; 40: 1348–1349.

8. Datta P. Oxaprozin and 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin interference in phenytoin immunoassays. *Clin Chem* 1997; 43: 1468–1469.
9. Datta P, Dasgupta A. Bidirectional (positive/negative) interference in a digoxin immunoassay: importance of antibody specificity. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 352–357.
10. Mayer-Helm BX, Kahlig H, Rauter W. Tetramethyl-p,p'-sildiphenylene ether-dimethyl, diphenylsiloxane copolymer as stationary phase in gas chromatography. *J Chromatogr A* 2004; 1042: 147–154.
11. Gentil E, Banoub J. Characterization and differentiation of isomeric self-complementary DNA oligomers by electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1996; 31: 83–94.
12. Zancani M, Peresson C, Biroccio A, Federici G, et al. Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. *Eur J Biochem* 2004; 271: 3657–3664.
13. Marquet P, Lachatre G. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B* 1999; 7333: 93–118.
14. Taylor P. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 215–219.
15. Napoli KL. Is microparticle enzyme-linked immunoassay (MEIA) reliable for use of tacrolimus TDM? Comparison of MEIA to liquid chromatography with mass spectrometric detection using longitudinal trough samples from transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 491–504.
16. Kuperberg HJ. Quantitative estimation of diphenylhydantoin, primidone and phenobarbital in plasma by gas liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1970; 29: 282–288.
17. Davis HL, Falk KJ, Bailey DG. Improved method for the simultaneous determinations of Phenobarbital, primidone and diphenylhydantoin in patients' serum by gas liquid chromatography. *J Chromatogr* 1975; 9: 61–66.
18. Attwell SH, Green VA, Haney WG. Development and evaluation of method for simultaneous determination of phenobarbital and diphenylhydantoin in plasma by high pressure liquid chromatography. *J Pharm Sci* 1975; 64: 806–809.
19. Dietzler DN, Hoelting CR, Leckie MP, Smith CH, et al. Emit assays for five major anticonvulsant drugs: an evaluation of adaptations to two discrete kinetic analyzers. *Am J Clin Pathol* 1980; 74: 41–50.
20. Berg JD, Buckley BM. Rapid measurement of anticonvulsant drug concentrations in the out-patient clinic using HPLC with direct injection of plasma. *Ann Clin Biochem* 1987; 24: 488–493.
21. Minkova G, Getova D. Determination of carbamazepine and its metabolite carbamazepine 10, 11-epoxide in serum with gas chromatography mass spectrometry. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2001; 23: 481–485.
22. Van Rooyen GF, Badenhorst D, Swart KJ, Hundt HK, et al. Determination of carbamazepine in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry with electron spray ionization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 769: 1–7.
23. Bahrami G, Mohammadi B. Sensitive microanalysis of gabapentin by high performance liquid chromatography in human serum using pre column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofuran: application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 837: 24–28.

24. Contin M, Balboni M, Callegati E, Candela C, et al. Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 828: 113–117.
25. Dasgupta A, Hart AP. Lamotrigine analysis in plasma by gas chromatography-mass spectrometry after conversion into a tert-butyldimethylsilyl derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 693: 101–107.
26. Berry D, Millington C. Analysis of pregabalin at therapeutic concentrations in human plasma/serum by reverse phase HPLC. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 451–456.
27. Chen BH, Taylor EH, Pappas AA. Total and free disopyramide by fluorescence polarization immunoassay and relationship between free fraction and alpha-1-acid glycoprotein. *Clin Chim Acta* 1987; 163: 75–90.
28. Shaw LM, Doherty JU, Waxman HL, Josephson ME. The pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of carrying the free fraction of disopyramide. *Angiology* 1987; 38: 192–197.
29. Scislowski M, Rojek S, Klys M, Wozniak K, et al. Application of HPLC/MS for evaluation of fatal poisoning with digoxin in the aspect of medico-legal evidence. *Arch Med Sadowej Kryminol* 2002; 53: 19–31 [in Polish].
30. Verbesselt R, Tjandramaga TB, de Schepper PJ. High performance liquid chromatographic determination of 12 antiarrhythmic drugs in plasma using solid phase extraction. *Ther Drug Monit* 1991; 13: 157–165.
31. Dasgupta A, Rosenzweig IB, Turgeon J, Raisys VA. Encainide and metabolites analysis in serum or plasma using a reversed-phase high performance liquid chromatographic technique. *J Chromatogr* 1990; 526: 260–265.
32. vanBinder E, Annesley T. Liquid chromatographic analysis of mexiletine in serum with alternate application to tocainide, procainamide and N-acetylprocainamide. *Biomed Chromatogr* 1991; 5: 19–22.
33. McErlance KM, Igwemezie L, Kerr CR. Stereoselective analysis of the enantiomers of mexiletine by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection and study of stereoselective disposition in man. *J Chromatogr* 1987; 415: 335–346.
34. Minnigh MB, Alvin JD, Zemaitis MA. Determination of plasma mexiletine levels with gas chromatography-mass spectrometry and selected ion monitoring. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; 662: 118–122.
35. Dasgupta A, Appenzeller P, Moore J. Gas chromatography-electron ionization mass spectrometric analysis of serum mexiletine concentration after derivatization with 2,2,2-trichloroethyl chloroformate: a novel derivative. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 313–318.
36. Dasgupta A, Yousef O. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of serum mexiletine concentration after derivatization with perfluorooctanoyl chloride, a new derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 705: 282–288.
37. Doki K, Homma M, Kuga K, Watanabe S, et al. Simultaneous determination of serum flecainide and its metabolites by using high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 1307–1312.
38. Fischer C, Buhl K. Gas chromatography/mass spectrometry validation of high performance liquid chromatography analysis of flecainide enantiomers in serum. *Ther Drug Monit* 1992; 14: 433–435.

39. Dasgupta A, McNeese C, Wells A. Interference of carbamazepine and carbamazepine 10, 11-epoxide in the fluorescence polarization immunoassays for tricyclic antidepressants: estimation of true tricyclic antidepressant concentrations in the presence of carbamazepine using a mathematical model. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 418–423.
40. Chattergoon DS, Verjee Z, Anderson M, Johnson D, et al. Carbamazepine interference with an immune assay for tricyclic antidepressants in plasma. *J Clin Toxicol* 1998; 36: 109–113.
41. Wille SM, Maudens KE, Van Peteghem CH, Lambert WE. Development of a solid phase extraction for 13 new generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A* 2005; 1098: 19–29.
42. Juan H, Zhiling Z, Huande L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 820: 33–39.
43. Isoherranen N, Soback S. Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. *J AOAC Int* 1999; 82: 1017–1045.
44. Lai F, Sheehan T. Enhanced of detection sensitivity and cleanup selectivity for tobramycin through pre-column derivatization. *J Chromatogr* 1992; 609: 173–179.
45. Ovalles JF, Brunetto Mdel R, Gallignani M. A new method for the analysis of amikacin using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) derivatization and high performance liquid chromatography with UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39: 294–298.
46. Nicoli S, Santi P. Assay of amikacin in the skin by high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41: 994–997. Chapter 3 / Assay of Therapeutic Drugs 85
47. Kawamoto T, Mashimoto I, Yamauchi S, Watanabe M. Determination of sisomicin, netilmicin, astromicin and micromomicin in serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1984; 305: 373–379.
48. Soltes L. Aminoglycoside antibiotics—two decades of their HPLC bioanalysis. *Biomed Chromatogr* 1999; 13: 3–10.
49. Galanakis EG, Megoulas NC, Solich P, Koupparis MA. Development and validation of a novel LC non derivatization method for the determination of amikacin in pharmaceuticals based on evaporative light scattering detection. *J Pharm Biomed Appl* 2006; 40: 1114–1120.
50. Kim BH, Lee SC, Lee HJ, Ok JH. Reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using pre-column derivatization with phenylisocyanate. *Biomed Chromatogr* 2003; 17: 396–403.
51. Sagan C, Salvador A, Dubreuil D, Poulet PP, et al. Simultaneous determination of metronidazole and spiramycin in human plasma, saliva and gingival crevicular fluid by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 38:298–306.
52. Lee JW, Peterson ME, Lin P, Dressler D, et al. Quantitation of free and total amphotericin B in human biologic matrices by a liquid chromatography tandem mass spectrometric method. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 268–276.
53. Fouda HG, Schneider RP. Quantitative determination of the antibiotic azithromycin in human serum by high performance liquid chromatography (HPLC)-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: correlation with a standard HPLC electrochemical method. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 179–183.

54. Truci R, Fiorentino ML, Sottani C, Minoia C. Determination of methotrexate in human urine trace levels by solid phase extraction and high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 173–179.
55. el-Yazigi A, Ezzat A. Pharmacokinetic monitoring of anticancer drugs at King Faisal Specialist Hospital, Riyadh, Saudi Arabia. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 390–393.
56. Maring JG, Schouten L, Greijdanus B, de Vries EG, et al. A simple and sensitive fully validated HPLC-UV method for the determination of 5-fluorouracil and its metabolite 5, 6-dihydrofluorouracil in plasma. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 25–30.
57. Schoemaker NE, Rosing H, Jansen S, Schellens JH, et al. High performance liquid chromatographic analysis of the anticancer drug irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 120–124.
58. Zufia Lopez L, Aldaz Pastor A, Armendia Beitia JM, Arrobas Velilla J, et al. Determination of docetaxel and paclitaxel in human plasma by high performance liquid chromatography: validation and application to clinical pharmacokinetic studies. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 199–205.
59. Titier K, Picard S, Ducint D, Teihet E, et al. Quantification of imatinib in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 634–640.
60. Fogil S, Danesi R, Innocenti F, Di Paolo A, et al. An improved HPLC method for therapeutic drug monitoring of daunorubicin, idarubicin, doxorubicin, epirubicin and their 13-dihydro metabolites in human plasma. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 367–375.
61. Lachatre F, Marquet P, Ragot S, Gaulier JM, et al. Simultaneous determination of four anthracyclines and three active metabolites in human serum by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 738: 281–291.
62. Kerbusch T, Jeuken MJ, Derraz J, van Putten JW, et al. Determination of ifosfamide, 2 and 3-dechloroethylifosfamide using gas chromatography with nitrogen-phosphorus or mass spectrometry detection. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 613–620.
63. Sampson M, Ruddel M, Elin RJ. Lithium determination evaluated in eight analyzers. *Clin Chem* 1994; 40: 869–872.
64. Christian GD. Analytical strategies for the measurement of lithium in biological samples. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14: 899–908.
65. Kloft C, Appelius H, Siegert W, Schunack W, et al. Determination of platinum complexes in clinical samples by a rapid flameless absorption spectrometry assay. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 631–637.
66. Wong SH. Supercritical fluid chromatography and microbore liquid chromatography for drug analysis. *Clin Chem* 1989; 35: 1293–1298.
- 86 Dasgupta and Datta
67. Graves SW, Markides KE, Hollenberg NK. Application of supercritical fluid chromatography to characterize a labile digitalis-like factor. *Hypertension* 2000; 36: 1059–1064.
68. Thormann W, Zhang CX, Schmutz A. Capillary electrophoresis for drug analysis in body fluid. *Ther Drug Monit* 1996; 18: 506–520.
69. Teshima D, Otsubo K, Makino K, Itoh Y, et al. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by capillary zone electrophoresis. *Biomed Chromatogr* 2004; 18: 51–54.
70. Rodriguez Flores J, Penalvo GC, Mansilla AE, Gomez MJ. Capillary zone electrophoresis determination of methotrexate, leucovorin and folic acid in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 819: 141–147.

71. Zheng J, Jann MW, Hon YY, Shamsi SA. Development of capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of lamotrigine in human plasma. *Electrophoresis* 2004; 25: 2033–2043.

72. Fonge H, Kaale E, Govaerts C, Desmet K, et al. Bioanalysis of tobramycin for therapeutic drug monitoring by solid phase extraction and capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 810: 313–318.

73. Makino K, Itoh Y, Teshima D, Oishi R. Determination of nonsteroidal anti-

inflammatory drugs in human specimens by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 2004; 25: 1488–1495.

74. Huang Z, Timerbaev AR, Keppler BK, Hirokawa T. Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis technique. *J Chromatogr A* 2006; 1106: 75–79.

75. Suthakaran C., Adithan C. Therapeutic drug monitoring – concepts, methodology, clinical applications and limitations. *Health Administrator Vol : 19, 1: 22-26, Chapter - 7*

Bağımlılık Yapan ya da Kötüye Kullanılan İlaç/Madde Analizleri

Doç. Dr. Serap Annette Akgür

Ege Üniversitesi, Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü, İzmir

Yasal veya yasadışı ilaç/madde kötüye kullanımının yaygın olduğu ülkelerde, bağımlıların hem bireysel hem de toplumsal sorunlarının giderek artması yasal önlemler almayı zorunlu hale getirmiştir. Ülkemizde, 5237 sayılı Türk Ceza Kanunu'nun "Kullanmak için uyuşturucu veya uyarıcı madde satın almak, kabul etmek veya bulundurmak" başlıklı 191 inci maddesinin 3 ünü fıkrasında, denetimli serbestlik tedbiri olarak "belirlenen kurumda tedavi uygulanması" zorunluluğu ;

"MADDE 191.

(1) Kullanmak için uyuşturucu veya uyarıcı madde satın alan, kabul eden veya bulunduran kişi, bir yıldan iki yıla kadar hapis cezası ile cezalandırılır. Kendisi tarafından kullanılmak üzere uyuşturucu veya uyarıcı madde etkisi doğuran bitkileri yetiştiren kişi, bu fıkra hükmüne göre cezalandırılır.

(2) Uyuşturucu veya uyarıcı madde kullanan kişi hakkında, tedaviye ve denetimli serbestlik tedbirine hükmolünür" şeklinde yasalarda yer almıştır.

Bu bağlamda yasadışı madde kullanan, satan, üreten, madde etkisinde iken ya da madde temin etmek için suça karışan

madde bağımlıları zorunlu tedavi programlarına (probation) alınmaktadırlar. Ülkemizde de kriminolojik araştırmalar ve bilimsel yöntemlerdeki ilerlemeler doğrultusunda, ceza kavramı ve güvenlik tedbirleri konusunda önemli bir adım olarak başlatılan Denetimli Serbestlik (DS) uygulaması, Resmî Gazete'nin 20 Temmuz 2005 tarihli ve 25881 sayısında yayımlanarak yürürlüğe girmiştir. Bu yasa maddesine göre adli kontrol altına alınmasına karar verilenlerden uyuşturucu, uyarıcı veya uçucu maddeler ile alkol bağımlılarının tedavilerine ilişkin uygulamanın nasıl yapılacağı açıklanmıştır.

Buna göre 5237 sayılı TCK'nun 191. maddesi ve 5271 sayılı CMK'nun 109. maddesi kapsamındaki kişilerin;

"DS bürolarınca düzenlenmiş sevk belgeleri ile birlikte -bünyesinde ruh sağlığı ve hastalıkları uzmanı görev yapan ve laboratuvar imkânları yönüyle desteklenmiş- devlet hastanelerine yönlendirilmeleri" ve "Bu hastanelerde ilk muayene ve takiplerinin yapılarak laboratuvar ve klinik bulgulara göre bağımlı olduklarına karar verilen kişilerin ruh sağlığı ve hastalıkları uzmanınca belirtilen

madde bağımlılığı tedavi merkezlerine sevk edilmeleri” öngörülmektedir.

Bağımlılık yapabilen veya kötüye kullanımı olan maddeler ile ilgili madde testi birçok alanda farklı amaçlar için yapılabilir.

- Acil toksikolojik analizler - Acil servis ve klinikler (aşırı yüksek doz, vb.)

- İşyeri toksikolojik analizleri (fabrika, okul, askeri birlik, hapisane, vb.)

- Trafikteki sürücülerde, ticari araç sürücüleri vb (alkol / madde etkisi altında taşıt kullanımı)

- Yasal amaçlı yapılan toksikolojik analizler (ölümle sonuçlanmış intoksikasyon, cinsel saldırı, beyin ölümü, intihar, trafik kazası, vb.)

- Sporcularda doping analizleri

Klinik toksikolojide doğru sonucu hızlı almak, daha doğru bir sonucu geç almaktan daha önemlidir, alınan sonuca göre hemen tedaviye başlanacaktır. Oysa adli toksikolojide en doğru sonucun alınması en önemli amaçtır. Toksikolojik analizde, uygun tarama yöntemini kullanılmaması, var olan bir maddenin kişide saptanamaması veya olmayan bir maddenin bulunması gibi sonradan giderilmesi mümkün olmayan bir durum oluşturabilir. Bu amaçla, alınan/maruz kalınan ilaç/ maddenin tipine, maruziyet zamanına, maruz kalan kişinin sağ ya da ölü oluşuna göre farklı biyolojik örneklerde, söz konusu etken ve/veya

miktarı araştırılır. Son yıllara kadar tam idrar, kan, serum ve plazma gibi geleneksel biyolojik materyallerde toksikolojik analiz yapılırken bugün saç, ter, oral sıvı gibi alternatif matrislerde toksikolojik analiz önemli gelişmeler göstermiştir. Kronik kullanılan maddelerin analizinde kullanılan saç örneği, bugün gelişen analitik teknolojiler ile tek doz kullanılan maddelerin dahi analizinin yapılabilmesine olanak vermektedir.

Yargı sürecinde kullanılacak bir toksikolojik analizde düşük derişimlerdeki maddeleri belirleme ve tanımlama için etkili ve güvenli tarama yöntemlerinin kullanılması ve pozitif sonuçların daha hassas ve uluslararası standartlara uygun yöntemlerle doğrulanmasının yapılması sağlanmalıdır. Bu amaçla GC/MS (gaz kromatografi/kütle spektrometresi) veya LC/MS (sıvı kromatografi/kütle spektrometresi) kullanılan sistemlerdir .

Ancak etkili ve geniş kapsamlı bir madde taramasının tek bir yöntemle yapılması, ne yazık ki mümkün değildir. Toksikolojik analizde, önce tarama/ tanımlama aşaması uygulanır. Eğer tek veya bir grup ilaç/madde için (etil alkol, asetaminofen, lityum, amfetamin, barbitürat, benzodiazepin, kannabinoid, kokain, opiat, fensiklidin gibi) tarama yapılacaksa immunoassay yöntemleri bu aşamada kullanılabilir.

Ancak bu yöntem uygulamasında yanlış pozitiflik yönünden çapraz reaksiyon veren maddeler yönünden dikkatli olunmalıdır. Bu aşamada taranması gereken ilaç/madde konusunda yararlı olabilecek her türlü veri (kullandığı ilaçlar, vb.) klinisyen tarafından belirtilmeli, olguya göre immunoassay dışı yöntemler de kullanılmalı, gerektiğinde hedefe yönelik analiz yapılmalıdır. Yaygın olarak kullanılan çeşitli immunoassay yöntemleri (EMIT; FPI; ELISA, CEDIA..), Likit kromatografi (HPLC-DAD) ve GC/MS-LC/MS kombinasyonudur. Kombinasyona rağmen birçok sınırlılıklar bulunmaktadır. HPLC-DAD Sadece UV ışınını absorbe edebilen molekülleri saptayabilir, ayrıca aynı spektrumu veren analog bir çok madde olabilir. GC-MS volatil olmayan ve termolabil birçok maddelerin analizi uygun değildir. Son yıllarda düşük maliyetli MS (Mass Spectrometry–Kütle spektrometresi) detektörlerinin gelişimi sonrası, insan vücudunda yabancı maddelerin varlığının analizi, LC-MS (Liquid Chromatographic-Mass Spectrometry), GC-MS (Gas Chromatographic-Mass Spectrometry) sistemlerinin uygulanabilirliği ile önemli bir ilerleme göstermiştir.

Diğer taraftan analiz için örnek hazırlanmasının önemi, ayırma veya saptamada olası girişim yapabilecek maddelerin uzaklaştırılması, derişiminin artırılması (duyarlılığının yükseltilmesi),

analitin ekstraksiyon, ayırma ve tayine uygun hale dönüştürülmesi (hidroliz, türevlendirme), materyelden bağımsız güçlü-tekrarlanabilir bir yöntem bulunması bu kısıtlayıcı etkenlerin çözümü olarak öngörülmektedir.

Kötüye kullanımı olan maddelerin çeşitliğinin her gün biraz daha artması ve buna bağlı olarak daha iyi analitik yöntemlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Tek bir madde testi, kişinin tutuklu veya serbest kalmasını sağlayabileceğinden, seçilen biyolojik örneğin iddia edilen kişiden alınmasından analizine, test sonucundan sonuçların raporlandırmasına kadar olan tüm aşamalarda uygulanması gereken işlemler tanımlanmış olmalıdır (Gözetim ve Emniyet zinciri; Chain of custody). Bu analizleri yapan laboratuvarların, hukuk ve adli sisteme hizmet etmesi dolayısıyla, sıkı bir gözetim/emniyet zinciri altında elde edilmesi gereken test sonucunun, doğruluğu ve güvenirliliği çok önem kazanmaktadır.

Bağımlılık yapan ya da kötüye kullanılan ilaç/madde analizlerinde; kişilerin yapılan test konusunda bilgilendirilmesi, uygulanacak analitik testlerde hangi maddelerin analizinin yapılması gerektiği, hangi analitik yöntemin kullanılması gerektiği mutlaka belirtilmelidir.

Kaynakça

- Maurer H.H. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clinical Biochemistry* 2005; 38 (4): 310-318.

- Clarke's Analytical Forensic Toxicology (Paperback) Sue Jickells (Editor), Adam Negrusz (Editor), Pharmaceutical press 2008.

- Maralikova B. and Weinmann W, Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *Journal of Chromatography B*. 2004; 811 (1-5): 21-30.

- Kintz P. and Samyn N. Determination of "Ecstasy" components in alternative biological specimens. *J. Chromatogr B: Biomed Sci and App*, Volume 733, Issues 1-2, 15 October 1999, 137-143.

Terapötik İlaç Düzeyi İzleminde Farmakologların Yeri

Uzm. Dr. Yusuf Cem Kaplan

İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Farmakoloji ve Toksikoloji Birimi

Terapötik İlaç Düzeyi İzleminin (TİDİ) başlıca amaçları şu şekilde sıralanabilir.

1) Hastanın tedaviye uyum gösterip göstermediğini saptamak.

a) TİDİ ile “Hasta gerçekten ilacını önerildiği şekilde kullanıyor mu?” sorusuna yanıt bulmak mümkündür.

2) İlaçtan maksimum klinik fayda sağlayacak hastaya uygun bireyselleştirilmiş bir doz ayarlayabilmek.

a) Verilen dozun hastada istenen kan/serum düzeylerini sağlayıp sağlamadığı değerlendirilebilir.

b) Subterapötik ya da toksik düzeylerin klinik yanıt da dikkate alınarak terapötik aralığa yükseltilmesi ya da düşürülmesi gerekebilir. Böylece hastanın tedaviden fayda görememesi ve olası advers etkiler engellenebilir.

3) Hastanın uzun süreli tedavisi esnasında karşılaşabileceği başka problemlerin hastanın tedavi sürecini olumsuz şekilde etkilemesini önlemek.

a) İlacın farmakokinetik ya da farmakodinamiğini etkileyebilecek faktörlerin (Renal ya da hepatik yetmezlik, ilaç-ilaç ya da ilaç-besin etkileşimleri vb.) ortaya çıkması durumunda tedaviye müdahale edebilme fırsatı yakalanabilir.

Sadece hastanın kan ilaç düzeyini ölçüp bilgisayarda onaylamak TİDİ değildir. Bu olsa olsa ilaç düzeyi ölçümü olarak adlandırılabilir bir işlemdir. TİDİ hastanın kan ilaç düzeyine göre hastanın kullandığı ilacın dozunu optimize

edebilmek ve hastanın tedaviden göreceği faydayı maksimuma çıkarıp, olası zararları ise minimuma indirebilmektir. Analiz öncesi, analiz ve analiz sonrası dönem bir bütünün parçalarıdır. Etketif bir TİDİ ancak bu parçalar arasındaki bağın doğru ve verimli kurulması ile gerçekleşebilir. TİDİ, hastaya primer hekim tarafından ilaç tedavisi verilmesi kararı ile başlar ve analiz sonucunun değerlendirilip tedaviye yansınması ile döngüsünü tamamlar. Bu döngü hasta tedavi aldıkça devam eder. TİDİ bir çok kavramı içine alan bir süreçtir, ancak odak noktasında “ilaç” ve ilacın klinik etkinliği” kavramları bulunmaktadır. Odak noktası “ilaç” ve “ilacın klinik etkinliği” gibi kavramlardan oluşan bu döngünün yürütülmesi sorumluluğunu ülkemizde yetkinlikle üstlenebilecek tek branş “Farmakoloji” dir. Farmakologlar bu döngünün sağlıklı bir şekilde başlatılması ve sürdürülmesinde önemli roller üstlenebilirler. Hastanın alacağı ilaç dozunun belirlenmesinden, kan örneği alınma zamanına, örneklerin analizinden, sonuçların değerlendirilmesine kadar çoğu basamakta hekim ve yardımcı sağlık personeline (hemşire, eczacı, lab teknisyeni vb.) yol gösterebilirler.

Bu konuda farmakologların önündeki en büyük engel hali hazırda ilaç düzeyi ölçümünü (TİDİ değil) gerçekleştiren diğer uzmanlık dallarının öne sürdüğü ve hiçbir bilimsel temele oturmayan dogmalardır. Sözkonusu uzmanlık dalları, gayet basit olan bir ilaç düzeyi ölçüm sürecini olduğundan çok daha karmaşık şekilde göstermeye çalışmaktadır. Bu uzmanlık dalları sağlık meslek lisesi mezunu laboratuvar teknisyenlerinin rahatlıkla sürdürebildiği bir işlemi, uzmanlık ve doktora eğitimlerinin temelini ileri düzeyde laboratuvar uygulamalarının

oluşturduğu farmakologların yapamayacaklarını ya da yapmamaları gerektiğini öne sürmektedirler. Gerçekte, eğitim müfredatlarında ilaç farmakokinetiği ve farmakodinamiği hakkında hiç bir bilgi bulunmayan bu uzmanlık dallarının sorumluluğunda yapılacak olan şey asla “TİDİ” olamayacak, analiz öncesi ve sonrası dönemle bağlantısız ve faydaları tartışmalı bir “ilaç düzeyi ölçümü” olarak kalacaktır. Oysa ki, doğru şekilde uygulanan bir TİDİ’nin hem tıbbi hem de ekonomik alanda bilimsel olarak kanıtlanmış bir çok faydası mevcuttur. Yapılan çalışmalar, TİDİ uygulanan hastaların toplamda daha düşük dozda ilaca maruz kaldıklarını ve buna bağlı olarak daha az sayıda advers etki tecrübe ettiklerini göstermiştir. TİDİ’nin advers etkileri azaltması ve tedavinin etkinliğini arttırması hastanede kalış süresini de kısaltmaktadır. Bu faydaları ile TİDİ, tedavi başına düşen maliyetlerde ciddi düşüşler sağlayabilmekte ve kaynakların gereksiz kullanımını önlemektedir.

T.C. Sağlık Bakanlığı 29.04.2008 tarihli ve 27214 sayılı Resmi Gazete’de yayınladığı “Hasta ve Çalışan Güvenliği’nin Sağlanması ve Korunmasına İlişkin Tebliğ” ile hasta ve çalışan güvenliği konusundaki hassasiyetini vurgulamıştır. Bu tebliğin 9. maddesi İlaç Güvenliği ile ilgili işlemleri açıklamaktadır. İlgili maddenin “ç” bendinde “İlaç uyumu, istenmeyen ve beklenmeyen yan etkiler, tabip ve hemşireler tarafından izlenir...” ibaresindeki işlemler TİDİ ile rahatlıkla gerçekleştirilebilir. Bu tebliğ ile birlikte, TİDİ’nin hasta güvenliği için mutlak bir gereklilik olduğu daha iyi anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, diğer uzmanlık dallarının gerçekleştireceği ve hastanın tedavisine yeterince yansımayan “ilaç düzeyi ölçümü” faydaları tartışmalı bir işlemdir. Ancak, farmakologlar tarafından kurulacak Terapötik İlaç Düzeyi İzlemi sistemlerinin ülkemizin sağlıkla ilgili kaynaklarının doğru ve etkin şekilde kullanılmasına büyük katkıda bulunacağı ve hasta yararını arttıracığı bilimsel olarak kanıtlanmış bir gerçektir.

ISBN: 975-7863-18-1