

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA GANTAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA GANTAR

**TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJ VALPROJSKE KISLINE IN
NJENEGA PRESNOVKA Z RAZLIČNIMI ANALIZNIMI METODAMI PRI
BOLNIKI S PSIHIATRIČNIMI BOLENJI**

**THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF VALPROIC ACID AND ITS
METABOLITE IN PSYCHIATRIC PATIENTS USING VARIOUS ANALYTICAL
METHODS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. in v Psihiatrični bolnišnici Idrija pod somentorstvom Cvetke Bačar Bole, mag farm., spec. klin. farm.

Zahvala

Hvala mentorju izr. prof. dr. Tomažu Vovku za vse strokovne nasvete, usmerjanje in neprecenljivo pomoč med laboratorijskim delom ter pri pisanju magistrske naloge.

Iskreno se zahvaljujem somentorici Cvetki Bačar Bole, spec. klin. farm. za vse preneseno znanje, potrpežljivost in neštete spodbudne besede.

Najlepša hvala dr. Bojani Križaj, spec. med. biokem. za čas, namenjen v laboratoriju, in velikodušno pomoč tekom eksperimentalnega dela. Hvala tudi doc. dr. Janezu Mravljaku za prijazno pomoč pri sintezi kumarina.

Hvala vsem zdravnikom in osebju Psihiatrične Bolnišnice Idrija, ki so bili pripravljeni sodelovati v raziskavi.

Posebna zahvala gre staršema in bratu za nenehno podporo in vzpodbudo v času študija ter Mateju za brezmejno pomoč in potrpežljivost. Najboljši ste.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. in somentorice Cvetke Bačar Bole, mag farm., spec. klin. farm.

Kaja Gantar

Predsednica magistrske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm

Članica magistrske komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	VALPROJSKA KISLINA	1
1.1.1	Farmakokinetika valprojske kisline.....	2
1.1.2	Farmakodinamika valprojske kisline.....	3
1.1.3	Vloga VPA v psihiatriji	4
1.1.4	Pogoste interakcije VPA z drugimi učinkovinami	6
1.1.5	Neželeni učinki valprojske kisline.....	7
1.2	TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJ UČINKOVIN.....	8
1.2.1	TDM pri psihiatričnih bolnikih.....	10
1.2.2	Psihotropne učinkovine, pri katerih se izvaja TDM	11
1.3	ANALIZNE METODE IN VZORCI ZA TDM PSIHOTROPNIH ZDRAVIL..	11
1.3.1	Analizne metode za TDM psihotropnih zdravil	11
1.3.2	Vzorci za TDM psihotropnih zdravil.....	13
2	NAMEN DELA.....	16
3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	Materiali	17
3.1.1	Biološki material	17
3.1.2	Standardi.....	17
3.1.3	Reagenti in topila.....	18
3.1.4	Naprave in pribor.....	19
3.2	Metode.....	21
3.2.1	Analizne metode	21
3.2.1.1	Kromatografska metoda za določanje VPA in 4-en VPA v plazmi.....	21
3.2.1.2	Kromatografska analizna metoda za določanje VPA v DBS	24
3.2.1.3	Bolnišnična imunološka metoda za določanje VPA	27
3.2.2	Izračun plazemskih in DBS koncentracij analitov	28
3.2.3	Validacija kromatografskih metod	29
3.2.4	Klinična raziskava	29

3.2.5	Primerjava metod.....	29
3.2.6	Določitev porazdelitvenih koeficientov R in K.....	30
3.2.7	Korelacija med 4-en VPA, ALT in AST	30
3.2.8	Pregled neželenih učinkov.....	30
3.2.9	Pregled učinkovin, ki lahko vplivajo na plazemsko koncentracijo VPA	30
3.2.10	Statistična analiza podatkov	31
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	32
4.1	Kromatografska analiza plazemskih in DBS vzorcev	32
4.1.1	Določitev VPA in 4-en VPA v plazmi z uporabo kromatografske metode.....	32
4.1.2	Določitev VPA v DBS z uporabo kromatografske metode.....	33
4.2	Validacija kromatografskih analiznih metod.....	34
4.2.1	Validacija kromatografske metode za določanje VPA in 4-en VPA v plazmi....	34
4.2.2	Validacija kromatografske metode za določanje VPA v DBS	38
4.3	Klinična raziskava	41
4.4	Primerjava rezultatov analiznih metod	48
4.5	Določitev porazdelitvenih koeficientov R in K.....	50
4.6	Korelacija med 4-en VPA, AST in ALT	52
4.7	Pregled neželenih učinkov	53
4.8	Pregled učinkovin, ki lahko vplivajo na plazemsko koncentracijo VPA	55
5	SKLEP	56
6	LITERATURA	57
	PRILOGE.....	61

Kazalo preglednic

Preglednica I: Farmakokinetične lastnosti in odmerjanje VPA.....	2
Preglednica II: Presnova VPA	3
Preglednica III: Prednosti in slabosti tehnike DBS	13
Preglednica IV: Postopek priprave delovnih raztopin VPA	22
Preglednica V: Postopek priprave delovnih raztopin 4-en VPA	22
Preglednica VI: Priprava derivatizacijskih reagentov	23
Preglednica VII: Pogoji kromatografske analize plazemskega vzorca.....	24
Preglednica VIII: Program gradientne elucije in program ojačitve signala	24
Preglednica IX: Postopek priprave delovnih raztopin VPA	25
Preglednica X: Postopek priprave ekstrakcijskega topila	26
Preglednica XI: Pogoji kromatografske analize DBS vzorca.....	26
Preglednica XII: Specifičnost metode CEDIA	27
Preglednica XIII: Nakloni, odseki in determinacijski koeficienti umeritvenih krivulj plazemske metode	35
Preglednica XIV: Dnevna točnost plazemske metode v različnih dneh.....	36
Preglednica XV: Dnevna ponovljivost plazemske metode.....	37
Preglednica XVI: Meddnevna ponovljivost plazemske metode.....	38
Preglednica XVII: Nakloni, odseki in determinacijski koeficienti UK metode DBS	39
Preglednica XVIII: Dnevna točnost metode DBS v različnih dneh.....	39
Preglednica XIX: Dnevna ponovljivost metode DBS	40
Preglednica XX: Meddnevna ponovljivost metode DBS.....	40
Preglednica XXI: Demografski podatki bolnikov, podatki o njihovi terapiji in neželenih učinkih	42
Preglednica XXII: Opravljene laboratorijske meritve.....	45
Preglednica XXIII: Primerjava eksperimentalno določenih vrednosti in vrednosti iz literature	51
Preglednica XXIV: Št. bolnikov s posameznim NU.....	53
Preglednica XXV: Statistična značilnost (p vrednost) za posamezno spremenljivko v okviru Mann-Whitneyjevega U-testa.....	54

Kazalo slik

Slika 1: Struktura valprojske kisline	1
Slika 2: Struktura 4-en VPA	8
Slika 3: Reakcija derivatizacije VPA do amidnega produkta.....	21
Slika 4: Kromatogram analize plazemskih vzorcev.....	32
Slika 5: Kromatogram analize DBS vzorcev	33
Slika 6: Primer umeritvene krivulje za VPA	34
Slika 7: Primer umeritvene krivulje za 4-en VPA	35
Slika 8: Umeritvena krivulja za VPA	38
Slika 9: Število bolnikov glede na plazemsko koncentracijo VPA	48
Slika 10: Passing-Bablok regresija in Bland-Altmanov graf za primerjavo imunološke in kromatografske plazemske metode	48
Slika 11: Passing-Bablok regresija in Bland-Altmanov graf za primerjavo imunološke in kromatografske DBS metode.....	49
Slika 12: Passing-Bablok regresija in Bland-Altmanov graf za primerjavo obeh kromatografskih metod.....	50
Slika 13: Passing-Bablok regresija za primerjavo koncentracij VPA med plazemskimi in DBS vzorci	51
Slika 14: Vrednost ALT oz. AST v odvisnosti od plazemske koncentracije 4-en VPA	53
Slika 15: Frekvenca NU	53
Slika 16: Kvantilni diagrami za primerjavo porazdeljenosti spremenljivk med skupinama	54

POVZETEK

Valprojska kislina (VPA) je ena najširše uporabljenih protiepileptičnih učinkovin, v psihiatriji pa se predpisuje predvsem za zdravljenje bipolarnе motnje. Obenem je na tem področju zelo pogosta uporaba VPA zunaj odobrenega indikacijskega območja z namenom krepitev učinka drugih psihofarmakov. Zdravljenje z VPA lahko vodi do številnih neželenih učinkov, med katerimi je najnevarnejša hepatotoksičnost, za katero naj bi bil odgovoren presnovek 4-en VPA. Zdravljenje je zaradi nepredvidljivih odzivov potrebno nadzorovati s terapevtskim spremljanjem koncentracij (TDM). Na tem področju se uveljavljajo alternativne metode vzorčenja bioloških vzorcev, med njimi tudi tehnika posušenih krvnih madežev (DBS).

V okviru magistrske naloge smo optimizirali analizni metodi za določanje VPA v plazmi in DBS z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti s fluorescenčno detekcijo. Optimizirali smo tudi tehniko za določanje 4-en VPA v plazmi. Ustreznost metod smo dokazali s primerjavo kromatografskih metod z imunološko, ki jo za TDM uporablja laboratorij Psihiatrične bolnišnice Idrija. S primerjavo smo dokazali, da kromatografska metoda za določanje VPA v plazmi za 13 odstotkov odstopa od imunološke metode. Obenem smo potrdili, da je mogoče DBS koncentracije s preprostim izračunom pretvoriti v plazemske. Vrednosti, določene na ta način, od meritev imunološke metode odstopajo za 5%. Na podlagi koncentracij VPA v plazmi in DBS vzorcih smo določili vrednost porazdelitvenih koeficientov za porazdeljevanje VPA med plazmo in krvjo (R) oz. krvnimi celicami (K), pri čemer smo opazili dobro ujemanje med eksperimentalnimi in literaturnimi vrednostmi. Izračunana vrednost R znaša 0,63, K pa 0,088.

V kliničnem delu naloge smo na vzorcu 21 bolnikov potrdili predpostavko o visoki prevalenci uporabe VPA zunaj odobrenega indikacijskega območja, saj je imela indikacijo za zdravljenje le slaba četrtnina bolnikov. Eden od dveh nehospitaliziranih bolnikov VPA ni jemal, kar kaže na pogosto slabo sodelovanje bolnikov pri zdravljenju. Skoraj 30% izmerjenih koncentracij je bilo pod spodnjo mejo referenčnega območja. Korelacije med 4-en VPA in aminotransferazami nismo uspeli dokazati. Neželeni učinki so se pojavljali pri dobri polovici bolnikov, pri čemer pa njihova pojavnost ni bila odvisna od koncentracije VPA, 4-en VPA ali odmerka VPA.

Ključne besede: terapevtsko spremljanje koncentracij, valprojska kislina, posušeni krvni madeži, 4-en VPA, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

ABSTRACT

Valproic acid (VPA) is one of the most widely prescribed antiepileptic drugs, used in psychiatry mostly for treating bipolar disorder. Additionally, it is also frequently used in augmentation therapy of several other psychiatric disorders. Treatment with VPA can cause many adverse effects, including hepatotoxicity, which is supposedly caused by the metabolite 4-ene VPA. Due to unpredictable reactions treatment should be supervised by therapeutic drug monitoring (TDM). Recently, alternative sampling methods of biological matrices, such as dried blood spot (DBS) technique have been introduced in TDM practice.

As part of this master's thesis we optimized analytical methods for determining VPA levels in plasma and DBS using high pressure liquid chromatography and fluorescence detection. We have also improved the method for determining 4-ene VPA in plasma. The suitability of the methods was proven by comparing chromatographic methods with the immunoassay, used for TDM by the laboratory at Psihiatrična bolnišnica Idrija. The comparison proved a 13% disparity between the immunoassay and chromatographic method for determining VPA in plasma. It was also confirmed that the DBS concentrations can be converted to plasma levels using simple calculation. The values, determined in this way, deviate by 5% from the immunological method. Based on VPA concentrations in plasma and DBS samples we determined the partition coefficient for VPA partitioning between plasma and blood (R) or blood cells (K), observing a good match between experimental and literature values. The determined values of R and K were 0,63 and 0,088, respectively.

In the clinical part of the study we confirmed the assumption of the high prevalence of off-label use of VPA on a sample of 21 patients, since less than a quarter of patients showed indication for treatment. One of the two nonhospitalized patients had not been taking VPA, which shows the patients' lack of cooperation during treatment. Almost 30% of concentrations were below the lower limit of the reference range. Correlation between 4-ene VPA and aminotransferase levels could not be proven. Adverse effects were present with more than half of the patients, but were unrelated to the VPA concentration, 4-ene VPA concentration or VPA doses.

Key words: therapeutic drug monitoring, valproic acid, dried blood spots, 4-ene VPA, high pressure liquid chromatography

SEZNAM OKRAJŠAV

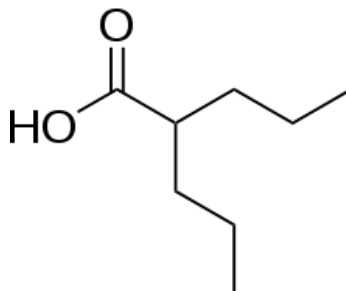
2,4-dien VPA	2-propil-2,4-pentadienojska kislina
4-en VPA	2-propilpent-4-enojska kislina
A	površina kromatografskega vrha
ALT	alanin aminotransferaza
ASA	acetylsalicylna kislina
AST	aspartat aminotransferaza
BM	bipolarna motnja
C	koncentracija
C_{4-en} VPA	plazemska koncentracija 4-en VPA, določena s kromatografsko metodo
C_B	koncentracija učinkovine v krvi
C_{BC}	koncentracija učinkovine v krvnih celicah
C_{DBS} hplc	koncentracija VPA v DBS, določena s kromatografsko metodo
C_{max}	najvišja plazemska koncentracija
C_{min}	najnižja plazemska koncentracija
C_{pl}	plazemska koncentracija
C_{pl} hplc	plazemska koncentracija VPA, določena s kromatografsko metodo
C_{pl} imun	plazemska koncentracija VPA, določena z imunološko metodo
C_{pl} izr	plazemska koncentracija VPA, določena s preračunom iz C _{DBS} hplc
CEDIA	<i>Cloned Enzyme Donor Immunoassay</i>
CYP	citokrom P450 (<i>cytochrome P450</i>)
D	dnevni odmerek
DBS	posušeni krvni madeži (<i>dried blood spots</i>)
DMF	dimetilformamid
DPS	posušeni plazemski madeži (<i>dried plasma spots</i>)
DR	delovna raztopina
EDC	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarboiimid
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FLD	fluorescenčni detektor
GABA	γ -aminomaslena kislina (<i>γ-aminobutyric acid</i>)

HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high performance liquid chromatography</i>)
Ht	hematokrit
IS	interni standard
IZ	interval zaupanja
k	naklon umeritvene premice (smerni koeficient)
K oz. $K_{BC/pl}$	porazdelitveni koeficient med eritrociti in plazmo
kumarin	4-(aminometil)-7-metoksi-kumarin
M	molska masa
MeOH	metanol
n	odsek umeritvene krivulje (presečišče z ordinatno osjo)
NU	neželeni učinek zdravila
OR	osnovna raztopina
p	stopnja značilnosti v okviru statističnega testa
PB regresija	Passing-Bablok regresija
PBI	Psihiatrična bolnišnica Idrija
QC	kontrolni vzorec (<i>quality control</i>)
QC_H	kontrolni vzorec visoke koncentracije (<i>high</i>)
QC_L	kontrolni vzorec nizke koncentracije (<i>low</i>)
QC_M	kontrolni vzorec srednje koncentracije (<i>medium</i>)
R oz. $R_{B/pl}$	porazdelitveni koeficient med krvjo in plazmo
R²	determinacijski koeficient
RSD	relativna standardna deviacija
SD	standardna deviacija
TDM	terapevtsko spremljanje koncentracij (<i>therapeutic drug monitoring</i>)
TM	telesna masa
TV	telesna višina
UK	umeritvena krivulja
VPA	valprojska kislina

1 UVOD

1.1 VALPROJSKA KISLINA

Valprojska kislina (VPA), katere struktura je predstavljena na sliki 1, je kratkoverižna maščobna kislina, ki so jo pred več kot stoletjem sintetizirali kot derivat valerijanske kisline. Slednja se v naravi nahaja v zdravilni špajki (*Valeriana officinalis*). Vse do odkritja njenih antikonvulzivnih lastnosti, do katerega so po naključju prišli leta 1963, se je VPA uporabljala kot organsko topilo. Od takrat dalje velja za eno najpogostejše uporabljanih protiepileptičnih učinkovin, saj je učinkovita pri zdravljenju skoraj vseh vrst epileptičnih napadov (1). Na področju psihiatrije je VPA vse od leta 1966 v uporabi za vzdrževalno zdravljenje bipolarnе motnje (BM), danes pa se predpisuje tudi za zdravljenje shizofrenije in maničnih obdobj BM. Uporablja se tudi v terapiji nevropatske bolečine in za preventivo migrene (2, 3). VPA od odkritja dalje ostaja predmet številnih raziskav, saj neprestano odkrivajo potencialne nove indikacije za njeno uporabo. Med drugim so preučevali morebitno vlogo VPA pri zdravljenju malignih obolenj, Alzheimerjeve bolezni in okužbe z virusom HIV (4).



Slika 1: Struktura valprojske kisline

VPA je na trgu pod številnimi lastniškimi imeni in v različnih kemijskih oblikah. V zdravilih se nahaja tudi v obliki natrijevega valproata in seminatrijevega valproata, v tujini poznanega pod imenom "divalproex" (5). V Sloveniji ima dovoljenje za promet le eno zdravilo, ki kot zdravilno učinkovino vsebuje VPA oz. njeno natrijevo sol. Na trgu je v obliki tablet s podaljšanim sproščanjem z generičnim imenom Depakine Chrono. Poleg te farmacevtske oblike je zdravilo Depakine na voljo tudi v obliki peroralne raztopine in praška za pripravo raztopine za injiciranje.

V Sloveniji so zdravila z VPA indicirana le za zdravljenje epilepsije in BM, medtem ko so v nekaterih državah Evropske unije odobrena tudi za zdravljenje migrene (6).

1.1.1 Farmakokinetika valprojske kisline

Po peroralni aplikaciji zdravila z VPA pride v gastrointestinalnem traktu do disociacije spojine do valproatnega iona oziroma valproata. V tej obliki učinkovina kroži po krvnem obtoku, valproatni ion pa je obenem tudi farmakološko aktivna oblika učinkovine (5). Hitrost absorpcije VPA je odvisna od farmacevtske oblike. Oblike s takojšnjim sproščanjem se uporabljajo samo za zdravljenje epilepsije, formulacije z zakasnelim in podaljšanim sproščanjem pa tudi za ostale indikacije (7). Glavna prednost farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem je možnost enkrat dnevnega odmerjanja, ki zagotavlja enakomerne plazemske koncentracije tekom celotnega odmernega intervala. Pomembna prednost tovrstnih formulacij so tudi nižje največje plazemske koncentracije (C_{max}), ki so povezane s pojavom neželenih učinkov (8).

Za VPA je značilen visok delež vezave na plazemske proteine in nelinearna farmakokinetika. Pri terapevtskih koncentracijah je na plazemske proteine, predvsem na albumine, vezane več kot 90% učinkovine. Z naraščanjem celokupne plazemske koncentracije narašča tudi delež nevezane VPA, ki lahko prehaja v celice in je odgovorna za učinek (5). Pomembne farmakokinetične lastnosti VPA so povzete v preglednici I.

Preglednica I: Farmakokinetične lastnosti in odmerjanje VPA (5, 8, 9, 10)

Biološka uporabnost	~100%
Razpolovna doba	8-20 ur
Vezava na plazemske beljakovine	~94% pri terapevtskih koncentracijah
Volumen porazdelitve	0,14-0,23 L/kg
Terapevtske koncentracije	50-100 µg/mL (do 120 µg/mL ob akutni maniji)
Dnevni odmerek	500-3000 mg

Presnova VPA je obsežna, kompleksna in poteka v jetrih. V urinu so odkrili preko 15 različnih presnovkov, ki so v veliki meri produkti glukuronidacije in oksidacije. Le 3% apliciranega odmerka se iz telesa izloči nespremenjenega. Med presnovki v literaturi najpogosteje omenjajo

enega izmed produktov oksidacije, ki naj bi bil odgovoren za nekatere neželene učinke VPA. 2-propilpent-4-enojska kislina (4-en VPA) je hepatotoksin, katerega nastanek katalizirajo encimi družine citokromov P450 (CYP) (11). Značilnosti presnove VPA so povzete v preglednici II.

Preglednica II: Presnova VPA (12)

Tip reakcije	Delež odmerka	Encim
glukuronidacija	50%	UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7, UGT2B15
β -oksidacija	40%	mitohondrijske oksidaze
oksidacija s citokromi	10%	CYP2C9, CYP2A6, CYP2B6

1.1.2 Farmakodinamika valprojske kisline

Že v 80-ih letih prejšnjega stoletja so odkrili, da je protiepileptično delovanje VPA najverjetneje posledica njenih učinkov na nekatere monoaminske in aminokislinske živčne prenašalce. VPA v možganih poveča raven γ -aminomaslene kisline (GABA-e), ki je eden izmed glavnih inhibitornih nevrottransmiterjev, obenem pa zavira sproščanje glutamata, ki deluje ekscitatorno (13). VPA vpliva tudi na napetostno odvisne ionske kanalčke in s tem preprečuje visokofrekvenčno sprožanje nevronov, do katerega prihaja pri epileptičnih napadih. Oba mehanizma sta verjetno tudi podlaga za preventivno delovanje VPA pri migrenskih glavobolih. Višji nivoji GABA-e v možganih se kažejo s sedacijo in anksiolitičnim učinkom, kar je včasih dobrodošlo pri zdravljenju maničnih bolnikov (13). Pri BM je sicer pomembnejši zaviralni vpliv VPA na sintezo dopamina. V nekaterih predelih možganov maničnih oseb so namreč odkrili povečano dopaminergično aktivnost, kar kaže na to, da je dopamin eden ključnih nevrottransmiterjev v patogenezi BM (14). Tudi nekatere snovi, ki povečajo nivo dopamina v možganih, povzročajo klasične manične simptome (5, 14).

VPA izkazuje poleg presinaptičnih tudi nekatere postsinaptične učinke, saj vpliva na znotrajcelično signaliziranje. Deluje kot inhibitor glikogen sintaze kinaze β , enega izmed encimov iz družine protein kinaz. Na živalskih modelih so dokazali, da se inhibicija glikogen sintaze kinaze β kaže s stabilizacijo razpoloženja (4, 5). VPA prek inhibicije protein kinaze C in encima inozitol monofosfataze vpliva tudi na fosfoinozitični cikel (5). V frontalnem korteksu

možganov oseb z BM so odkrili povečano prisotnost površinskih protein kinaz C, kar kaže na potencialno vpletenost omenjene inhibicije v mehanizmu delovanja VPA (13).

VPA deluje tudi kot inhibitor histonskih deacetilaz, ki vplivajo na ekspresijo genov. Posledica inhibicije določenih deacetilaz je povečana apoptotična aktivnost, zato so histonske deacetilaze potencialna tarča, VPA pa obetajoča učinkovina za antineoplastično zdravljenje (12).

1.1.3 Vloga VPA v psihiatriji

Na področju psihiatrije se VPA uporablja predvsem za zdravljenje BM. Pogosto se predpisuje tudi v terapiji shizofrenije in mejne osebnostne motnje, a tovrstna raba je trenutno slabo podkrepljena z dokazi. Rabo zdravila zunaj odobrenega indikacijskega območja označujemo z izrazom "off-label" uporaba (5).

Bipolarna motnja

BM je kronična afektivna motnja, ki se kaže s ponavljajočimi se epizodami depresije, manije ali hipomanije in mešanih stanj. Glede na klasifikacijo ločimo več tipov BM, ki se razlikujejo po izrazitosti simptomov in časovnem poteku bolezni. Večina farmakoloških raziskav je osredotočenih na BM tipa I, pri kateri gre najpogosteje za izmenjavanje obdobji manije in depresije, čeprav depresivna faza za postavitve diagnoze ni nujna (15). Farmakološko zdravljenje BM je usmerjeno k uravnavanju bolnikovega razpoloženja. Cilj farmakoterapije ob akutnih izbruhih bolezni je odpraviti simptome depresije in manije ter doseči stabilno razpoloženje. Enako pomembno je vzdrževalno zdravljenje, ki je usmerjeno k preprečevanju relapsov in zmanjševanju pojavnosti podpranih simptomov (16).

VPA se je pri zdravljenju akutnih maničnih epizod BM izkazala za enako učinkovito kot litij in karbamazepin, ki veljata za klasična stabilizatorja razpoloženja. Učinkovitejša od monoterapije je kombinacija VPA in atipičnega antipsihotika. Večina smernic za zdravljenje BM izpostavlja VPA kot eno najboljših izbir za zdravljenje akutne manije. Izjema so ženske v rodni dobi, pri katerih so uporabo VPA povezali z razvojem sindroma policističnih jajčnikov (5).

VPA se uporablja tudi za vzdrževalno zdravljenje BM. V kliničnih študijah so dokazali, da je VPA pri preprečevanju novih epizod bolezni enako učinkovita kot olanzapin, ki je v številnih državah odobren za vzdrževalno zdravljenje BM. Pri preprečevanju relapsa se je VPA izkazala

za najučinkovitejšo pri tistih bolnikih, ki so se na zdravljenje s to učinkovino odzvali že v stanju akutne manije (5). V Sloveniji je zdravilo z VPA indicirano za vzdrževalno zdravljenje BM zgolj pri tej skupini bolnikov (8). Tudi pri dolgotrajnem zdravljenju velja, da je kombinirana terapija učinkovitejša od monoterapije. V kliničnih študijah so odkrili, da je najučinkovitejša kombinacija VPA in olanzapina ali kvetiapina, a v primeru kombinirane terapije je večja tudi pojavnost neželenih učinkov, med katerimi je najbolj problematično povečanje telesne mase (5). Izvedena je bila tudi primerjava učinkovitosti VPA, litija in kombinacije litij-VPA, kjer so ugotovili, da sta tako kombinirana terapija kot monoterapija z litijem učinkovitejši od monoterapije z VPA (17).

Shizofrenija

Farmakološko zdravljenje shizofrenije danes temelji na uporabi antipsihotikov, večina bolnikov pa za obvladovanje bolezni potrebuje kombinacijo različnih učinkovin. Za razliko od BM, kjer je sočasna uporaba VPA in antipsihotikov dokazano učinkovita, uporaba te kombinacije za zdravljenje shizofrenije še ni podprta z dokazi, zato govorimo o "off-label" uporabi. Od 15 do 50% bolnikov s shizofrenijo ob terapiji z antipsihotiki sočasno prejema tudi stabilizatorje razpoloženja, med katerimi prednjači VPA (18). VPA se uporablja predvsem v primeru rezistentne shizofrenije, saj zavira presnovo nekaterih antipsihotikov in na ta način zviša njihove plazemske koncentracije. Omenjeno velja za haloperidol, risperidon in klopazapin. Poleg vpliva na farmakokinetiko antipsihotikov so v terapiji shizofrenije verjetno pomembni tudi farmakodinamski mehanizmi (19). VPA naj bi delovala na nevrone podobno kot nekateri antipsihotiki, ki zmanjšajo stopnjo metilacije določenih genskih promotorjev. Eden od predlaganih patofizioloških mehanizmov shizofrenije namreč predpostavlja, da je vzrok bolezni hipermetilacija specifičnih genskih promotorjev v določenih GABAergičnih ali glutamatergičnih nevronih. Z uporabo magnetne resonance so v možganih bolnikov s shizofrenijo odkrili tudi nekatere anatomske in funkcionalne nepravilnosti, ki so jih s terapijo z VPA uspeli omiliti (19).

V številnih študijah so dodatek VPA konvencionalni farmakoterapiji shizofrenije povezali z zmanjšano pojavnostjo agresije, sovražnega vedenja in tardivne diskinezije. Poročali so tudi o hitrejšem izboljšanju bolezenske simptomatike (5). V najnovejši metaanalizi so celo zaključili,

da dodatek VPA zdravljenju z antipsihotiki občutno izboljša celokupen terapevtski učinek (19), a na podlagi teh ugotovitev še ni mogoče oblikovati dokončnih priporočil (20). Trdnih dokazov o koristih tovrstne uporabe ni, edini učinek, ki ga gre z gotovostjo pričakovati, je sedacija (20).

Mejna osebnostna motnja

O koristnih učinkih VPA na duševno stanje posameznikov z mejno osebnostno motnjo so poročali v treh študijah, v katerih so opazili predvsem zmanjšanje razdražljivosti in agresivnosti bolnikov (5). Kljub temu v smernicah za obvladovanje mejne osebnostne motnje zaenkrat ne najdemo priporočil za uporabo VPA ali drugih stabilizatorjev razpoloženja (21).

Ostale psihiatrične motnje

VPA se uporablja tudi za zdravljenje posttravmatske stresne motnje, saj naj bi po nekaterih podatkih uspešno blažila simptome, kot so razdražljivost in izbruhi jeze. Pozitivne učinke VPA na duševno stanje so opazili tudi pri osebah z generalizirano anksiozno motnjo, motnjami vedenja in sindromom odvisnosti od alkohola. V kliničnih študijah so preverjali učinkovitost VPA v terapiji agitacije pri ljudeh z demenco. Pri majhnih odmerkih kliničnega učinka ni bilo opaziti, pri večjih odmerkih pa se je pojavilo nesprejemljivo veliko neželenih učinkov (5).

1.1.4 Pogoste interakcije VPA z drugimi učinkovinami

Trenutno je poznanih 606 učinkovin, ki z VPA vstopajo v interakcije. VPA zavira presnovo nekaterih učinkovin, kar vodi v povišanje njihovih plazemskih koncentracij. Na ta način VPA dvakrat podaljša razpolovno dobo lamotrigina, hiter porast plazemskih koncentracij te učinkovine pa lahko vodi v smrtno nevarna stanja, kot je Stevens-Johnsonov sindrom. VPA se presnavlja v jetrih, zato njeno plazemsko koncentracijo znižujejo učinkovine, ki inducirajo jetrne encime. Med najpomembnejše spadajo fenitoin, karbamazepin, fenobarbital in karbapenemski antibiotiki. Slednji poleg indukcije encimov tudi povečajo ledvični očistek VPA-glukuronida in zavirajo absorpcijo VPA (22). Nasprotno pa učinkovine, kot so fluoksetin, eritromicin in cimetidin prek inhibicije citokromov zavirajo presnovo VPA (5).

Za VPA je značilen visok delež vezave na plazemske proteine, predvsem albumine, zato lahko z vezavnih mest izrine učinkovine z nižjo stopnjo vezave. Snovi z višjim deležem vezave pa lahko z vezavnih mest izrinejo VPA in s tem povečajo koncentracijo proste oblike VPA, ki je

farmakološko aktivna. Večina tovrstnih interakcij ni klinično pomembnih, lahko pa vplivajo na interpretacijo laboratorijskih preiskav, ki podajajo zgolj celokupno plazemsko koncentracijo učinkovine. Obstajajo poročila o primerih zastrupitve zaradi sočasne uporabe VPA in acetilsalicilne kisline, ki je privedla do štirikrat višjih koncentracij proste oblike VPA. Podobno lahko tudi VPA izrine fenitoin z njegovih vezavnih mest, posledično terapevtski in toksični učinki fenitoina nastopijo že pri nižjih celokupnih plazemskih koncentracijah (5, 22).

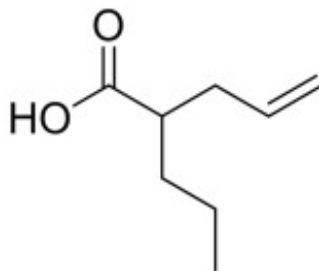
1.1.5 Neželeni učinki valprojske kisline

Najpogostejši neželeni učinki VPA so sedacija, utrujenost, tremor in gastrointestinalne motnje. Med redkejša, a klinično pomembna neželena učinka uvrščamo tudi alopecijo, encefalopatijo, vrtoglavico, nihanja razpoloženja, hiperamoniemijo, reverzibilno demenco, ekstrapiramidne motnje in motnje koagulacije. Številni od naštetih učinkov so odvisni od plazemskih koncentracij VPA, zato se jim je mogoče izogniti z ustreznim odmerjanjem zdravil (1, 23).

Pomemben neželen učinek, ki se pojavlja ob dolgotrajnem zdravljenju z VPA, je povečanje telesne mase, ki doleti približno tretjino zdravljenih oseb in je pogosto povezan z drugimi presnovnimi motnjami. Kronično uporabo VPA pri ženskah povezujejo tudi z motnjami menstrualnega cikla, hiperandrogenizmom in sindromom policističnih jajčnikov, čeprav dokazi o klinični relevantnosti teh povezav niso zanesljivi. Nedvoumni pa so podatki, ki uporabo VPA v nosečnosti povezujejo s povečanim tveganjem za prirojene napake in razvojne nepravilnosti otrok. Uporaba VPA v nosečnosti je zato kontraindicirana (1). Evropska agencija za zdravila je marca 2017 pričela s ponovnim pregledom uporabe VPA v nosečnosti in pri ženskah v rodni dobi. Namen pregleda je oceniti, ali so zaradi tveganj, povezanih z uporabo VPA, potrebne dodatne omejitve predpisovanja (6).

Med idiosinkratske reakcije, ki se lahko pojavijo med zdravljenjem z VPA, uvrščamo akutni pankreatitis in jetrno odpoved, slednja je lahko usodna (1). Pri bolnikih na kronični terapiji so opazili tudi milejšo in reverzibilno obliko hepatotoksičnosti, ki se kaže zgolj s povišanimi nivoji aminotransferaz v krvi, bolniki pa so ob tem brez izraženih kliničnih znakov. Povišane vrednosti encimov ALT in AST naj bi imelo vse do 44% uporabnikov VPA. Zaradi možnega pojava toksičnih učinkov na jetra se priporoča biokemično spremljanje bolnikov, ki se zdravijo z VPA (11).

Obstajajo dokazi, da je za hepatotoksične učinke VPA odgovoren njegov presnovek 4-en VPA, ki vpliva na presnovo maščobnih kislin in povzroča steatozo jeter (11). 4-en VPA, katerega struktura je na prikazana na sliki 2, nastaja v procesu oksidacije, ki jo katalizirajo encimi CYP2C9, CYP2B6 in CYP2A6. Aktivnost CYP2C9 je večja pri otrocih in v primeru sočasne terapije z induktorji citokromov, kot sta fenitoin in karbamazepin. Pri teh bolnikih se tudi toksični učinki na jetra pojavljajo najpogosteje (24).



Slika 2: Struktura 4-en VPA

4-en VPA se v mitohondrijih presnavlja do reaktivnega presnovka 2-propil-2,4-pentadienojske kisline (2,4-dien VPA). Različni konjugati te spojine reagirajo z glutationom, kar zmanjšuje njegove zaloge v mitohondrijih. Obenem 2,4-dien VPA tvori konjugate s koencimom A in tako inhibira encime, ki sodelujejo v β -oksidaciji maščobnih kislin. Slednje lahko rezultira v jetrni steatozi (12, 23), katere znake naj bi imelo kar 61% bolnikov na terapiji z VPA (25). Kljub številnim dokazom o toksičnih učinkih 4-en VPA pa v nekaterih študijah niso odkrili nobene povezave med hepatotoksičnostjo in povišano plazemsko koncentracijo 4-en VPA ali drugih presnovkov (26, 27).

1.2 TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJ UČINKOVIN

Terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovin (TDM) je učinkovito orodje za optimizacijo terapije, ki je v uporabi že več kot 40 let. Izraz se nanaša na laboratorijsko meritev koncentracije učinkovine v biološkem vzorcu, na podlagi katere je s pomočjo ustrezne interpretacije mogoče individualizirati odmerjanje zdravila. TDM je tesno povezano s farmakokinetiko in temelji na ugotovitvah, da farmakološki učinek v določenih primerih bolje kot z odmerkom zdravila korelira s plazemskimi koncentracijami učinkovine (28). Na plazemsko koncentracijo

učinkovine poleg odmerka in režima jemanja, ki ju lahko nadzorujemo sami, vplivajo številni drugi farmakokinetični parametri, ki jih je praktično nemogoče predvideti. Bolniki se med seboj razlikujejo po starosti, sočasnih boleznih in genetskih posebnostih, dodaten izziv na tem področju pa so tudi interakcije med različnimi učinkovinami. Vsi naštet dejavniki vplivajo na absorpcijo, porazdeljevanje, presnavljanje in izločanje učinkovine in s tem na njeno plazemsko koncentracijo (9).

Koncentracijsko območje, znotraj katerega sta zagotovljena maksimalna učinkovitost in varnost učinkovine, imenujemo referenčno območje (9). Plazemske koncentracije izven tega območja lahko povzročajo številne zaplete. Pri prenizkih plazemskih koncentracijah lahko pričakujemo, da učinek zdravila ne bo značilno različen od placeba, pri previsokih pa se poveča verjetnost za pojav neželenih učinkov. Referenčno območje, ki je v literaturi podano za posamezno učinkovino, je določeno na manjšem delu populacije, zato so navedene vrednosti praviloma zgolj orientacijske. Individualno terapevtsko koncentracijo je mogoče določiti z izvedbo TDM po tem, ko se je bolnik zadovoljivo odzval na zdravljenje (29).

Ključnega pomena za pravilno interpretacijo rezultatov je pridobiti ustrezen biološki vzorec. V klinični praksi sta rutinsko uporabljana serum in plazma. Kri za namene TDM mora biti odvzeta po vzpostavitvi stacionarnega stanja, ki nastopi po preteku petih razpolovnih dob dane učinkovine, in hkrati tik pred aplikacijo naslednjega odmerka zdravila. Na ta način dobimo podatek o minimalni plazemski koncentraciji, ki je za interpretacijo rezultatov najustreznejši (30). Seveda lahko krvni vzorec za TDM odvezamo kadarkoli, a v tem primeru je ključnega pomena zabeležiti čas odvzema krvi in rezultat interpretirati v povezavi z režimom jemanja zdravila. Ob pojavu simptomov, ki bi lahko bili posledica previsokih plazemskih koncentracij, je vzorec krvi potrebno vzeti takoj, ko so neželeni učinki opaženi (31). TDM je najprimernejše za učinkovine z ozkim terapevtskim indeksom in dobro definiranim terapevtskim območjem (9).

Odmerjanja zdravil ne gre prilagajati zgolj na podlagi izmerjenih plazemskih koncentracij, pred vsakim ukrepom je potrebno upoštevati klinično sliko bolnika. Posebej v primerih pridruženih boleznih in polifarmakoterapije je za kakovostno obravnavo potreben multidisciplinaren pristop k obravnavi bolnika in sodelovanje strokovnjakov z različnih področij (29).

1.2.1 TDM pri psihiatričnih bolnikih

Za zdravljenje psihiatričnih motenj se v zadnjih 60 letih uporablja več kot 130 različnih učinkovin z dokazano učinkovitostjo, a podatki kažejo, da so izidi zdravljenja pogosto nezadovoljivi. Po polovici stoletja odkrivanja novih učinkovin je zato stroka usmerila pozornost tudi v optimizacijo zdravljenja z že znanimi učinkovinami. Poglavitni razlog za uporabo TDM pri psihiatričnih bolnikih je velika interindividualna variabilnost v plazemskih koncentracijah psihofarmakov, razlike pri enakem odmerku so lahko tudi dvajsetkratne (9, 31). Pomembna težava na področju psihiatrije je tudi slaba vodljivost bolnikov. Vse do 50% bolnikov s shizofrenijo predpisanih zdravil ne jemlje v skladu z navodili (29).

Na področju psihiatrije se je TDM uveljavilo leta 2004 z izdajo smernic za učinkovito uporabo TDM psihiatričnih zdravil (31). Smernice narekujejo, da je izvajanje TDM pri zdravljenju s psihofarmaki smiselno v naslednjih primerih:

- za optimizacijo odmerka po uvedbi zdravljenja ali po spremembi odmerka,
- pri zdravljenju z zdravili, kjer je TDM nujno iz varnostnih razlogov (npr. litij),
- ob sumu na slabo vodljivost bolnika,
- ob odsotnosti izboljšanja ali poslabšanju kliničnega stanja kljub optimalnim odmerkom,
- ob pojavu neželenih učinkov kljub optimalnim odmerkom,
- ob sočasni terapiji z zdravilom, ki z dano učinkovino lahko vstopa v interakcije,
- ob zdravljenju ranljivejših skupin ljudi (nosečnice, doječe matere, otroci, najstniki, starostniki) ter kadilcev,
- kadar je zaradi genetskih posebnosti ali sočasnih bolezni pričakovana sprememba v farmakokinetiki (zmanjšana jetrna ali ledvična funkcija, kardiovaskularne bolezni) (9).

TDM je smiselno izvajati tudi v okviru vzdrževalnega zdravljenja. Priporoča se na vsakih tri do šest mesecev, saj se na ta način zmanjša možnost za ponovitev bolezni in ponovno hospitalizacijo. Pogostost meritev je lahko večja, če je bolnik v preteklosti slabo sodeloval pri zdravljenju ali v primeru sprememb, ki bi lahko vplivale na farmakokinetiko učinkovine (9). Koristi TDM s stroškovnega vidika so potrdili v številnih študijah. Izvajanje TDM je povezano s skrajšano dobo hospitalizacije, hitrejšim okrevanjem in vrnitvijo na delovno mesto ter manjšimi stroški za zdravila (29).

1.2.2 Psihotropne učinkovine, pri katerih se izvaja TDM

Na področju psihiatrije je izvajanje TDM v določenih primerih bolj smiselno kot v drugih, zato tudi smernice TDM posamezne učinkovine opredeljujejo kot "zelo priporočljivo", "priporočljivo", "uporabno" ali "potencialno uporabno" (9).

TDM je zelo priporočljivo za spremljanje zdravljenja s tricikličnimi antidepresivi, saj pri njih obstaja zanesljiva povezava med plazemskimi koncentracijami in učinkovitostjo, pri prevelikih odmerkih pa se poveča tveganje za pojav resnih neželenih učinkov. Enaka priporočila veljajo za spremljanje zdravljenja z nekaterimi tipičnimi antipsihotiki, kot sta haloperidol in flufenazin ter atipičnimi antipsihotiki amisulpridom, klozapinom in olanzapinom. Previsoke plazemske koncentracije naštetih učinkovin lahko povzročijo ekstrapiramidne neželene učinke, zato je namen TDM v tem primeru predvsem izboljšanje kakovosti življenja bolnikov in ne zagotavljanje varnosti. Izjema je klozapin, pri katerem obstaja korelacija med plazemskimi koncentracijami in pogostostjo epileptičnih napadov. Za stabilizatorje razpoloženja litij, VPA in karbamazepin so terapevtska območja dobro definirana, TDM pa je zanje priporočljivo, v primeru litija pa nujno (9).

Podatkov o prevalenci uporabe TDM v psihiatrični klinični praksi je malo, obstoječe študije pa kažejo na to, da se TDM ne izvaja v skladu s smernicami. V ameriški raziskavi so ugotovili, da v obdobju enega leta TDM ni bil izveden pri 37% uporabnikov litija, 42% uporabnikov VPA in 42% uporabnikov karbamazepina (32). Podatki iz Italije kažejo, da se TDM uporablja le za spremljanje zdravljenja s klozapinom, litijem, VPA in karbamazepinom (33).

1.3 ANALIZNE METODE IN VZORCI ZA TDM PSIHOTROPNIH ZDRAVIL

1.3.1 Analizne metode za TDM psihotropnih zdravil

Najširše uporabljane za rutinsko določanje koncentracij učinkovin so že več desetletij metode, ki temeljijo na principu imunologije. Imunološki testi komercialno niso dostopni za vse učinkovine, zato se za TDM določenih učinkovin uporabljajo kromatografske metode v kombinaciji z masno spektrometrijo. Uporaba tovrstnih naprednejših tehnik ostaja omejena na referenčne laboratorije in laboratorije, ki izvajajo storitve v okviru kliničnih centrov (34).

Imunološke metode

Imunološke metode, ki v osnovi temeljijo na reakciji med protitelesom in antigenom, so trenutno najširše uporabljane metode za TDM v klinični praksi. Njihova glavna prednost je preprosta in hitra izvedba, saj predpriprava vzorca za izvedbo analize navadno ni potrebna, analitski sistemi pa so praviloma popolnoma avtomatizirani. Pomembna omejitev imunokemijskih metod je njihova selektivnost, ki je pogojena s specifičnostjo protiteles. Številni endogeni presnovki učinkovine so lahko po strukturi podobni analitu, problematične pa so lahko tudi nekatere snovi, ki po izvoru z njim niso povezane. Zaradi navzkrižne reaktivnosti protiteles lahko tovrstne molekule povzročijo lažno pozitivne ali negativne rezultate (34).

Na trgu so dostopni različni imunokemijski testi za določanje številnih učinkovin, med njimi tudi za karbamazepin in VPA, ki se v praksi rutinsko uporabljata (34).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Kromatografija kot separacijska metoda temelji na principu porazdeljevanja molekul analitov med mobilno in stacionarno fazo. Ločba substanc je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih molekul skozi kromatografsko kolono pod vplivom mobilne faze. Za detekcijo eluiranih komponent se v kliničnih laboratorijih najpogosteje uporablja spektrofotometrični, redkeje pa fluorescenčni in elektrokemijski detektor. Pomembna prednost metode HPLC je možnost sočasne kvantifikacije strukturno sorodnih učinkovin in njihovih presnovkov v preiskovanem vzorcu (34). Z določanjem farmakološko (ne)aktivnih presnovkov učinkovine je v določenih primerih mogoče oceniti vodljivost bolnika. Tako v primeru antipsihotika olanzapina kaže znižana vrednost razmerja med plazemsko koncentracijo njegovega presnovka desmetilolanzapina in olanzapina na neredno jemanje zdravila (9, 29). Slabost HPLC je v tem, da prisotnost sočasno apliciranih učinkovin včasih onemogoča kvantifikacijo iskanega analita. V nekaterih laboratorijih za TDM zato uporabljajo kombinacijo HPLC in masne spektroskopije, ki omogoča analizo kljub koelucijam (29).

HPLC velja za priporočeno metodo za TDM tricikličnih antidepresivov, saj komercialno dostopni imunološki testi navzkrižno reagirajo z vsemi učinkovinami te skupine in njihovimi presnovki. Tovrstni testi so zato primerni le za meritev koncentracij v primeru suma na prekomerno odmerjanje (34).

Plinska kromatografija

Metoda je primerna samo za analizo hlapnih substanc z relativno majhno molekulsko maso. Plinska kromatografija tudi ni ustrezna za določanje polarnih molekul, zato je za namen analize potrebno tovrstne spojine predhodno pretvoriti v nepolarne z izvedbo derivatizacije. Kombinacija plinske kromatografije in masne spektrometrije je visoko specifična in občutljiva ter zato široko uporabljana na področju toksikologije (34).

Druge metode

Za TDM litija so na voljo različne metode. Najpogosteje uporabljane so plamenska atomska emisijska spektroskopija, plamenska atomska absorpcijska spektroskopija ter potenciometrija (34).

1.3.2 Vzorci za TDM psihotropnih zdravil

Tradicionalno se koncentracijo izbrane učinkovine določa v serumu ali plazmi, ki sta pridobljena iz venske krvi. Z vpeljavo alternativnih metod vzorčenja v rutinsko rabo bi lahko zmanjšali obremenitev bolnikov in stroške, povezane s konvencionalnimi načini vzorčenja (30).

Posušeni krvni madeži (DBS)

Tehnika DBS postaja v zadnjem času vse bolj zanimiva na področju TDM psihotropnih učinkovin. Gre za relativno enostavno metodo vzorčenja, pri kateri na papirnato kartico kanemo kapljo kapilarne krvi. Venski odvzem krvi ni potreben, saj je za nanos na kartico dovolj vzorec, ki ga dobimo z vbodom v prst, vzorčenje pa lahko izvede bolnik sam. Zaradi minimalne invazivnosti je metoda DBS posebej primerna za psihiatrične bolnike, otroke in starejše osebe (35). Prednosti in slabosti tehnike DBS so predstavljene v preglednici III.

Preglednica III: Prednosti in slabosti tehnike DBS (30, 35)

Prednosti	Slabosti
majhna invazivnost postopka	možnost neakovostnega vzorčenja s strani bolnika
večja stabilnost analitov	potreba po ekstrakciji spojine s kartice
majhen volumen vzorca	potreba po visoko občutljivih analiznih metodah
enostavno shranjevanje in transport	vpliv hematokrita na določitev koncentracije

možnost vzorčenja v domačem okolju	potreba po korelaciji med plazemsko koncentracijo in koncentracijo v polni krvi
------------------------------------	---

Posušeni plazemski madeži (DPS)

Ena od slabosti metode DBS je vpliv hematokrita, od katerega sta odvisna viskoznost krvi in homogenost krvnega madeža. Težavo je mogoče odpraviti z analizo celotne lise ali z uporabo metode DPS, pri kateri na papir kanemo določen volumen sveže plazme. Pri tej metodi se sicer ne izognemo centrifugiranju polne krvi, olajšana pa sta shranjevanje in transport (30, 35). Da bi se izognili centrifugiranju, so razvili posebne kartice, ki ob nanosu kaplje krvi ujamejo krvne celice in skozi prvo plast prepustijo le plazmo, ki ostane na drugi plasti, namenjeni nadaljnji analitiki. Slabost te tehnike je visoka cena takšnih filtrirnih papirjev v primerjavi s klasičnimi DBS karticami (35).

Slina

V zadnjih letih raste zanimanje za uporabo sline kot alternativo klasičnim vzorcem za TDM psihotropnih učinkovin. Najpomembnejša prednost uporabe sline je enostaven in neinvaziven način vzorčenja. Koncentracija učinkovine v slini pogosto dobro korelira s koncentracijo proste oblike v serumu. Slabost te tehnike vzorčenja je težavno pipetiranje sline zaradi njene viskoznosti in potencialna stimulacija njenega izločanja med odvzemom vzorca, kar lahko zniža koncentracijo učinkovine v vzorcu. Povečano izločanje sline vpliva tudi na njen pH, spremenjen pH sline pa na prehajanje učinkovine med serumom in slino (30). Uporaba sline ni primerna za TDM vseh učinkovin. Za VPA je značilna slaba korelacija med koncentracijami v serumu in slini, saj je njen pKa preveč podoben fiziološkemu pH-ju. Posledica je premajhen pH gradient, ki sicer omogoča prehod učinkovin med serumom in slino, zato so koncentracije VPA v slini zelo spremenljive (36).

Lasje in nohti

V primerjavi s krvjo omogoča analiza las ali nohtov pregled nad izpostavljenostjo učinkovini v daljšem časovnem obdobju, a tovrstne tehnike rutinsko še niso uporabljane. Razvoj ustrezne

analizne metode bi ob neznatni invazivnosti omogočil nadzor nad sodelovanjem bolnika v obdobju več mesecev (30).

Ostali vzorci

Določanje učinkovin v znoju danes še ni v uporabi zaradi številnih težav, povezanih z vzorčenjem. Poleg tega meritev učinkovine v znoju, zbranem znotraj obliža, omogoča le določitev koncentracij v celotnem obdobju, ko je bil obliž prilepljen na kožo (30, 36). Nekatere snovi, med njimi VPA, se izločajo tudi v solze. Koncentracija učinkovine v solzah v določenih primerih predstavlja serumsko koncentracijo nevezane učinkovine. Tehnika vzorčenja solz ni popolnoma neinvazivna, saj je količina solzne tekočine v fizioloških pogojih zelo majhna. Za odvzem ustreznega volumna je zato potrebno izzvati dodatno solzenje, kar je za bolnike pogosto neprijetno (36). V literaturi omenjajo tudi možnost določanja učinkovin v izdihanem zraku. Prednost te tehnike vzorčenja je njena neinvazivnost (37). Meritev koncentracije učinkovine v cerebrospinalni tekočini omogoča neprecenljiv vpogled v koncentracije znotraj možganov, a lumbalna punkcija, ki je potrebna za odvzem vzorca, je preveč invazivna za vsakdanjo rabo (30).

2 NAMEN DELA

VPA že desetletja spada med najpogosteje uporabljane protiepileptične učinkovine, v psihiatriji pa se predpisuje za zdravljenje bipolarnе motnje in številnih drugih psihiatričnih obolenj. Zaradi nelinearne farmakokinetike in nekaterih neželenih učinkov VPA je zdravljenje priporočljivo nadzorovati s spremljanjem plazemskih koncentracij učinkovine. Ker je venski odvzem krvi za bolnike s psihiatričnimi in drugimi motnjami lahko neprijeten, se bomo v magistrskem delu posvetili tudi optimizaciji metode za določanje VPA v posušenih krvnih madežih.

Namen dela je optimizirati in ovrednotiti ustreznost dveh kromatografskih metod za določanje VPA in njenega presnovka v plazmi in posušenih krvnih madežih. Obenem je cilj naloge ugotoviti morebitno povezavo med koncentracijami učinkovine in njenimi neželenimi učinki.

Za določanje koncentracij analitov v bioloških vzorcih bomo uporabili metodi, predhodno razviti na FFA. Postopka zahtevata derivatizacijo analitov in sledečo analizo z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Pred izvajanjem meritev koncentracij analitov v vzorcih bolnikov bomo metodi optimizirali in deloma validirali. Koncentracijo VPA bomo določili tako v plazmi kot v posušenih krvnih madežih bolnikov, ki se zdravijo v Psihiatrični bolnišnici Idrija. Vrednosti, ki jih bomo določili z uporabo kromatografskih metod, bomo primerjali s tistimi, določenimi z imunološko metodo v bolnišničnem laboratoriju in ovrednotili ustreznost novih metod. Na podlagi meritev v plazmi in DBS vzorcih bomo poiskali povezavo med plazemskimi in krvnimi koncentracijami VPA ter določili koeficienta K in R.

V plazemskih vzorcih bolnikov bomo izmerili tudi koncentracijo presnovka 4-en VPA, ki naj bi bil odgovoren za hepatotoksične učinke VPA. Ugotavljali bomo morebitno povezavo med koncentracijami 4-en VPA in aminotransferazami v serumu, ki so lahko pokazatelj okvare jeter. Na podlagi podatkov iz medicinske dokumentacije bomo naredili pregled nad pojavljanjem neželenih učinkov na izbranem vzorcu bolnikov in ugotovili, ali se neželeni učinki pojavljajo pogosteje pri višjih plazemskih koncentracijah VPA in 4-en VPA. Pozorni bomo tudi na morebitne induktorje in inhibitorje presnovnih encimov v sočasni terapiji, ki bi lahko vplivali na plazemske koncentracije analitov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Biološki material

Koncentracijo analitov smo določali v plazmi in polni krvi moških na terapiji z VPA, ki se zdravijo v Psihiatrični bolnišnici Idrija (PBI). Vzorci so bili pridobljeni z metodo venskega odvzema krvi v vakuumsko epruveto z antikoagulantom etilendiamintetraocetno kislino (EDTA).

3.1.2 Standardi

Kemikalija	Formula	M [g/mol]	Proizvajalec	Čistota (%)
Natrijev valproat	$C_8H_{15}NaO_2$	166,19	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 98
4-en VPA	$C_8H_{14}O_2$	142,20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Nemčija	> 98
Pentanojska kislina	$CH_3(CH_2)_3COOH$	102,13	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 99
Heksanojska kislina	$CH_3(CH_2)_4COOH$	116,16	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 99
Heptanojska kislina	$CH_3(CH_2)_5COOH$	130,18	Sigma-Aldrich, Nemčija	97
Oktanojska kislina	$CH_3(CH_2)_6COOH$	144,21	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 98
Klofibrična kislina	$C_{10}H_{11}ClO_3$	214,65	Merck KGaA, Nemčija	≥ 99
Benzojska kislina	C_6H_5COOH	122,12	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 99

5-metilsalicilna kislina	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$	152,15	Sigma-Aldrich, Nemčija	98
2-bromobenzojska kislina	$\text{BrC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$	201,02	Sigma-Aldrich, Nemčija	97
Cikloheksankarboksilna kislina	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{CO}_2\text{H}$	128,17	Sigma-Aldrich, Nemčija	98
Naproxen	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$	230,26	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 98
Natrijev diklofenakat	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NNaO}_2$	318,13	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 98
Acetilsalicilna kislina	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	180,16	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 99
Gemfibrozil	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$	250,33	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 99
Atorvastatin	$\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{FN}_2\text{O}_5$	558,64	Sigma-Aldrich, Nemčija	≥ 98

3.1.3 Reagenti in topila

3-metoksifenol $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$, 124,14 g/mol (Acros, Geel, Belgija)

Etil 4-kloroacetoacetat $\text{C}_6\text{H}_9\text{ClO}_3$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Žveplova kislina H_2SO_4 , 98,08 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Natrijev azid NaN_3 , 65,01 g/mol, (Janssen, Hamburg, Nemčija)

Tetrahidrofuran $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$, 72,11 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Diklorometan CH_2Cl_2 , 84,93 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Bidestilirana voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA); specifična upornost $> 18,2 \text{ m}\Omega\text{cm}$, celokupni organski ogljik (TOC) $< 6 \text{ ppb}$ (pri $T = 25^\circ\text{C}$), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

1 M raztopina klorovodikove kisline HCl

1 M raztopina natrijevega hidroksida NaOH

Metanol CH_3OH CHROMASOLV® for HPLC; 32,04 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Etilacetat $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, 88,10 g/mol (Panreac, Barcelona, Španija)

EDC hidroklorid $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$, 191,70 g/mol (Apollo Scientific, Stockport, Anglija)

HOBt hidrat $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 135,12 g/mol (Acros, Geel, Belgija)

Dimetil formamid $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$, 73,09 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Kalijev dihidrogen fosfat for analysis KH_2PO_4 , 136,08 g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Stisnjen dušik N_2 za prepihavanje (Messer, Ruše, Slovenija)

Amonijev acetat $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 77,08 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Ocetna kislina CH_3COOH , 60,05 g/mol, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Acetonitril $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ Chromasol V® gradient grade, for HPLC, 41,05 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Standardne pufrske raztopine pH = 2,00 do 9,00 (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija in Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)

3.1.4 Naprave in pribor

Hladilnik 5 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Zamrzovalnik SANYO (T = -80 °C) (SANYO electric Co., Ltd., Osaka, Japonska)

Zamrzovalnik Gorenje (T = -20 °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Kombinirani hladilnik/zamrzovalnik Angelantoni FCL 300 (T ≤ -20°C) (Località Cimacolle Perugia, Italija)

Tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

Tehtnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)

Centrifuga Eppendorf, tip: 5415R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

Centrifuga Centric 322A (Tehtnica®, Železniki, Slovenija)

Laboratorijska centrifuga Centrifuga 400 (Tehtnica®, Železniki, Slovenija)

Stresalnik VORTEMP 56EVC (Tehtnica®, Železniki, Slovenija)

Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)

Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Koper, Slovenija)

Mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica®, Železniki, Slovenija)

Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)

Ultrazvočna kadička BANDELIN SONOREX (Bandelin electronic, Berlin, Nemčija)

Polavtomatske pipete 2 - 20 µL, 20 - 200 µL in 100 - 1000 µL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

Polavtomatska pipeta Eppendorf Multipette® Plus (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

Plastične epruvete 1,5 in 2 mL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

Kartica Whatman® protein saver card 903 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

Celulozno acetatni filter 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Nemčija)

HPLC kolona; Phenomenex Luna C8, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

HPLC kolona; Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)

HPLC kolona; Phenomenex Gemini C6-Phenyl, 150 x 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)

HPLC kolona; Phenomenex Luna C18, 150 × 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)

HPLC kolona; Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

Predkolona za HPLC; Phenomenex 4 × 3 mm C18 (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

HPLC sistem Agilent 1100 series z UV in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

Stekleni inventar: merilni valji, bučke, čaše, tehtiči, viala, inserti za viala, presesalna buča in lij za presesalno bučo.

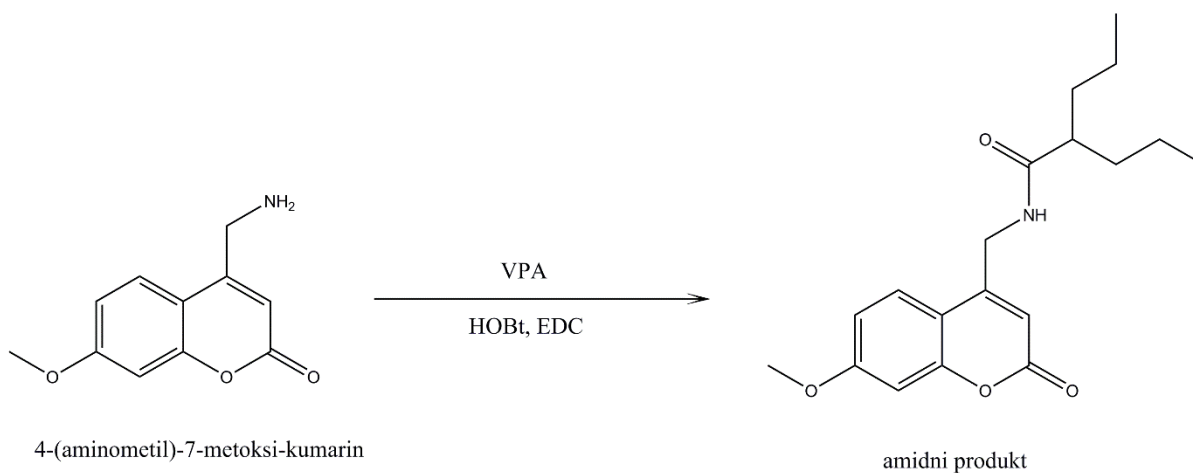
Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, magneti, magnetna palica za odstranjevanje magnetov, pokrovčki za viala, epruvete Vacutainer® z EDTA, lateks rokavice in Parafilm®M.

3.2 Metode

3.2.1 Analizne metode

3.2.1.1 Kromatografska analizna metoda za določanje VPA in 4-en VPA v plazmi

V plazemskih vzorcih smo koncentracijo VPA in njenega presnovka 4-en VPA določili z optimizirano izhodiščno kromatografsko metodo, ki jo je v okviru svoje magistrske naloge razvila Tea Bezec (38). Postopek optimizacije izhodiščne metode je predstavljen v Prilogi A. Metoda zahteva izvedbo derivatizacije, s katero iskan analit z uporabo kumarinskega reagenta (4-(aminometil)-7-metoksi-kumarina) pretvorimo v amidni produkt, ki ga lahko določimo s fluorescenčno detekcijo. Reakcija derivatizacije je prikazana na sliki 3, v nadaljevanju pa je predstavljen postopek optimizirane metode.



Slika 3: Reakcija derivatizacije VPA do amidnega produkta, ki močno fluorescira

Priprava kalibratorjev umeritvene krivulje

Pripravili smo osnovno raztopino (OR) natrijevega valproata s koncentracijo 4,6 mg/mL, kar ustreza raztopini VPA s koncentracijo 4,0 mg/mL. Pripravili smo tudi OR 4-en VPA s koncentracijo 1000 µg/mL. VPA smo raztopili v vodi, 4-en VPA pa v metanolu. Postopek priprave delovnih raztopin (DR) je prikazan v preglednicah IV in V.

Preglednica IV: Postopek priprave delovnih raztopin VPA

Delovna raztopina	C _{VPA} v vzorcu [µg/mL]	C _{VPA} v DR [µg/mL]	V _{OR} [µL]	V _{H₂O} [µL]	V _{končni} [µL]
ST1	2,5	50	25	1975	2000
ST2	5	100	25	975	1000
ST3	10	200	25	475	500
ST4	16	320	40	460	500
ST5	25	500	75	525	600
ST6	50	1000	125	375	500
ST7	75	1500	225	375	600
ST8	100	2000	250	250	500
ST9	150	3000	375	125	500
ST10	200	4000	1000	0	1000

Preglednica V: Postopek priprave delovnih raztopin 4-en VPA

Delovna raztopina	C _{4-en VPA} v vzorcu [µg/mL]	C _{4-en VPA} v DR [µg/mL]	V _{OR /DR} [µL]	V _{MeOH} [µL]	V _{končni} [µL]
ST1	0,1	2	50 µL ST4	450	500
ST2	0,25	5	500 µL ST3	500	1000
ST3	0,5	10	20	1980	2000
ST4	1	20	20	980	1000
ST5	2	40	20	480	500
ST6	4	80	40	460	500
ST7	6	120	60	440	500
ST8	8	160	80	420	500
ST9	10	200	100	400	500
ST10	20	400	200	300	500

Za pripravo kalibratorjev umeritvene krivulje smo v 1,5 mL plastično epruveto odpipetirali 360 μ L slepe plazme, dodali 20 μ L ustrezne DR VPA, 20 μ L ustrezne DR 4-en VPA in 20 μ L raztopine internega standarda (IS). Zmes smo premešali na vibracijskem mešalu.

Priprava plazemskih vzorcev

V 1,5 mL plastično epruveto smo odpipetirali 400 μ L odtaljenega in premešanega plazemskega vzorca ter dodali 20 μ L raztopine IS.

Priprava internega standarda

Pripravili smo 1,15 mM raztopino heksanojske kisline v vodi (28,8 μ L heksanojske kisline smo odpipetirali v 200 mL bučko in dopolnili do oznake).

Postopek analize

Odvzeli smo 50 μ L predhodno pripravljenega vzorca, dodali 200 μ L etil acetata in 100 μ L 10 mM HCl. Zmes smo 10 sekund mešali na vibracijskem mešalu, nato pa prestavili na stresalnik in stresali 5 minut pri 70 obratih na minuto in 25° C. Po stresanju smo vzorce centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi in 16 000 obratih na minuto.

Za izvedbo derivatizacije smo odvzeli 100 μ L organske faze in jo prenesli v novo 1,5 mL plastično epruveto. Po vrsti smo dodali 25 μ L raztopine 4-(aminometil)-7-metoksi-kumarina (kumarina), 25 μ L raztopine hidroksibenzotriazola (HOBt-a) in 100 μ L raztopine 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarboiimida (EDC-ja). Postopek priprave raztopin reagentov je predstavljen v preglednici VI. Dodali smo še 40 μ L 1 M fosfatnega pufra s pH 8,0. Zmes smo 10 sekund mešali na vibracijskem mešalu, nato pa prestavili na stresalnik in stresali 5 minut pri 70 obratih na minuto in 25° C. Po stresanju smo vzorce centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi in 16 000 obratih na minuto.

Preglednica VI: Priprava derivatizacijskih reagentov

	M [g/mol]	c [mg/mL]	topilo	m [mg]	V [μ L]
kumarin	205	9	DMF	4,0	444
HOBt	135,1	80	DMF	40,0	500
EDC	155,2	600	voda	650,0	1083

*DMF = dimetilformamid

Odvzeli smo 25 µl organske faze in jo prenesli v novo 1,5 mL plastično epruveto. Topilo smo do suhega odparili na aparaturi TurboVap pri temperaturi kopeli 40° C in tlaku dušika 2 bar (približno 5 minut). Vsebino smo rekonstituirali v 150 µL 60% acetonitrila in jo prenesli v vialo, opremljeno z inserti. Pogoji kromatografske ločbe so zbrani v preglednici VII.

Preglednica VII: Pogoji kromatografske analize plazemskega vzorca

Kolona	Luna C8 150 x 6mm, 5µm
Mobilna faza v kanalu A	20 mM raztopina amonijevega acetata, pH=4
Mobilna faza v kanalu B	acetonitril
Elucija	gradientna; program je prikazan v preglednici VIII
Pretok mobilne faze	1,5 mL/min
Čas analize	11 min
Volumen injiciranja	5 µL
Temperatura kolone	50° C
Ojačitev signala (gain)	11 in 13; program je prikazan v preglednici VIII
Detekcija	FLD, Ex=330nm, Em=400nm

Preglednica VIII: Program gradientne elucije in program ojačitve signala

Čas (min)	% acetonitrila	Čas (min)	Ojačitev signala (gain)
0	38	0	11
3,9	40	6,1	13
11	40	7,7	11

3.2.1.2 Kromatografska analizna metoda za določanje VPA v DBS

Za določitev koncentracije VPA v posušeni krvni madežih smo uporabili kromatografsko metodo, ki jo je v okviru svoje magistrske naloge razvila Tea Beznec (38). Metodo smo zaradi

številnih težav, s katerimi smo se srečali pri analizi poskusnih vzorcev, predhodno optimizirali. Proces optimizacije je predstavljen v Prilogi A, v nadaljevanju pa je opisan postopek optimizirane metode.

Priprava kalibratorjev umeritvene krivulje

Najprej smo pripravili vodno raztopino natrijevega valproata s koncentracijo 4,84 mg/mL, kar ustreza raztopini VPA s koncentracijo 4,20 mg/mL. Osnovno raztopino smo redčili tako, kot je prikazano v preglednici IX, in na ta način pripravili delovne raztopine.

Preglednica IX: Postopek priprave delovnih raztopin VPA

Delovna raztopina	C _{VPA} v vzorcu [µg/mL]	C _{VPA} v DR [µg/mL]	V _{OR} [µL]	V _{H2O} [µL]	V _{končni} [µL]
ST1	2,5	52,5	20	1580	1600
ST2	5	105	40	1560	1600
ST3	10	210	80	1520	1600
ST4	16	336	80	920	1000
ST5	25	525	50	350	400
ST6	50	1050	50	150	200
ST7	75	1575	90	150	240
ST8	100	2100	50	50	100
ST9	150	3150	90	30	120
ST10	200	4200	100	0	100

Za pripravo kalibratorjev umeritvene krivulje smo v 1,5 mL plastično epruveto odpipetirali 400 µL krvi, jo obogatili z 20 µL ustrezne delovne raztopine (ST1-ST10) ter nežno premešali. Na kartico Whatman 903 smo nanесли 10 µL krvne madeže in jih 24 ur sušili na sobni temperaturi. Po končanem sušenju smo kartice shranili v plastični vrečki, opremljeni s sušilnim sredstvom.

Priprava DBS vzorcev bolnikov

Na kartico smo nanесли 10 µL venske krvi bolnikov na terapiji z VPA, odvzete v epruveto z EDTA, in madeže 24 ur sušili na sobni temperaturi.

Analiza DBS vzorcev

Za izvedbo ekstrakcije smo lise krvi na kartici natančno obrezali, razdelili na četrtine in jim dodali 50 µL ekstrakcijskega topila z dodanim IS. Postopek priprave ekstrakcijskega topila je v preglednici X. Vzorec smo 30 sekund mešali na vibracijskem mešalu, nato pa 3 minute inkubirali v ultrazvočni kadički. Dodali smo 200 µL etil acetata, zopet 30 sekund mešali na vibracijskem mešalu in za 10 minut postavili v ultrazvočno kadičko. Vzorec smo nato 5 minut stresali s stresalnikom pri 25°C in 70 obratih na minuto. Nazadnje smo vzorec centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi in 16 000 obratih na minuto.

Preglednica X: Postopek priprave ekstrakcijskega topila

	V [µL]
1 M HCl	40
1,15 mM raztopina oktanojske kisline v MeOH*	400
Voda	3560

*Priprava 1,15 mM raztopine oktanojske kisline: 9,1 µL oktanojske kisline smo odpipetirali v 50 mL bučko in dopolnili do oznake z metanolom.

Za izvedbo derivatizacije smo odvzeli 100 µL organske faze in jo prenesli v novo 1,5 mL plastično epruveto. Po vrsti smo dodali 25 µL raztopine kumarina, 25 µL raztopine HOBt-a in 100 µL raztopine EDC-ja. Postopek priprave raztopin reagentov je prikazan v preglednici VI. Dodali smo še 40 µL 1M fosfatnega pufera s pH 8,0. Zmes smo 10 sekund mešali na vibracijskem mešalu, nato pa prestavili na stresalnik in stresali 5 minut pri 70 obratih na minuto in 25° C. Zatem smo vzorce centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi in 16 000 obratih na minuto.

Od dobljene raztopine smo odvzeli 25 µL organske faze in jo prenesli v novo 1,5 mL plastično epruveto. Topilo smo do suhega odparili na aparaturi TurboVap pri temperaturi kopeli 40° C in tlaku dušika 2 bar (približno 5 min). Vsebino smo rekonstituirali v 150 µL 60% acetonitrila in jo prenesli v vialo, opremljene z inserti.

Preglednica XI: Pogoji kromatografske analize DBS vzorca

Kolona	Luna C8 150 x 6mm, 5µm
Mobilna faza v kanalu A	20 mM amonijev acetat, pH=4

Mobilna faza v kanalu B	acetonitril
Elucija	izokratska, 45% acetonitrila
Pretok mobilne faze	1,5 mL/min
Čas analize	8 min
Volumen injiciranja	5 µL
Temperatura kolone	50° C
Ojačitev signala (gain)	11
Detekcija	FLD, Ex=330nm, Em=400nm

3.2.1.3 Bolnišnična imunološka metoda za določanje VPA

V laboratoriju Psihiatrične bolnišnice Idrija (PBI) so koncentracijo VPA določili s pomočjo imunokemijske metode CEDIA (*Cloned Enzyme Donor Immunoassay*).

Metoda CEDIA je kompetitivna encimsko imunska metoda, ki temelji na uporabi rekombinantno spremenjenega bakterijskega encima β -galaktozidaze. Ta je s pomočjo genetskega inženiringa razdeljena v dva neaktivna fragmenta (donor encima in akceptor encima), ki se lahko v raztopini spontano združita in tvorita aktiven encim. Donor encima, ki je konjugiran z VPA, z analitom iz vzorca tekmuje za omejeno število vezavnih mest na protitelesih, specifičnih za VPA. Če v vzorcu ni VPA, se konjugiran donor encima veže na protitelesa, posledično je za vezavo na molekule akceptorja encima na voljo manj molekul donorja encima. V primeru prisotnosti VPA v vzorcu pa zaradi kompeticije nastane več aktivnega encima, ki pretvarja substrat v obarvan produkt. Posledica je sprememba barve raztopine, ki jo določimo spektrofotometrično.

Občutljivost metode je 3,0 µg/mL, njena specifičnost pa je predstavljena v preglednici XII.

Preglednica XII: Specifičnost metode CEDIA

spojina	navzkrižna reaktivnost
3-hidroksi VPA	4,4%
4-hidroksi VPA	4,4%
5-hidroksi VPA	5,8%

3-okso VPA	3,8%
2,4-dien VPA	14,2%
2-en VPA	1,0%
4-en VPA	22,3%
karbamazepin, karbamazepin-10,11-epoksid, klonazepam, diazepam, fenobarbital, fenitoin, primidon, acetilsalicilna kislina	< 1%

3.2.2 Izračun plazemskih in DBS koncentracij analitov

Iz kromatografskih odzivov oz. površin (A) posameznega analita smo njegovo koncentracijo v vzorcu izračunali po enačbi 1, pri čemer smo upoštevali naklon (k) in odsek (n) ustrezne umeritvene krivulje. Na ta način smo izračunali plazemsko koncentracijo VPA (C_{pl} hplc), plazemsko koncentracijo 4-en VPA ($C_{4-en VPA}$) in koncentracijo VPA v DBS (C_{DBS} hplc).

$$c_{analit} = \frac{\frac{A_{analit}}{A_{IS}} - n}{k}$$

enačba 1

Iz izmerjenih koncentracij VPA v DBS vzorcih smo izračunali tudi plazemsko koncentracijo učinkovine (C_{pl} izr). Za preračun koncentracij smo uporabili enačbo 2:

$$C_{pl} \text{ izr} = \frac{C_B}{(1 - Ht) + K_{BC/pl} * Ht}$$

enačba 2

V zgornji enačbi Ht označuje vrednost hematokrita, C_B pa predstavlja koncentracijo učinkovine v polni krvi in v našem primeru ustreza C_{DBS} hplc. Koeficient $K_{BC/pl}$; $K_{BC/pl} = \frac{C_{BC}}{C_{pl}}$ ponazarja razmerje med koncentracijo učinkovine znotraj krvne celice (C_{BC}) in plazemsko koncentracijo učinkovine (C_{pl}). Če poznamo vrednost koeficienta $K_{BC/pl}$, lahko po enačbi 2 iz izmerjenih DBS koncentracij izračunamo plazemsko koncentracijo učinkovine. Postopek izračuna koeficienta $K_{BC/pl}$ je predstavljen pod točko 4.6.

3.2.3 Validacija kromatografskih metod

Ker za potrebe raziskave nismo razvili nove metode, temveč smo zgolj optimizirali dve že obstoječi in validirani metodi, smo se odločili testirati zgolj nekatere parametre, ki so potrebni za dokazovanje ustreznosti analiznih metod. Preverjali smo selektivnost, linearnost, točnost in ponovljivost obeh kromatografskih metod, pri čemer smo upoštevali smernice za validacijo bioanaliznih metod Ameriške agencije za hrano in zdravila.

3.2.4 Klinična raziskava

V raziskavo smo vključili bolnike moškega spola na terapiji z VPA, ki so bili med februarjem in junijem 2017 napoteni na rutinski odvzem krvi za izvedbo TDM v PBI. Sodelujoči so svoje strinjanje s sodelovanjem v raziskavi izkazali s podpisom informiranega pristanka. Etično sprejemljivost raziskave je na seji 19. julija 2016 potrdila Komisija za medicinsko etiko (priloga na strani 75).

Bolniku, ki ga je psihiater napotil na meritev koncentracije VPA, smo predstavili namen raziskave in mu odvzeli vzorec krvi. Ob vključitvi bolnika v raziskavo smo izpolnili Testne liste (priloga na strani 76) in na ta način zabeležili vse pomembne informacije. Podatke smo pridobili s pregledom popisov, temperaturnih listov in podatkov iz bolnišničnega informacijskega sistema Birpis. Zbrali smo naslednje informacije:

- demografske podatke (spol, starost, telesna masa in višina),
- podatke o diagnozi,
- podatke o terapiji z VPA (dnevni odmerek, režim odmerjanja, zadnji odmerek),
- podatke o sočasni terapiji,
- podatke o neželenih učinkih.

Prisotnost neželenih učinkov (NU) je ocenil psihiater na dan odvzema krvi. V laboratoriju PBI so poleg koncentracije VPA določili tudi vrednost hematokrita in koncentracijo katalitične aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) ter aspartat aminotransferaze (AST) v serumu.

3.2.5 Primerjava metod

Rezultate imunološke in obeh kromatografskih metod smo kvantitativno in grafično primerjali z uporabo Passing Bablok regresije ter Bland-Altmanovega grafa. Ujemanje meritev

posameznih parov metod smo ovrednotili tudi s statističnim testom, pri čemer je ničelna hipoteza Wilcoxonovega testa predznačenih rangov predpostavljala enakost metod.

3.2.6 Določitev porazdelitvenih koeficientov R in K

Na podlagi izmerjenih koncentracij učinkovine v plazmi in polni krvi bolnikov smo izračunali porazdelitveni koeficient $R_{B/pl}$; $R_{B/pl} = \frac{C_B}{C_{pl}}$, kjer C_B predstavlja koncentracijo učinkovine v polni krvi, C_{pl} pa plazemsko koncentracijo učinkovine. Vrednosti koeficientov $R_{B/pl}$ so za posamezno učinkovino podane v literaturi in omogočajo neposredno primerjavo plazemskih in DBS koncentracij. Na podlagi rezultatov naših analiz smo za VPA izračunali vrednost koeficienta $R_{B/pl}$ in jo primerjali z literaturno vrednostjo.

Z uporabo enačbe 3 smo izračunali tudi vrednost porazdelitvenega koeficienta $K_{BC/pl}$.

$$K_{BC/pl} = \frac{C_B - C_{pl} * (1 - Ht)}{Ht * C_{pl}}$$

enačba 3

3.2.7 Korelacija med 4-en VPA, ALT in AST

Za ovrednotenje povezave med koncentracijami 4-en VPA in serumskimi vrednostmi jetrnih encimov ALT ter AST smo uporabili Spearmanov koeficient korelacije. Statistično značilnost rezultata smo ovrednotili z izračunom p vrednosti.

3.2.8 Pregled neželenih učinkov

V sklopu analize neželenih učinkov smo preverili, kateri izmed NU so se pri bolnikih pojavljali najpogosteje. Vpliv posameznih dejavnikov na pojav NU smo ovrednotili tako, da smo bolnike glede na prisotnost NU razvrstili v dve skupini, nato pa med skupinama primerjali vrednosti parametrov, ki lahko vplivajo na pojav NU. Podatke smo s pomočjo kvantilnih diagramov prikazali tudi grafično.

3.2.9 Pregled učinkovin, ki lahko vplivajo na plazemsko koncentracijo VPA

Na podlagi informacij iz temperaturnih listov smo v sočasni terapiji bolnikov poiskali tiste učinkovine, ki bi lahko z VPA vstopale v interakcijo. Osredotočili smo se zgolj na tiste

učinkovine, ki lahko vplivajo na plazemsko koncentracijo VPA. Za pregled interakcij smo uporabili podatkovno bazo Lexicomp. Upoštevali smo le tiste potencialne interakcije, ki so razvrščene v razred X, D ali C.

3.2.10 Statistična analiza podatkov

Podatke smo analizirali v programih IBM Statistical Package for Social Sciences (verzija 22.0, SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA) in MedCalc (verzija 17.6, Ostend, Belgija).

Za vrednotenje korelacij med različnimi spremenljivkami smo uporabili Spearmanov koeficient korelacije. Meritve, opravljene z uporabo dveh različnih analiznih metod, smo primerjali z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov, ki se uporablja za analizo dveh odvisnih vzorcev. Za analizo dveh neodvisnih vzorcev smo uporabili Mann-Whitneyjev U-test. Hipoteze o statistični značilnosti razlik med vzorci smo preverjali pri stopnji tveganja 5% ($\alpha = 0,05$).

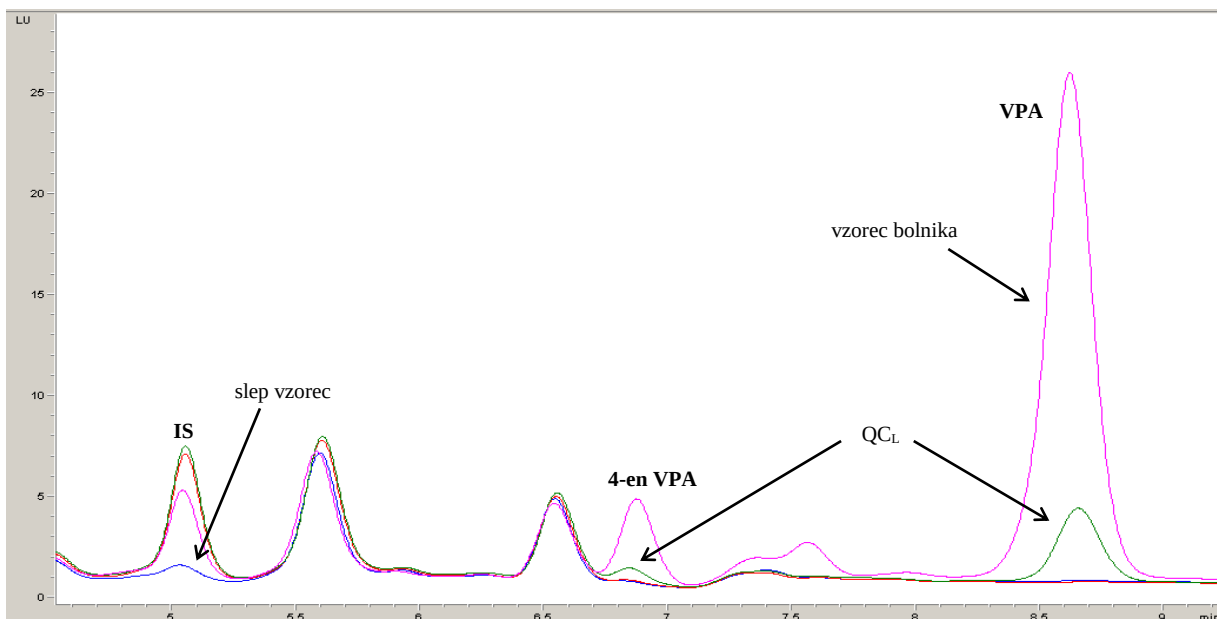
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Kromatografska analiza plazemskih in DBS vzorcev

Analizo vzorcev smo izvedli v štirih (za plazemske) oz. treh (za DBS vzorce) serijah v časovnem razmiku približno enega meseca. V obdobju od odvzema do analize so bili plazemski vzorci zamrznjeni na -20°C , DBS vzorci pa shranjeni na suhem mestu v laboratoriju PBI.

4.1.1 Določitev VPA in 4-en VPA v plazmi z uporabo kromatografske metode

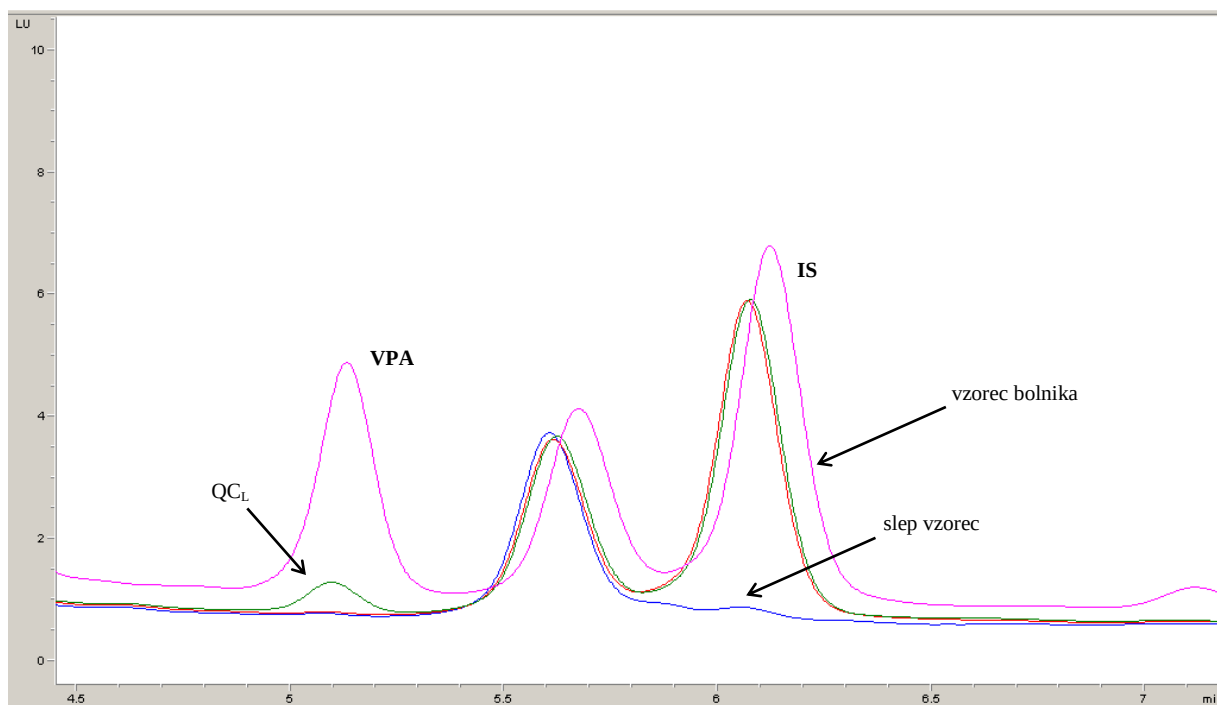
Na sliki 4 je primer kromatograma, ki je rezultat kromatografske analize plazemskega vzorca. V fazi analize vzorcev bolnikov nismo imeli težav z morebitnimi interferencami. Retencijski časi analitov znašajo 5,2 za IS, 6,9 za 4-en VPA in 8,7 minute za VPA. Rezultati analiz plazemskih vzorcev so podani v preglednici XXI.



Slika 4: Kromatogram analize plazemskih vzorcev – slep vzorec, kontrolni vzorec nizke koncentracije (QC_L) in vzorec bolnika z zaporedno številko 5; QC_L ima koncentracijo VPA $7\ \mu\text{g/mL}$ in 4-en VPA $0,75\ \mu\text{g/mL}$

4.1.2 Določitev VPA v DBS z uporabo kromatografske metode

Rezultat analize DBS vzorca je kromatogram, prikazan na sliki 5.



Slika 5: Kromatogram analize DBS vzorcev – slep vzorec, kontrolni vzorec nizke koncentracije (QC_L) in vzorec bolnika z zaporedno številko 5; QC_L ima koncentracijo VPA 7 $\mu\text{g/mL}$

V DBS vzorcih 4-en VPA nismo določali, ker je volumen analiziranega biološkega vzorca pri DBS metodi petkrat manjši v primerjavi s plazemsko metodo, zato bi bile količine presnovka v vzorcu premajhne, da bi jih lahko točno in ponovljivo izmerili. V DBS vzorcih smo tako določali le koncentracijo VPA, zato je ta kromatografska metoda krajša in obenem enostavnejša od plazemske, saj ne zahteva gradientne elucije. Retencijski čas VPA znaša 5,1, internega standarda pa 6,1 min. Rezultati analiz so zbrani v preglednici XXI.

4.2 Validacija kromatografskih analiznih metod

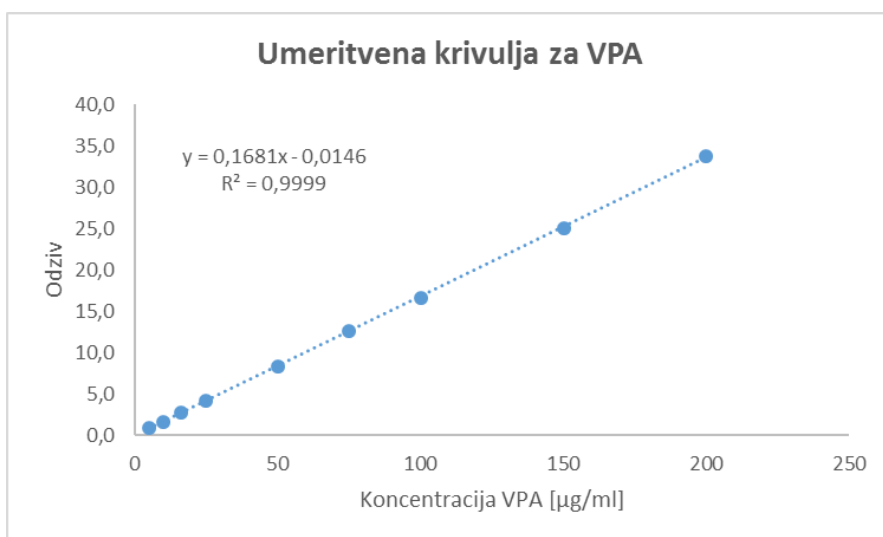
4.2.1 Validacija kromatografske analizne metode za določanje VPA in 4-en VPA v plazmi

- selektivnost

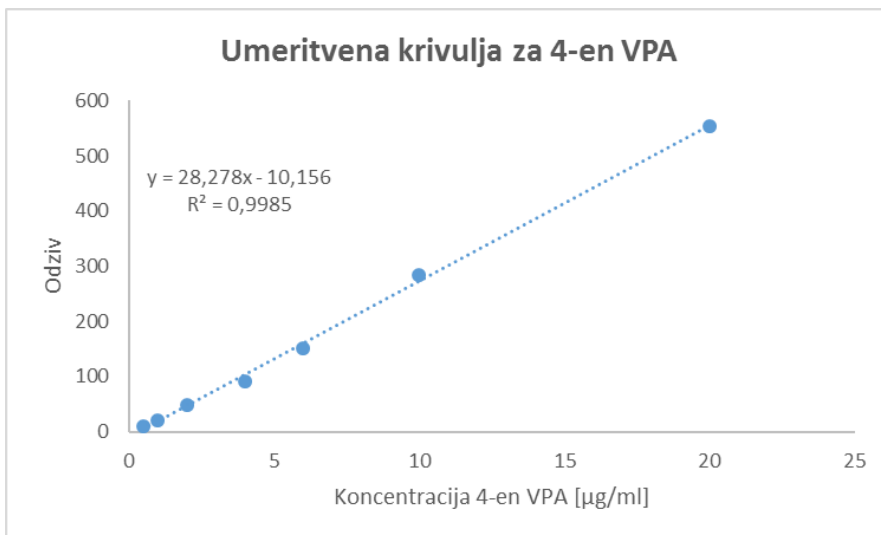
Selektivnost kromatografske plazemske metode smo preverili v fazi optimizacije. V skladu s smernicami smo analizirali slepo plazmo šestih različnih oseb. V območju retencijskih časov analitov nismo opazili motečih vrhov pri nobeni izmed analiziranih plazem. Nečistoča pod vrhom IS, ki ustreza 10% površine IS (razvidno na sliki 4), se je pojavljala konstantno pri vseh vzorcih in ni predstavljala težav pri določitvi koncentracij analitov.

- umeritvene krivulje in linearnost

Na dan analize vzorcev smo vedno pripravili novo umeritveno krivuljo. Primera UK za analizo plazemskih analitov sta na slikah 6 in 7.



Slika 6: Primer umeritvene krivulje za VPA



Slika 7: Primer umeritvene krivulje za 4-en VPA

Metoda za določanje VPA je linearna v območju od 5-200 µg/mL, metoda za določanje 4-en VPA pa v območju od 0,5-20 µg/mL. Pri optimizaciji metode za določanje VPA nismo imeli težav, pri analizi nižjih koncentracij 4-en VPA pa smo naleteli na težave s točnostjo. Na podlagi pregleda literature smo sklepali, da bodo koncentracije presnovka v krvnih vzorcih bolnikov v rangu 1 µg/mL, zato smo želeli metodo optimizirati tako, da bi lahko z njo določali tudi koncentracije med 0,1 in 1 µg/mL. Ugotovili smo, da tako nizkih koncentracij ne bomo uspeli kvantificirati, saj kljub ojačitvi signala fluorescenčnega detektorja (FLD) nismo dosegli zadovoljive točnosti. Težave s točnostjo smo imeli tudi pri koncentraciji 0,25 µg/mL, zato smo se odločili, da metodo validiramo za območje od 0,5-20 µg/mL.

Preglednica XIII prikazuje naklone in odseke UK, ki smo jih dobili ob različnih dneh izvedbe analiz. Iz rezultatov je razvidno, da so nakloni UK VPA precej ponovljivi (relativna standardna deviacija, RSD = 4,5%), medtem ko smo pri UK za 4-en VPA ob zadnjem dnevu analize dobili vrednost naklona, ki nekoliko odstopa od tistih, določenih ob prejšnjih dneh analize. Ker ta sprememba ni vplivala na točnost naših meritev, smo se odločili, da odstopanje sprejmemo.

Preglednica XIII: Nakloni, odseki in determinacijski koeficienti umeritvenih krivulj plazemske metode

	VPA			4-en VPA		
	k	n	R ²	k	n	R ²

1. dan	0,1541	-0,1263	0,9993	22,07	-6,594	0,9983
2. dan	0,1639	0,1167	0,9992	28,28	-10,16	0,9985
3. dan	0,1536	-0,2029	0,9996	25,20	-9,966	0,9999
4. dan	0,1681	-0,01457	0,9999	14,47	-7,207	0,9947

Iz umeritvenih krivulj smo izračunali tudi determinacijski koeficient (R^2). V primeru VPA so vse R^2 vrednosti večje od 0,999, kar kaže na dobro ujemanje točk z regresijsko premico. Pri 4-en VPA pa sta dve vrednosti R^2 nižji od 0,999, iz česar sklepamo na nekoliko slabšo linearnost. Kljub temu so bili odzivi vseh kalibratorjev znotraj 15% njihove nominalne koncentracije, kar ustreza smernicam.

- točnost

Točnost naših metod smo preverjali z analizo treh do šestih paralelnih vzorcev z znanimi koncentracijami (QC_L , QC_M , QC_H), ki so bile enakomerno razporejene po celotnem koncentracijskem območju. Izmerjeno koncentracijo smo primerjali z nominalno in izračunali točnost posamezne meritve.

V preglednici XIV je prikazan interval točnosti meritev QC za vsak dan analize. Iz preglednice je razvidno, da se nekaj posameznih vrednosti od nominalne koncentracije razlikuje za več kot 15%, v vseh tovrstnih primerih pa je bila neustrezna le ena izmed vseh meritev posameznega QC. Smernice zahtevajo, da je več kot 67% meritev QC znotraj meja točnosti ($\pm 15\%$), čemur pa naša metoda kljub posameznim odstopanjem ustreza.

Preglednica XIV: Dnevna točnost plazemske metode v različnih dneh

Analit		VPA			4-en VPA		
QC		QC_L	QC_M	QC_H	QC_L	QC_M	QC_H
c [$\mu\text{g/mL}$]		7	60	175	0,75	3	15
1.dan	točnost [%]	93,8-121	101-103	99,9-103	90,1-96,1	84,7-111	101-118

2.dan	točnost [%]	87,1-93,3	96,8-104	96,8-104	107-112	94,7-102	106-113
3.dan	točnost [%]	106-113	95,0-99,7	98,5-105	86,6-103	86,2-104	93,7-108
4.dan	točnost [%]	95,9-100	93,8-105	102-107	107-115	83,4-92,9	90,7-108
povprečna točnost [%]		101	99,4	101	103	95,6	104

- ponovljivost

Ponovljivost naše metode smo dokazali z izračunom RSD meritev posameznega QC. Dnevna in meddnevna ponovljivost sta prikazani v preglednicah XV in XVI. RSD posameznega QC v nobenem primeru ni večji od 15%, zato lahko trdimo, da je metoda ponovljiva.

Preglednica XV: Dnevna ponovljivost plazemske metode

analit		VPA			4-en VPA		
QC		QC _L	QC _M	QC _H	QC _L	QC _M	QC _H
c [µg/mL]		7	60	175	0,75	3	15
1.dan	$\bar{c}_{izračunana}$ [µg/mL]	7,69	61,1	178	0,691	2,96	16,6
	SD	0,993	0,734	2,80	0,0263	0,392	1,26
	RSD [%]	12,9	1,20	1,57	3,81	13,3	7,58
2.dan	$\bar{c}_{izračunana}$ [µg/mL]	6,29	60,3	175	0,821	2,95	16,3
	SD	0,181	1,69	4,81	0,0143	0,0852	0,443
	RSD [%]	2,87	2,80	2,75	1,74	2,89	2,71
3.dan	$\bar{c}_{izračunana}$ [µg/mL]	7,71	58,5	176	0,716	2,92	15,0
	SD	0,200	1,22	4,31	0,0521	0,220	0,831
	RSD [%]	2,59	2,09	2,45	7,27	7,53	5,54
4.dan	$\bar{c}_{izračunana}$ [µg/mL]	6,88	59,2	181	0,838	2,68	15,0
	SD	0,116	2,41	3,69	0,0246	0,117	1,12
	RSD [%]	1,69	4,07	2,04	2,94	4,37	7,48

Preglednica XVI: Meddnevna ponovljivost plazemske metode

analit	VPA			4-en VPA		
QC	QC _L	QC _M	QC _H	QC _L	QC _M	QC _H
c [µg/mL]	7	60	175	0,75	3	15
$\bar{c}_{izračunana}$ [µg/mL]	7,08	59,6	177	0,775	2,87	15,6
SD	0,717	1,84	4,51	0,0706	0,223	1,11
RSD [%]	10,1	3,08	2,54	9,11	7,76	7,09

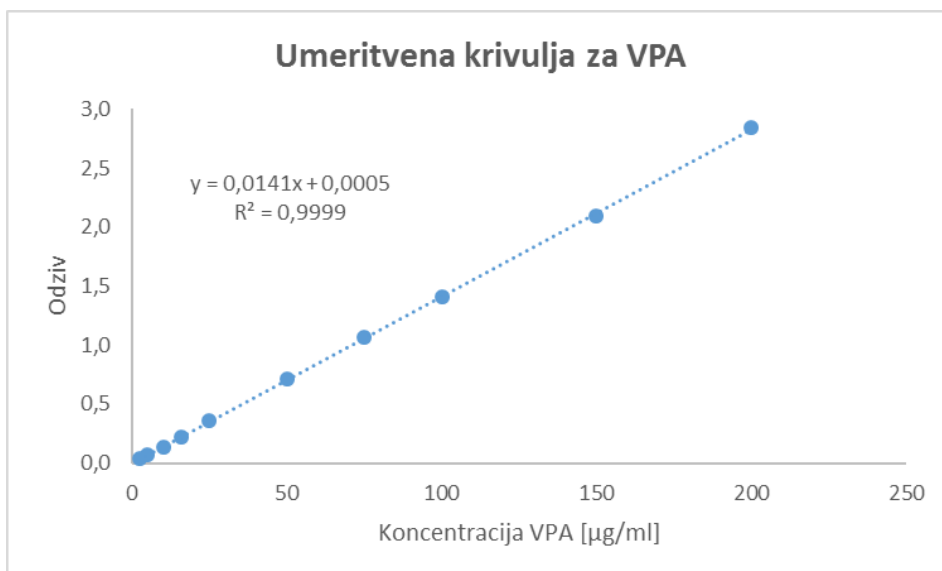
4.2.2 Validacija kromatografske analizne metode za določanje VPA v DBS

- selektivnost

Selektivnost DBS metode smo dokazali z analizo krvi brez dodane VPA šestih različnih oseb, pri čemer v območju retencijskih časov analitov nismo opazili motečih vrhov.

- umeritvene krivulje in linearnost

Za vsak dan analize DBS vzorcev smo pripravili novo umeritveno krivuljo, primer ene izmed njih je na sliki 8. Metoda je linearna v območju od 2,5-200 µg/mL.



Slika 8: Umeritvena krivulja za VPA

V preglednici XVII so zbrani nakloni in odseki vseh treh umeritvenih krivulj. Naklona prvega in tretjega dne analize sta primerljiva, medtem ko se naklon drugega dne od ostalih dveh precej razlikuje. Drugačen koeficient pripisujemo nižjim površinam odzivov internega standarda, saj smo na ta dan analize uporabili staro raztopino IS, zato je mogoče, da je nekaj spojine v raztopini razpadlo. Posledica nižjih površin IS je višja vrednost razmerij med površino VPA in površino IS, zato je višja tudi vrednost naklona, kar pa ne vpliva na točnost naših meritev.

Preglednica XVII: Nakloni, odseki in determinacijski koeficienti umeritvenih krivulj metode DBS

	VPA		
	k	n	R ²
1.dan	0,01411	0,0005060	0,9999
2.dan	0,03256	-0,01815	0,9997
3.dan	0,01458	-0,009334	0,9996

- točnost

Točnost DBS metode smo dokazali z analizo šestih paralelk posameznega QC. V preglednici XVIII je prikazana točnost meritev. Nobena izmed izmerjenih koncentracij od nominalne ne odstopa za več kot 10%, zato sklepamo, da je metoda točna.

Preglednica XVIII: Dnevna točnost metode DBS v različnih dneh

Analit		VPA		
QC		QC _L	QC _M	QC _H
1.dan	točnost [%]	94,3-105	98,2-104	100-102
2.dan	točnost [%]	101-108	104-107	99,9-103
3.dan	točnost [%]	103-110	99,0-103	95,4-104
povprečna točnost [%]		103	103	100

- ponovljivost

V preglednicah XIX in XX sta podani dnevna in meddnevna ponovljivost DBS metode. RSD nobenega izmed QC ni večji od 4%, zato lahko trdimo, da je metoda dobro ponovljiva.

Preglednica XIX: Dnevna ponovljivost metode DBS

Analit		VPA		
QC		QC _L	QC _M	QC _H
c [µg/mL]		7	60	175
1.dan	$\bar{c}_{\text{izračunana}}$ [µg/mL]	6,96	60,3	177
	SD	0,277	1,32	1,35
	RSD [%]	3,98	2,19	0,763
2.dan	$\bar{c}_{\text{izračunana}}$ [µg/mL]	7,29	63,5	178
	SD	0,151	0,922	2,01
	RSD [%]	2,08	1,45	1,13
3.dan	$\bar{c}_{\text{izračunana}}$ [µg/mL]	7,43	60,9	173
	SD	0,190	1,06	4,82
	RSD [%]	2,56	1,75	2,79

Preglednica XX: Meddnevna ponovljivost metode DBS

analit	VPA		
QC	QC _L	QC _M	QC _H
c [µg/mL]	7	60	175
$\bar{c}_{\text{izračunana}}$ [µg/mL]	7,22	61,5	176
SD	0,284	1,79	3,72
RSD [%]	3,93	2,90	2,11

4.3 Klinična raziskava

V raziskavo smo vključili 21 moških prostovoljcev. Demografski podatki bolnikov in podatki o njihovi terapiji ter neželenih učinkih so zbrani v preglednici XXI, preglednica XXII pa prikazuje rezultate opravljenih laboratorijskih meritev.

Preglednica XXI: Demografski podatki bolnikov, podatki o njihovi terapiji in neželenih učinkih

št. bol.	starost	TM [kg]	TV [cm]	glavna diagnoza	D VPA [mg]	sočasna terapija	neželeni učinki
1	40	65	180	shizoafektivna motnja	1000	klozapin, kvetiapin, diazepam, biperiden, zolpidem	dispepsija
2	21	73	182	paranoidna shizofrenija	1000	haloperidol, biperiden, olanzapin, klonazepam, zolpidem	brez
3	60	87	165	paranoidna shizofrenija	1500	zoklopentiksol, kvetiapin, zolpidem, flufenazin, diazepam, rosuvastatin, metformin, glibenklamid, torasemid, ASA, fenoterol, ipratropij, bisoprolol	brez
4	29	103	187	BM	1000	risperidon, biperiden, lorazepam, haloperidol, diazepam, zolpidem	brez
5	55	67	187	paranoidna shizofrenija	1000	haloperidol, olanzapin, diazepam, biperiden, levotiroksin, tamsulozin	agitacija, anoreksija
6	66	83	166	BM	1000	kvetiapin, diazepam, zolpidem, metformin, bisoprolol, perindopril, ASA, atorvastatin	nespečnost
7	38	79	178	BM	500	zolpidem, diklofenak, lorazepam	brez
8	30	115	195	nediferencirana shizofrenija	1000	aripiprazol, biperiden	agitacija

9	55	75	190	organska depresivna motnja	900	olanzapin, paroksetin, haloperidol, lorazepam	brez
10	51	120	186	ponavljajoča se depresivna motnja	1000	duloksetin, alprazolam	glavobol, agitacija
11	53	114	188	BM	1300	olanzapin, haloperidol, biperiden, diazepam, ibuprofen	dispepsija
12	39	123	182	organska osebnostna motnja	1300	zuklopentiksol, lamotrigin, biperiden, escitalopram, alprazolam, zolpidem, paracetamol, magnezij, kalcij	glavobol, zvečanje TM
13	33	85	191	postshizofrenska depresija	1500	diazepam, kvetiapin, paroksetin, haloperidol, zolpidem, vitamini B kompleksa	brez
14	77	72	180	demenca pri Alzheimerjevi bolezni	300	risperidon, lorazepam, mirtazapin, midazolam, loratadin, ASA, naproksen, klemastin, laktuloza	nespečnost
15	31	101	180	druga organska afektivna motnja	1300	biperiden, risperidon, diazepam, haloperidol, zolpidem, paracetamol	glavobol, nespečnost, somnolenca, anoreksija

16*	58	84	192	postshizofrenska depresija	1000	kvetiapin, diazepam, mirtazapin	brez
17*	26	78	175	BM	1000	kvetiapin	brez
18	28	80	165	rezidualna shizofrenija	800	olanzapin, haloperidol, diazepam, risperidon, biperiden	somnolenca
19	51	81	182	shizoafektivna motnja	500	kvetiapin, diazepam, biperiden, zolpidem, zuklopentiksol, glimepirid, metformin, haloperidol	nespečnost
20	22	85	190	shizoafektivna motnja	1000	olanzapin, diazepam	brez
21	53	93	186	akutna in prehodna psihotična motnja	1000	flufenazin, haloperidol, olanzapin, biperiden, diazepam, zolpidem, pantoprazol, diklofenak	brez

TM = telesna masa; TV = telesna višina; D = dnevni odmerek; ASA = acetilsalicilna kislina; BM = bipolarna motnja

*ambulantni bolnik

Preglednica XXII: Opravljene laboratorijske meritve

št. bolnika	C _{pl} imun [µg/mL]	C _{pl} hplc [µg/mL]	C _{DBS} hplc [µg/mL]	C _{pl} izr [µg/mL]	C 4-en VPA [µg/mL]	Ht	ALT [µkat/L]	AST [µkat/L]
1	66,4	72,5	41,8	65,5	<LOQ	0,397	0,60	0,54
2	61,0	56,6	30,1	56,6	<LOQ	0,513	0,27	0,23
3	65,8	65,0	37,7	62,0	1,32	0,431	0,22	0,23
4	82,1	75,8	46,6	76,9	0,93	0,432	0,51	0,49
5	59,7	54,6	30,7	54,5	1,80	0,479	0,65	0,51
6	38,2	40,6	28,0	40,3	0,72	0,334	0,35	0,39
7	29,1	29,4	16,9	29,5	0,69	0,469	0,29	0,37
8	78,4	67,2	42,5	71,4	0,59	0,444	0,23	0,14
9	30,9	33,0	19,6	31,8	0,99	0,419	0,73	0,53
10	42,3	40,6	22,4	38,5	0,56	0,459	0,81	0,41
11	89,3	73,0	46,5	76,4	0,52	0,429	0,33	0,27
12	46,8	44,5	26,1	42,6	0,97	0,425	0,44	0,32
13	98,7	85,8	58,6	95,5	0,67	0,424	0,25	0,27
14	15,4	21,8	12,5	17,5	0,69	0,317	0,50	0,31
15	72,0	74,8	40,9	68,9	0,72	0,445	1,05	0,36
16*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,458	0,62	0,44
17*	76,8	78,4	53,4	89,2	0,71	0,441	0,16	0,23
18	65,8	74,0	39,5	69,4	0,68	0,473	0,65	0,36

19	66,7	83,8	42,2	72,4	0,80	0,457	0,71	0,43
20	68,3	70,6	42,8	68,7	0,66	0,414	0,22	0,33
21	43,9	50,5	31,1	46,0	1,02	0,355	0,39	0,44

LOQ = meja kvantifikacije

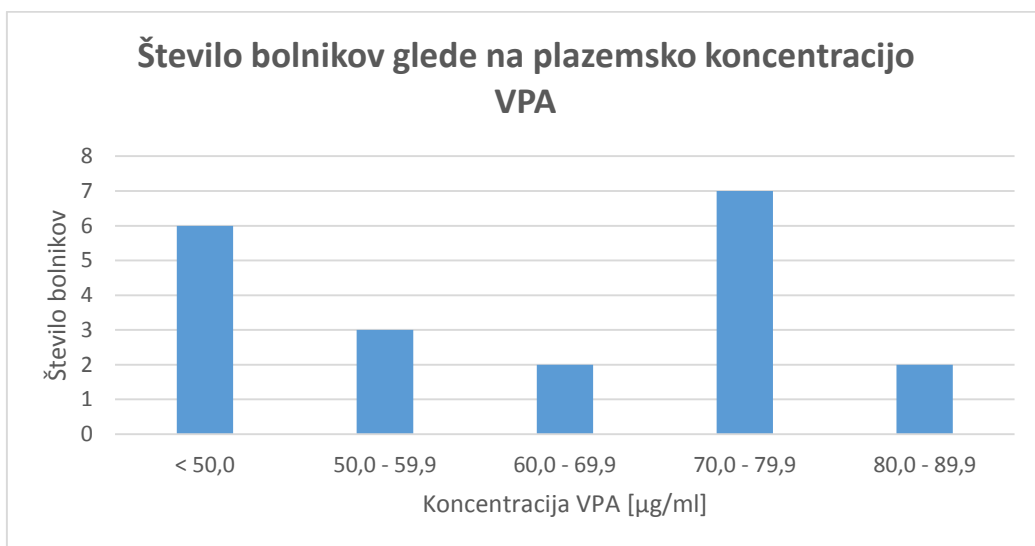
*ambulantni bolnik

Vse meritve so bile opravljene po vzpostavitvi stacionarnega stanja, ki nastopi v štirih dneh po uvedbi terapije oziroma spremembi odmerka. Vzorci krvi za analizo so bili odvzeti med sedmo in osmo uro zjutraj. Ker bolniki VPA praviloma jemljejo okrog 21. ure zvečer, je čas vzorčenja glede na smernice TDM neustrezen. Na ta način namreč ne dobimo podatka o najnižji plazemski koncentraciji (c_{min}), ki je pomembna za ustrezno interpretacijo podatkov. Te omejitve smo se zavedali že pred začetkom raziskave, a v ustaljeno prakso bolnišnice nismo želeli posegati. Čas odvzema vzorca je bil tako optimalen le pri dveh bolnikih, ki sta VPA jemala zjutraj in zvečer v enakem deljenem odmerku. Z izjemo enega bolnika, ki je VPA jemal opoldne in zvečer, so vsi ostali celoten dnevni odmerek vzeli zvečer.

Dva izmed bolnikov nista bila hospitalizirana, zato v njunih primerih ne moremo biti prepričani v ustrezno sodelovanje pri zdravljenju. Pri enem izmed njiju se je nedvoumno izkazalo, da VPA ni jemal, saj učinkovine v krvi ni bilo mogoče določiti z nobeno izmed analiznih metod. Ta primer potrjuje smiselnost izvajanja TDM v klinični praksi, saj se je s spremljanjem vodljivosti bolnikov mogoče izogniti številnim nejasnostim v primeru odsotnosti kliničnega odziva.

Pri pregledu indikacij za zdravljenje z VPA smo ugotovili, da je le pet izmed 21 bolnikov VPA prejelo za zdravljenje bipolarnе motnje. Pet bolnikov se je zdravilo za različnimi tipi shizofrenije, dva za postshizofrensko depresijo, trije za shizoafektivno motnjo, preostalih šest pa je imelo druge indikacije. Ugotovitev je skladna z drugimi podatki, ki ugotavljajo pogosto "off-label" predpisovanje VPA.

Slika 9 prikazuje število bolnikov glede na plazemsko koncentracijo VPA. Največji del bolnikov (35%) je imelo v plazmi koncentracijo VPA, ki ustreza sredini referenčnega območja (med 70 in 80 $\mu\text{g/mL}$). Nihče izmed bolnikov ni imel v plazmi koncentracij, višjih od zgornje meje referenčnega območja, ki znaša 100 $\mu\text{g/mL}$. Pri 30% odstotkov bolnikov smo izmerili koncentracije, nižje od spodnje meje referenčnega območja (50 $\mu\text{g/mL}$). Vsi bolniki te skupine so bili hospitalizirani, zato nizka vrednost koncentracije zagotovo ni posledica neustreznega jemanja zdravil. V primeru odvzema vzorca ob koncu odmernega intervala, približno 12 ur kasneje, bi bile vrednosti meritev še nižje. Najverjetneje bi takrat tudi za določeno število drugih bolnikov ugotovili, da so njihove c_{min} pod spodnjo mejo referenčnega območja. Podatka o tem, kakšen je bil klinični odziv teh bolnikov, nismo uspeli pridobiti.

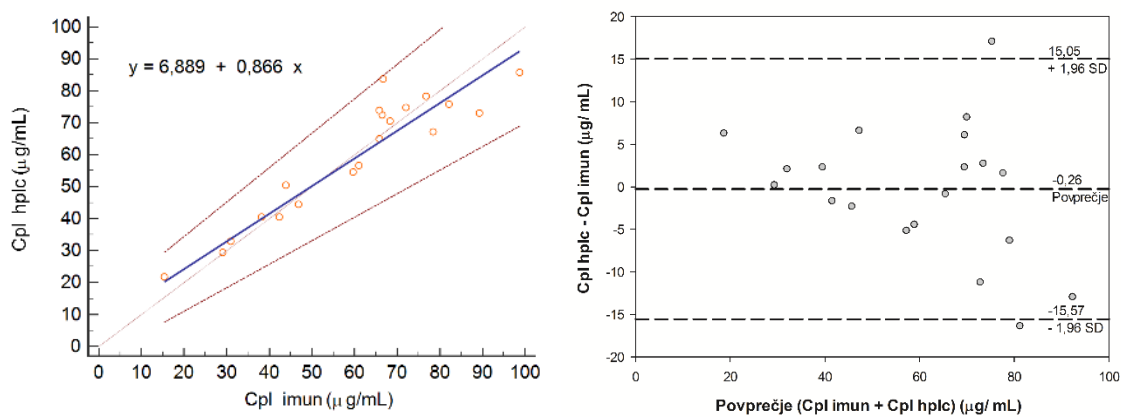


Slika 9: Število bolnikov glede na plazemsko koncentracijo VPA

4.4 Primerjava rezultatov analiznih metod

- primerjava imunološke in kromatografske plazemske metode

Metodi smo primerjali z izvedbo Passing-Bablok (PB) regresije, razlike med meritvami pa smo predstavili z Bland-Altmanovim grafom (slika 10).

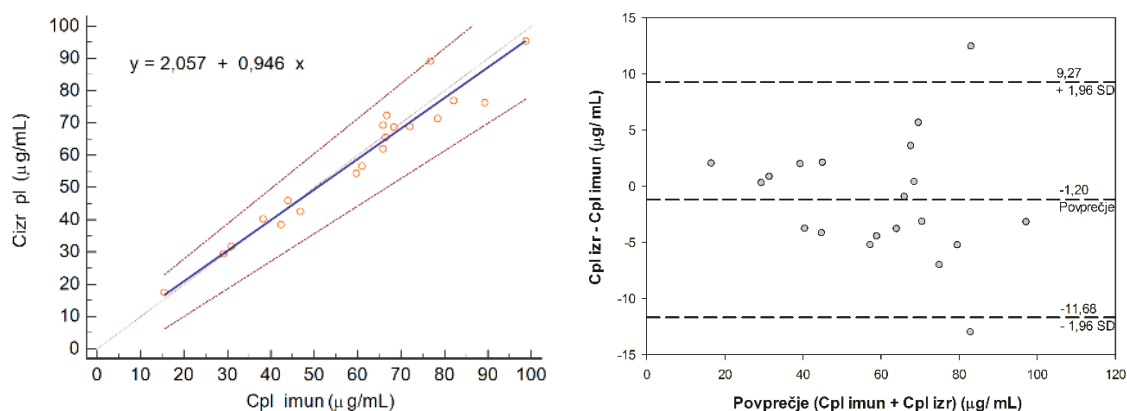


Slika 10: Passing-Bablok regresija in Bland-Altmanov graf za primerjavo imunološke in kromatografske plazemske metode

Enačba PB regresije $y = 0,866x + 6,889$ kaže na 13% odstopanje meritev. Kromatografska plazemska metoda daje v povprečju za $0,26 \mu\text{g/mL}$ nižje rezultate od imunološke, kar je razvidno iz Bland-Altmanovega grafa. 95% interval zaupanja (IZ) za povprečje razlik ima razpon od $-15,57$ do $15,05 \mu\text{g/mL}$. Tudi iz vrednosti naklona PB regresije lahko razberemo, da smo s kromatografsko metodo izmerili nižje vrednosti kot z imunološko. Rezultati so v skladu s pričakovanji, razumljivo je namreč, da kromatografska metoda daje nižje rezultate od imunološke. Problem slednje je navzkrižna reaktivnost, zaradi katere nekateri presnovki VPA in druge učinkovine v vzorcu lažno zvišajo rezultate, medtem ko s kromatografsko metodo selektivno določamo zgolj VPA. Primerljivost metod smo ovrednotili tudi z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. Statistična analiza je potrdila, da metodi dajeta primerljive rezultate ($p = 0,852$).

- primerjava imunološke in kromatografske DBS metode

Na sliki 11 je predstavljena primerjava rezultatov imunološke metode ter kromatografske DBS metode.



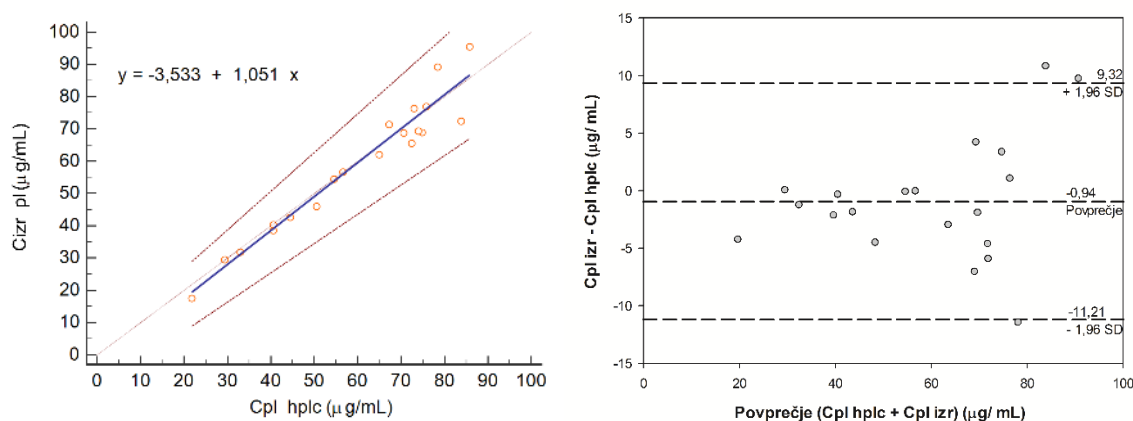
Slika 11: Passing-Bablok regresija in Bland-Altmanov graf za primerjavo imunološke in kromatografske DBS metode

DBS koncentracije smo pred primerjavo preračunali v plazemske. PB regresija kaže na 5% odstopanje meritev. Kromatografska DBS metoda daje glede na Bland-Altmanov graf v povprečju za $1,20 \mu\text{g/mL}$ nižje meritve v primerjavi z imunološko, pri tem je IZ $-11,68 - 9,27 \mu\text{g/mL}$. Tudi ta primerjava je potrdila našo predpostavko o večji selektivnosti kromatografske metode v primerjavi z imunološko in posledično nižjih rezultatih prve. Primerljivost metod smo

dokazali tudi s statistično analizo ($p = 0,191$). Opazili smo, da kromatografska DBS metoda bolj ustreza meritvam imunološke metode v primerjavi s kromatografsko plazemsko metodo. Glede na to, da je pri prvi metodi potreben preračun koncentracij iz DBS v plazemske, kar najverjetneje poslabša točnost rezultatov, je ta ugotovitev presenetljiva.

- primerjava kromatografskih metod

Ujemanje obeh kromatografskih metod je ponazorjeno na sliki 12.

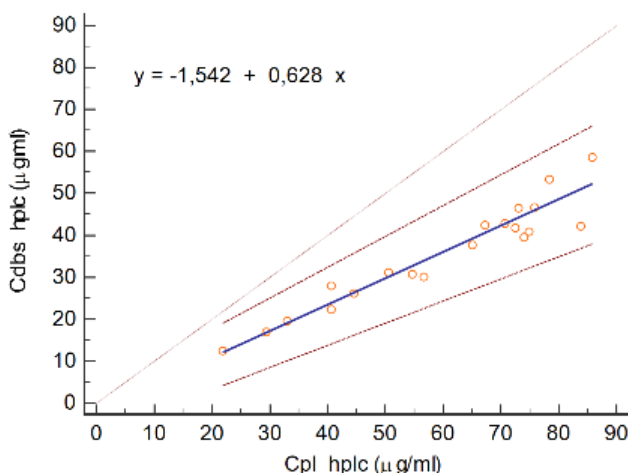


Slika 12: Passing-Bablok regresija in Bland-Altmanov graf za primerjavo obeh kromatografskih metod

PB regresija pokaže, da se metodi razlikujeta za 5%. Meritve, opravljene z analizo DBS vzorcev in sledečim preračunom koncentracij v plazemske, so v povprečju za 0,94 µg/mL nižje od meritev, opravljenih na plazemskih vzorcih. 95% IZ za povprečje razlik med metodama ima razpon od -11,21 – 9,32 µg/mL. Tudi statistična analiza je pokazala, da metodi dajeta enake rezultate ($p = 0,156$).

4.5 Določitev porazdelitvenih koeficientov R in K

Slika 13 prikazuje razmerje med koncentracijami VPA v plazemskih in DBS vzorcih. Rezultati metod seveda niso primerljivi, saj ena metoda podaja koncentracijo učinkovine v plazmi, druga pa v polni krvi. Neenakost metod smo dokazali tudi s statistično analizo ($p < 0,001$).



Slika 13: Passing-Bablok regresija za primerjavo koncentracij VPA med plazemskimi in DBS vzorci; vrednost naklona (0,628) je enaka porazdelitvenemu koeficientu R

Graf na sliki 13 omogoča določitev koeficienta R, saj ta ustreza naklonu premice. Eksperimentalno določena vrednost R tako znaša 0,63. S premice in naklona je razvidno, da so koncentracije VPA v DBS vzorci nižje od plazemskih, kar pomeni, da se VPA minimalno porazdeljuje v krvne celice.

Vrednost koeficienta K smo določili z uporabo enačbe 3, njegova vrednost znaša 0,088. Iz nizke vrednosti koeficienta lahko sklepamo, da je koncentracija VPA v plazmi mnogo večja od koncentracije znotraj krvnih celic.

V preglednici XXIII so poleg naših rezultatov navedene tudi vrednosti koeficientov R in K, ki so podane v literaturi. V primeru R so naši rezultati povsem primerljivi z vrednostmi iz literature, kar potrjuje ustreznost obeh kromatografskih metod. Pri koeficientu K pa vrednosti iz literature zavzemajo zelo različne vrednosti, razlike med njimi so skoraj petkratne. Eksperimentalno določena vrednost se nahaja blizu sredine tega intervala, zato lahko tudi na podlagi tega rezultata potrdimo ustreznost metode.

Preglednica XXIII: Primerjava eksperimentalno določenih vrednosti in vrednosti iz literature

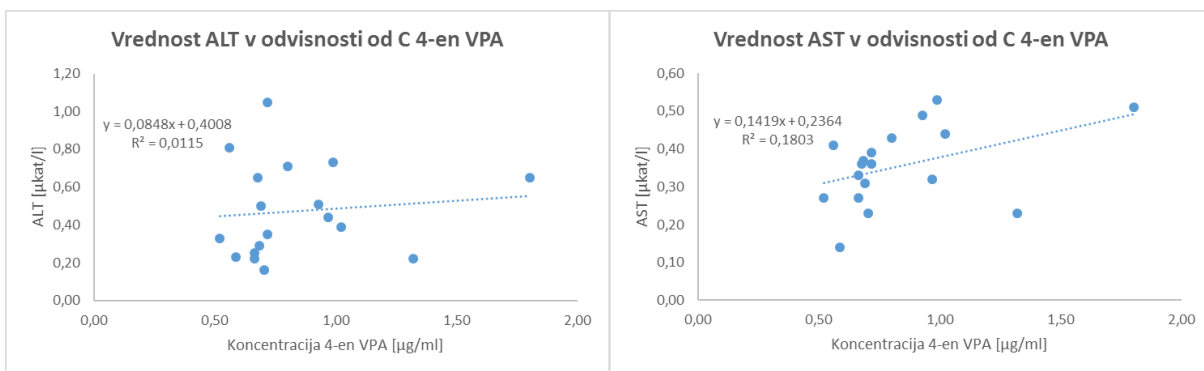
koeficient	eksperimentalno določena vrednost	vrednost iz literature (10, 39)
R	0,63	0,64
K	0,088	0,04 – 0,2

4.6 Korelacija med 4-en VPA, AST in ALT

Preverili smo, ali med koncentracijami VPA in 4-en VPA obstaja korelacija, a med spremenljivkama nismo našli povezave. Sicer tudi v literaturi nismo zasledili študije, ki bi poročala o morebitni korelaciji. Na nastanek 4-en VPA namreč bolj kot koncentracija VPA vplivajo drugi dejavniki, najpomembnejši med njimi je sočasna terapija. Induktorji encimov, predvsem encima CYP2C9, dokazano povečajo produkcijo 4-en VPA (24). V naši raziskavi nihče izmed bolnikov ni prejemal induktorjev. Tudi polifarmakoterapija, ki sicer ne vsebuje encimskih induktorjev, poveča nastajanje 4-en VPA. V tem primeru pride do nasičenja drugih presnovnih poti (predvsem β -oksidacije), zato se večji delež VPA presnavlja s citokromi (24). Obenem ima pomemben vpliv na koncentracijo 4-en VPA tudi polimorfizem encimov CYP2C9 in CYP2C6 (40).

Povišano vrednost serumskih aminotransferaz sta imela le dva bolnika, pri obeh pa je bila izven referenčnih vrednosti le vrednost ALT, medtem ko je bila vrednost AST normalna. Oba bolnika sta poročala o neželenih učinkih, njuni vrednosti 4-en VPA pa nista pomembno odstopali od drugih. Glede na raziskave se povišane vrednosti aminotransferaz pojavljajo pri 44% bolnikov na terapiji z VPA (11), v naši raziskavi pa omenjena bolnika ustrezata desetim odstotkom preučevanega vzorca. V PBI so nam pojasnili, da bolnike s povišanimi vrednostmi aminotransferaz natančno spremljajo. Pogost ukrep ob tem je znižanje odmerka ali celo prekinitev terapije z VPA, kar je najverjetneje razlog, da smo opazili tako nizek delež bolnikov s povišanimi vrednostmi.

Na sliki 14 sta grafa, ki prikazujeta vrednosti ALT in AST kot funkcijo koncentracije 4-en VPA. Iz grafov gre razbrati rahel pozitiven trend, ki je pri AST precej opaznejši kot pri ALT. Kljub temu ne moremo trditi, da med spremenljivkami obstaja korelacija, saj smo pri vrednotenju statistične značilnosti Spearmanovega korelacijskega koeficienta za korelacijo med ALT in 4-en VPA izračunali vrednost $p = 0,381$, za korelacijo med AST in 4-en VPA pa $p = 0,160$. Morebitna korelacija torej ni statistično značilna, povsem verjetno pa je, da je vzorec nekoliko premajhen, da bi korelacijo lahko potrdili.

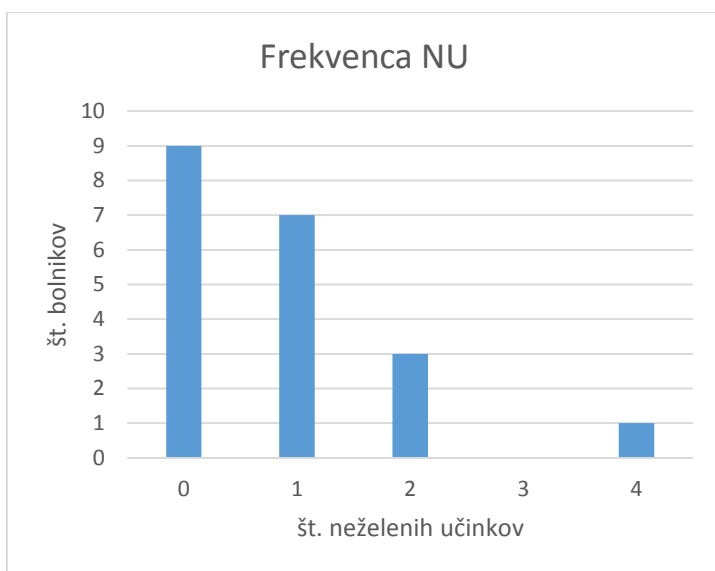


Slika 14: Vrednost ALT oz. AST v odvisnosti od plazemske koncentracije 4-en VPA

4.7 Pregled neželenih učinkov

Slika 15 prikazuje porazdelitev števila bolnikov glede na število neželenih učinkov, preglednica XXIV pa število bolnikov s posameznim NU.

Preglednica XXIV: Št. bolnikov s posameznim NU

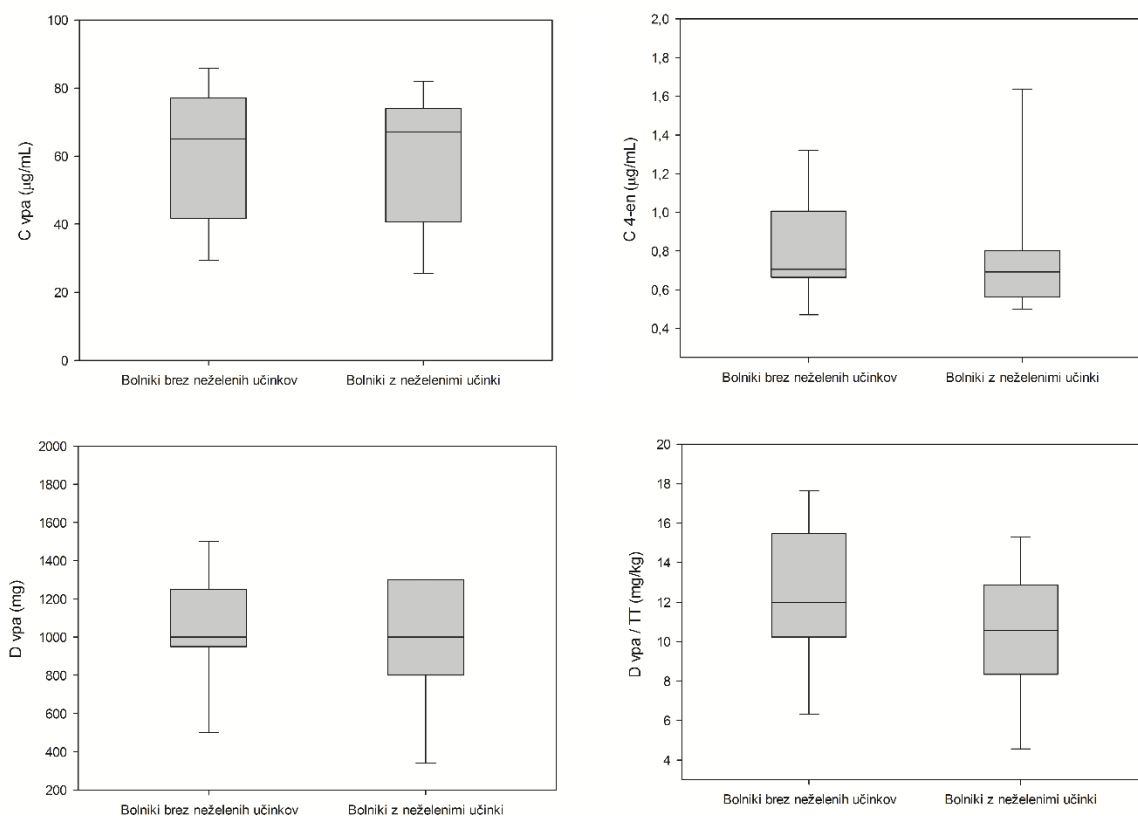


NU	Število bolnikov
nespečnost	4
agitacija	3
glavobol	3
dispepsija	2
anoreksija	2
somnolenca	2
zvečanje telesne mase	1

Slika 15: Frekvenca NU

Skoraj polovica bolnikov (45%) z neželenimi učinki sploh ni imela težav, izmed NU pa se je najpogosteje pojavljala nespečnost, o kateri so poročali štirje bolniki. Kvantilni diagrami na sliki 16 prikazujejo primerjavo vrednosti nekaterih spremenljivk med dvema skupinama, kjer prva skupina vključuje bolnike brez NU, druga pa bolnike z vsaj enim NU. Ovrednotili smo vpliv

koncentracije VPA, koncentracije 4-en VPA, odmerka VPA in odmerka VPA na kg telesne mase.



Slika 16: Kvantilni diagrami za primerjavo porazdeljenosti spremenljivk med skupinama

Z grafov ni opaziti pomembnih razlik. Izjema je zadnji diagram, ki prikazuje dnevni odmerek VPA na kilogram telesne mase, kjer je mediana v skupini bolnikov z NU nekoliko nižja. Z Mann-Whitneyjevim U-testom smo preverili, ali se vrednosti preiskovanih parametrov med obema skupinama bolnikov značilno razlikujejo. Rezultati analize so v preglednici XXV in kažejo na to, da med skupinama ni statistično značilnih razlik pri nobenem izmed dejavnikov. Glede na rezultate lahko sklepamo, da so bolniki primerno vodeni.

Preglednica XXV: Statistična značilnost (*p* vrednost) za posamezno spremenljivko v okviru Mann-Whitneyjevega U-testa

	C _{pl} hplc [µg/mL]	C _{4-en} VPA [µg/mL]	dnevni odmerek VPA [mg]	dnevni odmerek VPA na telesno maso [mg/kg]
p vrednost	0,790	0,518	0,714	0,239

* razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$

4.8 Pregled učinkovin, ki lahko vplivajo na plazemsko koncentracijo VPA

Izmed vseh učinkovin, ki so jih bolniki prejeli poleg VPA, podatkovna baza Lexicomp izpostavi le 3 učinkovine, ki lahko vplivajo na plazemsko koncentracijo VPA. V sočasni terapiji nismo zasledili pomembnih induktorjev ali inhibitorjev njene presnove. Prav tako nihče izmed bolnikov ni sočasno prejel učinkovin, ki bi z VPA vstopale v interakcijo tipa X.

VPA in acetilsalicilno kislino so sočasno prejeli trije bolniki. Podatkovna baza Lexicomp to interakcijo uvršča v kategorijo C in svetuje spremljanje zdravljenja. Sočasna terapija namreč poveča delež proste VPA, poveča učinek VPA in obenem tveganje za pojav NU (41). V našem primeru sta dva izmed bolnikov poročala o nespečnosti, eden pa je bil brez NU.

Kombinacijo VPA in risperidona so prejeli štiri bolniki. Mehanizem potencialne interakcije med učinkovinama ni znan, v nekaterih študijah so zgolj poročali o višjih, v drugih pa o nižjih koncentracijah VPA v primeru sočasne terapije. Klinična študija na 22 bolnikih sprememb v koncentracijah ni pokazala (41). V naši raziskavi znotraj te skupine bolnikov nismo opazili posebnosti.

Lexicomp navaja opozorilo, da lahko klonazepam poveča plazemsko koncentracijo VPA (41). To kombinacijo je prejel le en bolnik, pri katerem pa nismo opazili nepričakovanih koncentracij VPA.

5 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo uspešno optimizirali metodi za določanje VPA v plazmi in posušenih krvnih madežih z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Metodi sta selektivni, linearni, točni in ponovljivi. Plazemska metoda je primerna za določanje koncentracij VPA v območju od 5-200 $\mu\text{g/mL}$, v DBS vzorcih pa lahko določamo koncentracije od 2,5 do 200 $\mu\text{g/mL}$. Dokazali smo, da sta obe kromatografski metodi za določanje VPA primerljivi z imunološko, ki je v praksi široko uporabljana. Vrednosti meritev kromatografske plazemske metode od imunoloških odstopajo za 13%, v povprečju pa daje kromatografska metoda za 0,26 $\mu\text{g/mL}$ nižje rezultate. Tudi metoda za določanje VPA v posušenih krvnih madežih je primerna za uporabo v praksi, saj smo dokazali, da lahko iz DBS koncentracij dobimo plazemske s preprostim preračunom. Na ta način določene vrednosti od meritev imunološke metode odstopajo za 5%, rezultati pa so v povprečju za 1,20 $\mu\text{g/mL}$ nižji. S primerjavo plazemskih in DBS koncentracij VPA smo potrdili predpostavko, da se VPA slabo porazdeljuje v krvne celice. Izračunali smo vrednost porazdelitvenih koeficientov R (0,63) in K (0,088), pri čemer so eksperimentalno določene vrednosti povsem primerljive s tistimi iz literature.

Metodo za določanje 4-en VPA v plazmi smo optimizirali za merjenje koncentracij med 0,5 in 20 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracije presnovka smo v plazmi bolnikov uspešno določili, pri čemer pa korelacije med 4-en VPA in vrednostmi serumskih aminotransferaz nismo uspeli potrditi. Povišane vrednosti ALT sta imela le 2 bolnika, kar je precej manj, kot bi pričakovali glede na podatke iz literature, zato sklepamo, da v PBI ustrezno spremljajo bolnike na terapiji z VPA.

Pri analizi vzorcev bolnikov smo ugotovili, da povprečna plazemska koncentracija VPA znaša 60 $\mu\text{g/mL}$, kar šest bolnikov pa je imelo koncentracijo pod spodnjo mejo referenčnega območja. Eden izmed bolnikov VPA ni jemal, kar je skladno z ugotovitvami, ki opozarjajo na slabšo vodljivost bolnikov s psihiatričnimi motnjami in potrjuje smiselnost izvajanja TDM. Le slaba četrtina obravnavanih bolnikov je imela diagnozo BM, pri ostalih gre za "off-label" uporabo, ki je tudi glede na objavljene podatke zelo pogosta. Neželeni učinki so se pojavljali pri polovici bolnikov, pri čemer pa nismo uspeli potrditi povezave med pojavnostjo neželenih učinkov in plazemsko koncentracijo VPA ali 4-en VPA, prav tako NU ne korelirajo z odmerkom VPA. Sklepamo, da so bolniki primerno vodeni.

6 LITERATURA

- 1 Tomson T, Battino D, Perucca E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol.* 2016; 15(2): 210-218
- 2 Činčárová L, Zdráhal Z, Fajkus J. New perspectives of valproic acid in clinical practice. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013; 22: 1535-47
- 3 Cipriani A, Reid K, Young AH, Macritchie K, Geddes J. Valproic acid, valproate and divalproex in the maintenance treatment of bipolar disorder. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 10: CD003196
- 4 Terbach N, Williams RS. Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37: 1126-32
- 5 Haddad PM, Das A, Ashfaq M, Wieck A. A review of valproate in psychiatric practice. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009; 5: 539-51
- 6 Ponovni pregled uporabe valproata v nosečnosti ter pri ženskah v rodni dobi. <https://www.jazmp.si/obvestilo/news/detail/News/ponovni-pregled-uporabe-valproata-v-nosečnosti-ter-pri-ženskah-v-rodni-dobi/> Dostopano 15.4.2017
- 7 Dutta S, Reed RC. Distinct absorption characteristics of oral formulations of valproic acid/divalproex available in the United States. *Epilepsy Res.* 2007; 73: 275-83
- 8 Povzetek glavnih značilnosti zdravila Depakine Chrono. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/485662C582D0E2C9C12579C2003F4CEA/\\$File/s-016666.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/485662C582D0E2C9C12579C2003F4CEA/$File/s-016666.pdf) Dostopano 17.2.2017
- 9 Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, Fric M, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Jaquenoud Sirot E, Kirchherr H, Laux G, Lutz UC, Messer T, Müller MJ, Pfuhlmann B, Rambeck B, Riederer P, Schoppek B. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011; 44: 195-235

- 10 Milosheska D, Grabnar I, Vovk T. Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment. *Eur J Pharm Sci.* 2015; 75: 25-39
- 11 Silva MF, Aires CC, Luis PB, Ruiter JP, IJlst L, Duran M, Wanders RJ, Tavares de Almeida I. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31: 205-16
- 12 Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, Altman RB, Klein TE. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2013; 23: 236-41
- 13 G, Rosenberg. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 2090-103
- 14 Cousins DA, Butts K, Young AH. The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2009; 11: 787-806
- 15 Dietch, D. Recognising Bipolar Disorders in Primary Care. *Psychiatr Danub.* 2015; 27 Suppl 1: S188-94
- 16 Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet* 2013; 381: 1672-82
- 17 BALANCE investigators and collaborators, Geddes JR, Goodwin GM, Rendell J, Azorin JM, Cipriani A, Ostacher MJ, Morriss R, Alder N, Juszczak E. Lithium plus valproate combination therapy versus monotherapy for relapse prevention in bipolar I disorder (BALANCE): a randomised open-label trial. *Lancet* 2010; 375: 385-95
- 18 Horowitz E, Bergman LC, Ashkenazy C, Moscona-Hurvitz I, Grinvald-Fogel H, Magnezi R. Off-Label Use of Sodium Valproate for Schizophrenia. *PLoS One* 2014; 9: e92573
- 19 Tseng PT, Chen YW, Chung W, Tu KY, Wang HY, Wu CK, Lin PY. Significant Effect of Valproate Augmentation Therapy in Patients With Schizophrenia: A Meta-analysis Study. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e2475
- 20 Wang Y, Xia J, Helfer B, Li C, Leucht S. Valproate for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 11: CD004028

- 21 Borderline personality disorder: recognition and management. National Institute for Health and Clinical Excellence 2009 nice.org.uk/guidance/cg78
Dostopano 2.4.2017
- 22 Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *J Biomed Biotechnol.* 2010; pii: 479364
- 23 Nanau RM, Neuman MG. Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clin Biochem.* 2013; 46: 1323-38
- 24 Amini-Shirazi N, Ghahremani MH, Ahmadkhaniha R, Mandegary A, Dadgar A, Abdollahi M, Shadnia S, Pakdaman H, Kebriaeezadeh A. Influence of CYP2C9 polymorphism on metabolism of valproate and its hepatotoxin metabolite in Iranian patients. *Toxicol Mech Methods* 2010; 20: 452-7
- 25 Bai X, Hong W, Cai P, Chen Y, Xu C, Cao D, Yu W, Zhao Z, Huang M, Jin J. Valproate induced hepatic steatosis by enhanced fatty acid uptake and triglyceride synthesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017; 324: 12-25
- 26 Sugimoto T, Muro H, Woo M, Nishida N, Murakami K. Valproate metabolites in high-dose valproate plus phenytoin therapy. *Epilepsia* 1996; 37: 1200-3
- 27 Siemes H, Nau H, Schultze K, Wittfoht W, Drews E, Penzien J, Seidel U. Valproate (VPA) metabolites in various clinical conditions of probable VPA-associated hepatotoxicity. *Epilepsia* 1993; 34: 332-46
- 28 Hiemke, C. Clinical utility of drug measurement and pharmacokinetics: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008; 64: 159-66
- 29 Schütze G, Schwarz M. Therapeutic Drug Monitoring for individualised risk reduction in psychopharmacotherapy. *Trends in Analytical Chemistry* 2016; 84: 14–22
- 30 Mercolini L, Saracino MA, Protti M. Current advances in biosampling for therapeutic drug monitoring of psychiatric CNS drugs. *Bioanalysis* 2015; 7: 1925-42
- 31 Plesničar BK, Plesničar A. Therapeutic drug monitoring and pharmacogenetics--is this a way towards creative psychopharmacotherapy? *Psychiatr Danub.* 2014; 26: 96-9

- 32 Mitchell, Philip B. Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. *Br J Clin Pharmacol.* 2000; 49: 303–312
- 33 Conca A, Schmidt E, Pastore M, Hiemke C, Duffy D, Giupponi G. Therapeutic drug monitoring in Italian psychiatry. *Pharmacopsychiatry* 2011; 44: 259-62
- 34 Dasgupta A, Datta P. Analytical Techniques for Measuring Concentrations of Therapeutic Drugs in Biological Fluids. *Handbook of Drug Monitoring Methods: Therapeutics and Drugs of Abuse* 2008; pp. 67-86
- 35 Martial LC, Aarnoutse RE, Mulder M, Schellekens A, Brüggemann RJ, Burger DM, Schene AH, Batalla A. Dried Blood Spot sampling in psychiatry: Perspectives for improving therapeutic drug monitoring. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2017; 27: 205-216
- 36 Patsalos PN, Berry DJ. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva. *Ther Drug Monit.* 2013; 35 :4-29
- 37 Carlsson S, Olsson R, Lindkvist I, Beck O. Application of drug testing using exhaled breath for compliance monitoring of drug addicts in treatment. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015; 75: 156-61
- 38 Beznec, Tea. Razvoj enostavne analizne metode za terapevtsko spremljanje koncentracije valprojske kisline v posušenih krvnih madežih. Magistrska naloga, 2015
- 39 Kong ST, Lim SH, Lee WB, Kumar PK, Wang HY, Ng YL, Wong PS, Ho PC. Clinical validation and implications of dried blood spot sampling of carbamazepine, valproic acid and phenytoin in patients with epilepsy. *PLoS One* 2014; 9: e108190
- 40 Zhao M, Zhang T, Li G, Qiu F, Sun Y, Zhao L. Associations of CYP2C9 and CYP2A6 Polymorphisms with the Concentrations of Valproate and its Hepatotoxin Metabolites and Valproate-Induced Hepatotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017; 121: 138-143
- 41 Podatkovna baza Lexicomp - interakcije valproata z drugimi učinkovinami. Dostopano: 15.6.2016

PRILOGE

- **Priloga A:**
Optimizacija analiznih metod
- **Priloga B:**
Ocena etičnosti raziskave s strani Komisije za medicinsko etiko
- **Priloga C:**
Testni listi

A. Optimizacija analiznih metod

Preden smo pričeli z določanjem VPA in 4-en VPA v vzorcih bolnikov, smo poskusno analizirali nekaj slepih vzorcev, ki smo jih obogatili z znanimi koncentracijami analitov. Ugotovili smo, da izhodiščni metodi, ki ju je za določanje VPA in 4-en VPA leta 2015 uporabila Tea Beznec (38), ne dajeta primernih rezultatov. Težavo je predstavljala kolona, s katero nismo dosegli zadovoljive separacije analitov. Vzrok najverjetneje leži v številnih analizah, ki so bile v času od validacije izhodiščne metode do našega poskusa izvedene na isti koloni, kar se kaže s poslabšanjem njene separacijske sposobnosti. Na fakulteti nismo našli enake kolone, zato smo metodi sklenili optimizirati. Pri tem smo spreminjali tip stacionarne in mobilne faze, količino derivatizacijskih reagentov, derivatizacijske pogoje, pogoje elucije, spremenili pa smo tudi interni standard. V nadaljevanju je predstavljen postopek optimizacije metod.

Optimizacija metode določanja plazemskih koncentracij analitov

Izbor internega standarda

V številnih poskusih izvedbe kromatografske ločbe z uporabo različnih mobilnih in stacionarnih faz smo ugotovili, da pentanojska kislina, ki ima v izhodiščni plazemski metodi vlogo internega standarda, v našem primeru ni ustrezen IS. V območju retencijskega časa (t_R) pentanojske kisline se je eluirala koelucija, ki je onemogočala natančno kvantifikacijo površine. Testirali smo veliko različnih kombinacij stacionarnih in mobilnih faz, pretokov ter temperatur kolone (preglednica A.IV). Pentanojska kislina se v nobenem primeru ni izkazala za ustrezno. Na koncu smo se zato odločili za preizkus heksanojske kisline, za katero smo predvidevali, da bo imela daljši t_R in se posledično eluirala v območju, kjer je v slepem vzorcu manj vrhov. Poskus se je izkazal za uspešnega, saj smo le v primeru heksanojske kisline v vlogi IS našli metodo, s katero smo zadovoljivo določili koncentracije vseh analitov.

Optimizacija derivatizacije

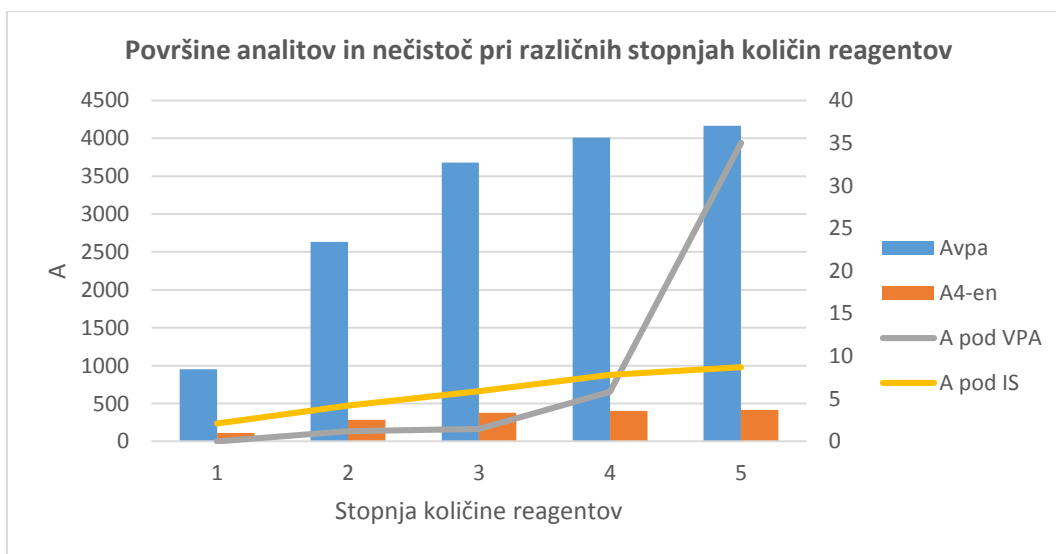
Optimizacija koncentracije derivatizacijskih reagentov

Opazili smo, da so površine vrhov naših analitov nižje, kot bi si želeli. Težave smo imeli predvsem pri poskusu kvantifikacije 4-en VPA na spodnji meji določljivosti. Obenem smo sklepali, da so lahko številne nečistoče, ki so vidne v slepem vzorcu, posledica neustreznih koncentracij derivatizacijskih reagentov. Odločili smo se za poskus, kjer smo spreminjali koncentracije reagentov, kot je predstavljeno v preglednici A.I.

Preglednica A.I: Različne stopnje koncentracij derivatizacijskih reagentov

Stopnja količine reagentov	1	2	3	4	5
Ckumarin [mg/mL]	0,82	3	6	9	12,3
CHOBt [mg/mL]	3,4	30	60	80	100
CEDC [mg/mL]	155,4	300	500	600	766

Slika A.1 prikazuje odvisnost površin analitov in nečistoč v slepem vzorcu od količine reagentov. Površine analitov najprej strmo naraščajo, med 4. in 5. stopnjo reagentov pa skoraj ni več opaziti razlik. Nasprotno velja za koelucije – pri 4. stopnji reagentov so njihove površine še sprejemljive, pri 5. stopnji pa že neprimerno visoke. Odločili smo se za 4. stopnjo reagentov (koncentracija kumarina 9 mg/mL, HOBt-a 80 mg/mL in EDC-ja 600 mg/mL).



Slika A.1: Površina analitov in nečistoč glede na količino reagentov

Količino derivatizacijskih reagentov smo želeli optimizirati tudi na ravni posameznega reagenta. V preglednici A.II so prikazani vsi testirani pogoji poskusa, v katerem smo variirali koncentracijo zgolj enega od reagentov

Preglednica A.II: Kombinacije derivatizacijskih reagentov

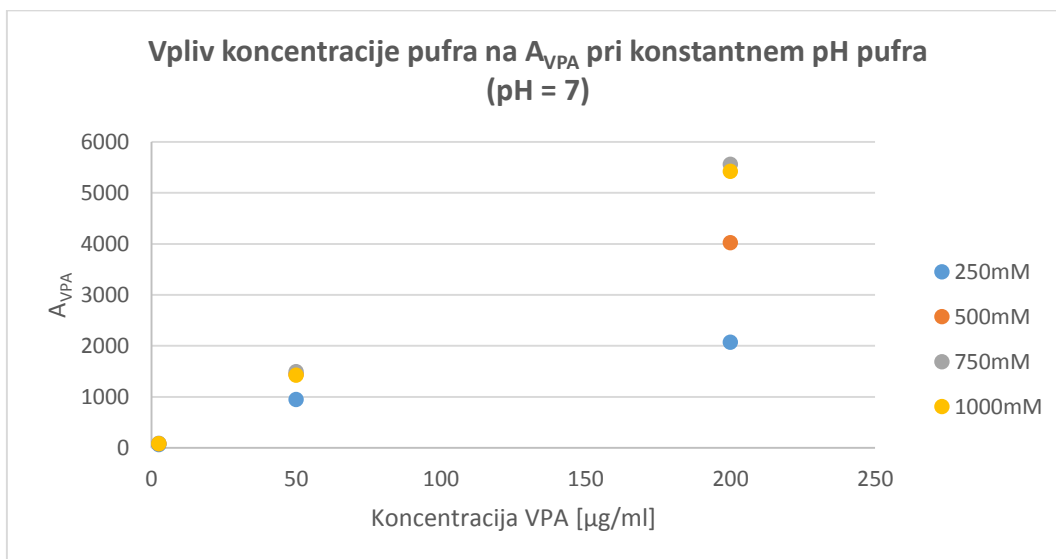
Ckumarin [mg/mL]	CHOBt [mg/mL]	CEDC [mg/mL]
9	80	600
9	80	100
9	80	400
9	80	800
9	80	1200
9	20	600
9	60	600
9	100	600
9	140	600
4	80	600
7	80	600
11	80	600
15	80	600

V poskusu smo ugotovili, da pri skrajnih vrednostih količin reagentov odzivi VPA niso več linearni, kar je najverjetneje posledica dejstva, da razmerja med količinami niso več optimalna. Pri manjši spremembi koncentracij pa bistvenih razlik nismo opazili. Z večanjem količine reagentov smo opazili tudi večanje površin koelucij v slepem vzorcu, zato smo sklenili ostati pri pogojih, izbranih v prejšnjem poskusu.

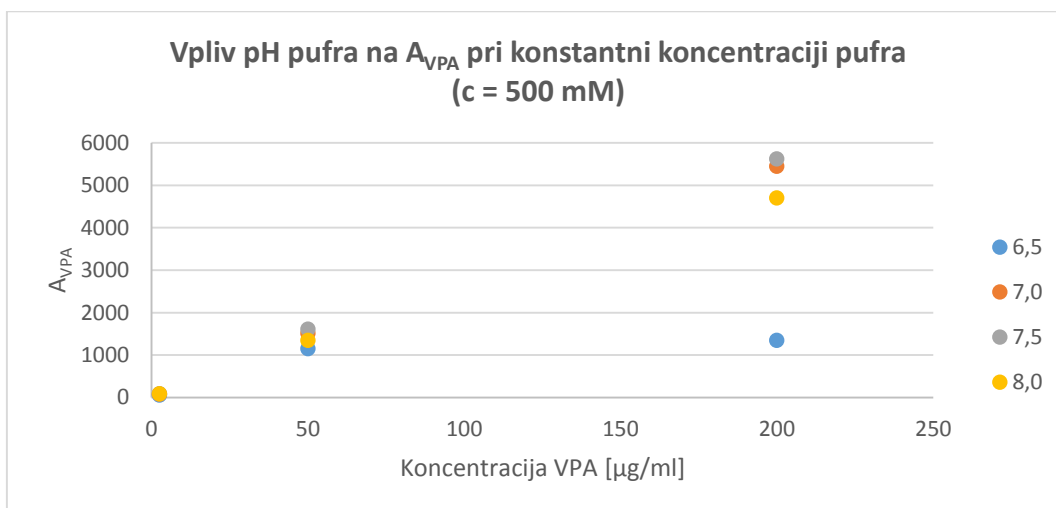
Koncentracija in pH reakcijskega pufra

Na potek reakcije derivatizacije smo poskušali vplivati tudi s spreminjanjem reakcijskih pogojev. Osredotočili smo se na reakcijski medij – fosfatni pufer. V ta namen smo pripravili puferske raztopine različnih koncentracij in pH ter izvedli reakcijo derivatizacije na vzorcih z nizko, srednjo in visoko koncentraciji VPA. V prvem poskusu smo spreminjali koncentracijo

pufra, v drugem pa njegov pH. Najvišje odzive smo dobili pri višjih koncentracijah pufra (750 in 1000 mM). Pri proučevanju vpliva pH pa smo ugotovili, da je nižji pH (6,5) za reakcijo neugoden, medtem ko med drugimi testiranimi pogoji ni bilo bistvenih razlik. Izbrali smo najbolj skrajne pogoje ($c = 1000 \text{ mM}$, $\text{pH} = 8$), saj je bila pri teh pogojih najboljša tudi linearnost meritev. Sliki A.2 in A.3 prikazujeta rezultate poskusa.



Slika A.2: Vpliv koncentracije pufra na A_{VPA} pri konstantnem pH pufra



Slika A.3: Vpliv pH pufra na A_{VPA} pri konstantni koncentraciji pufra

Izbor stacionarne in mobilne faze

V izhodiščni metodi je Tea Beznec (38) uporabila kolono Luna C18, ki pa se je v naših poskusih izkazala za neustrezno. V območju t_R 4-en VPA se je v slepem vzorcu koeluirala nečistoča, ki je onemogočala kvantifikacijo analita. Odločili smo se poiskati drugo kolono, s katero bi dosegli zadovoljivo ločbo. Lastnosti testiranih kolon so prikazane v preglednici A.III.

Preglednica A.III: Testirane kolone

Ime kolone	Stacionarna faza
Luna C18	C18 skupine, zaestrene s TMS
Luna C8	C8 skupine, zaestrene s TMS
Zorbax Eclipse XDB-18	C18 skupine, zaestrene s TMS
Luna Phenyl-Hexyl	Fenilheksilne skupine, zaestrene s TMS

Na izbranih kolonah smo testirali več mobilnih faz različne sestave in pH. S spreminjanjem pH smo želeli vplivati na ionizacijo iskanih analitov in drugih snovi v vzorcu in posledično na njihovo ločbo. Spreminjali smo tudi pretok in temperaturo kolone. Večina testiranih kombinacij je prikazanih v preglednici A.IV.

V procesu iskanja ustreznih kromatografskih pogojev ločbe smo želeli zagotoviti optimalno ločbo obeh analitov in internega standarda. Težavo nam je predstavljal predvsem 4-en VPA, ki je v bioloških vzorcih prisoten v zelo nizkih koncentracijah, zato je že majhna nečistoča v slepem vzorcu, ki se eluira ob enakem času, onemogočala točno določitev koncentracije. Poleg tega je vrh 4-en VPA neprestano spremljala koelucija, zaradi katere smo imeli težave tudi z zagotavljanjem ustrezne separacije. Želeli smo doseči ustrezen resolucijski faktor ($R_S > 2$), ki je v kromatografiji merilo za ustreznost ločbe dveh sosednjih vrhov.

Poleg tega smo želeli razviti metodo, čim prijaznejšo do uporabnika in same naprave. Višje temperature in nizke pH-vrednosti namreč občutno skrajšajo življenjsko dobo kolone, zato smo težili k nižjim temperaturam in pH-vrednostim, višjim od 2. Obenem smo želeli skrajšati čas analize in tako metodo narediti primernejšo za rutinsko rabo.

Preglednica A.IV: Testirane kombinacije pogojev kromatografske ločbe

Testirani pogoji					Parametri ločbe						
MF _A	MF _B	% MF _B	T [°C]	F [mL/min]	t _R VPA	t _R 4-en VPA	t _R PK	t _R HK	R _S 4-en VPA	A pod VPA [%]	A pod IS [%]
KOLONA LUNA C18											
1,5% AcOH (aq)	AcN	46	50	0,7	14,5	11,2	5,8		NS	/	NS
1,5% AcOH (aq)	AcN	46	55	0,7	14	10,8	5,7		1,83	/	NS
1,5% AcOH (aq)	AcN	46	60	0,7	13,5	10,4	5,5		2,17	/	NS
0,1% HCOOH (aq)	AcN	46	50	0,7	15,1	11,5	5,9		NS	/	15
0,1% HCOOH (aq)	AcN	46	55	0,7	14,6	11,2	5,8		NS	NS	NS
0,1% HCOOH (aq)	AcN	46	60	0,7	14,1	10,8	5,7		2,00	/	6,3
H ₃ PO ₄ (aq) (pH=2)*	AcN	46	50	0,7	15	11,5	5,9		NS	/	/
H ₃ PO ₄ (aq) (pH=2)*	AcN	46	55	0,7	14,5	11,2	5,8		NS	/	NS
H ₃ PO ₄ (aq) (pH=2)*	AcN	46	60	0,7	14	10,8	5,6		1,95	/	NS
H ₂ O	AcN	46	60	0,7	15,2	11,6	5,9		NS	/	9,3
KOLONA LUNA PHENYL HEXYL											
H ₂ O	AcN	46	50	0,7	H ₂ O kot MF ni ustrezna – vrhovi niso separirani						
H ₂ O	AcN	42	50	0,7							
H ₂ O	ACN/MeOH 1:1	60	50	0,7							
H ₂ O	ACN/MeOH 1:1	50	50	0,7							
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 1:1	44	55	0,7	23,2	18,2	9,1		NS	10,4	3,2
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 1:1	46	55	0,7	19,3	15,4	8,1		NS	/	4,1
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 1:1	48	55	0,7	16,2	13,2	7,3		2,30	NS	NS
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 1:1	50	55	0,7	13,8	11,2	6,6		K	K	K

HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 2:8	52	55	0,7	20	16	8,9		NS	/	NS
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 2:8	54	55	0,7	vrhova IS in 4-en VPA koeluirata in se z višanjem deleža org. topil povsem združita						
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 2:8	56	55	0,7							
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 2:8	58	55	0,7							
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 2:8	60	55	0,7							
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 1:1	46	55	0,7	21,2	16,7	8,6	vrh VPA je nesimetričen	K	7,2	K
HCOOH (aq) (pH=2)*	ACN/MeOH 1:1	48	55	0,7	17,7	14,3	7,7		NS	NS	9
HCOOH (aq) (pH=3)*	ACN/MeOH 1:1	46	55	0,7	23,5	18,6	9,2		1,79	/	K
HCOOH (aq) (pH=3)*	ACN/MeOH 1:1	48	55	0,7	19,3	15,4	8,1		NS	NS	K
25 mM AcONH4 (pH=4)	ACN/MeOH 1:1	46	55	0,7	22,6	17,9	9		2,00	/	K
25 mM AcONH4 (pH=4)	ACN/MeOH 1:1	48	55	0,7	18,8	15,1	8		NS	NS	10
25 mM AcONH4 (pH=4)	ACN/MeOH 1:1	46	60	0,7	21	16,7	8,6		NS	/	10
25 mM AcONH4 (pH=4)	ACN/MeOH 1:1	46	55	1	15,6	12,3	6,2		2,14	/	9,2
25 mM AcONH4 (pH=4)	ACN/MeOH 1:1	46	60	1	14,5	11,5	5,9		NS	/	11
25 mM AcONH4 (pH=4)	ACN/MeOH 1:1	46	55	1,3	12	9,5	4,8		2,18	/	12
25 mM AcONH4 (pH=4)	ACN/MeOH 1:1	46	55	1,5	10,3	8,2	4,1		2,30	/	13
KOLONA ZORBAX ECLIPSE XDB-C18											
H2O	AcN	46	50	0,7	H2O kot MF ni ustrezna – vrhovi niso separirani						
H2O	AcN	44	50	0,7							
H2O	AcN	42	50	0,7							
H2O	AcN	42	55	0,7							
H3PO4 (aq) (pH=2)*	AcN	42	55	0,7	15	11,2	5,3		1,71	2	NS
HCOOH (aq) (pH=3.2)*	AcN	42	55	0,7	15,1	11,2	5,4		NS	2	5
AcOH (aq) (pH=3.2)*	AcN	42	55	0,7	14,9	11,1	5,3		1,85	2	6
25 mM NH4OAc (pH=3)	AcN	42	55	0,7	12,1	9,2	4,8		K	6,2	K
25 mM NH4OAc (pH=3,5)	AcN	42	55	0,7	14,3	10,7	5,2		1,71	/	2,4

25 mM NH ₄ OAc (pH=4)	AcN	42	55	0,7	15,1	11,2	5,4		K	/	3,5
25 mM NH ₄ OAc (pH=4,5)	AcN	42	55	0,7	15,2	11,4	5,4		NS	/	3,4
25 mM NH ₄ OAc (pH=5)	AcN	42	55	0,7	15,3	11,4	5,4		NS	/	3,3
HCOOH (aq) (pH=2)*	AcN	42	55	0,7	13,9	10,4	5,1		2,12	/	2,6
HCOOH (aq) (pH=2)*	AcN	42	60	0,7	13,3	10	5		2,4	/	NS
HCOOH (aq) (pH=3)*	AcN	42	55	0,7	15,3	11,4	5,4		NS	/	4,9
HCOOH (aq) (pH=3)*	AcN	42	60	0,7	14,7	11	5,3		1,80	/	4,7
HCOOH (aq) (pH=2)*	AcN	42	50	0,7	15,2	11,3	5,9		1,41	K	NS
HCOOH (aq) (pH=2)*	AcN	42	45	0,7	15,9	11,7	5,6		NS	2,5	K
HCOOH (aq) (pH=2)*	AcN	42	40	0,7	16,5	12,2	5,7		NS	3,8	K
KOLONA LUNA C8											
H ₃ PO ₄ (aq) (pH=2)*	AcN	40	55	0,7	15,4	13,1		8,9	1,92	2	NS
HCOOH (aq) (pH=2)*	AcN	40	55	0,7	15,4	12,0		9,0	K	/	5,4
20 mM NH ₄ OAc (pH=5)	AcN	40	55	0,7	15,4	12,0		9,0	1,97	/	12
20 mM NH ₄ OAc (pH=4)	AcN	40	50	0,7	16,2	12,8		9,6	2,34	/	13,8
20 mM NH ₄ OAc (pH=4)	AcN	40	50	1	11,5	9,1		6,8	2,32	/	13,6
20 mM NH ₄ OAc (pH=4)	AcN	40	50	1,5	7,6	6		4,5	2,32	/	NS
20 mM NH ₄ OAc (pH=4)	AcN	38	50	1,5	8,2	6,5		4,9	K	/	10
20 mM NH ₄ OAc (pH=4)	AcN	36	50	1,5	10,9	8,6		6,5	K	/	NS
20 mM NH ₄ OAc (pH=4)	AcN	36→40	50	1,5	9,2	8		5,8	1,96	/	10
20 mM NH ₄ OAc (pH=4)	AcN	38→40	50	1,5	8,7	6,9		5,1	2,32	/	10

* vodno fazo smo do ustreznega pH nakisali s titriranjem z navedeno kislino

PK = pentanojska kislina

HK = heksanojska kislina

F = pretok

R_{S 4-en VPA} = resolucijski faktor med vrhom 4-en VPA in vrhom njegove koelucije

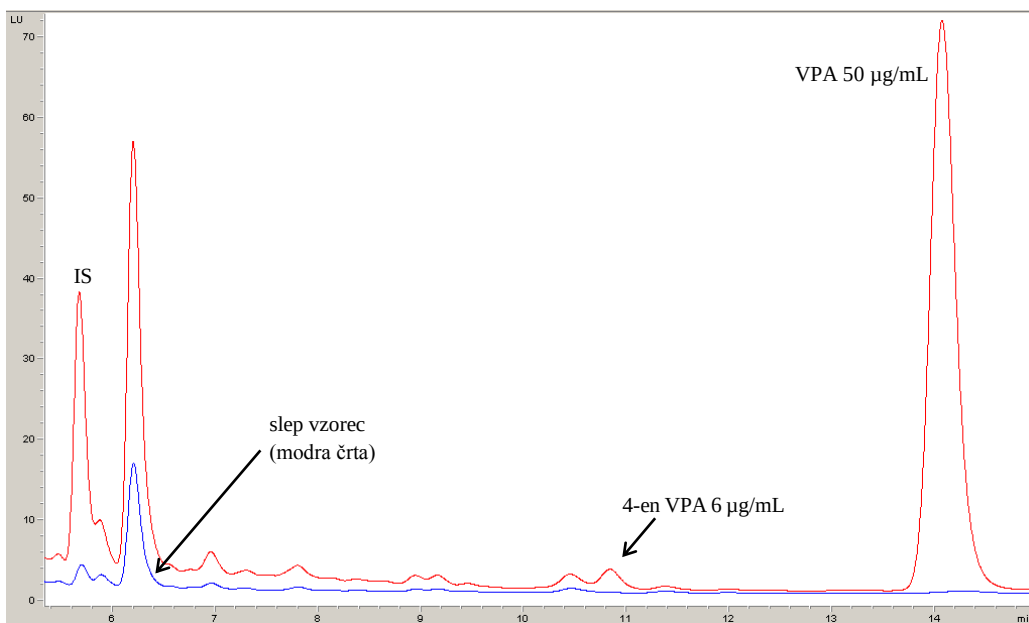
NS = sosednja vrhova nista zadovoljivo separirana (R_s < 1,3)

K = koelucija; površina nečistoče v slepem vzorcu predstavlja > 20% površine analita

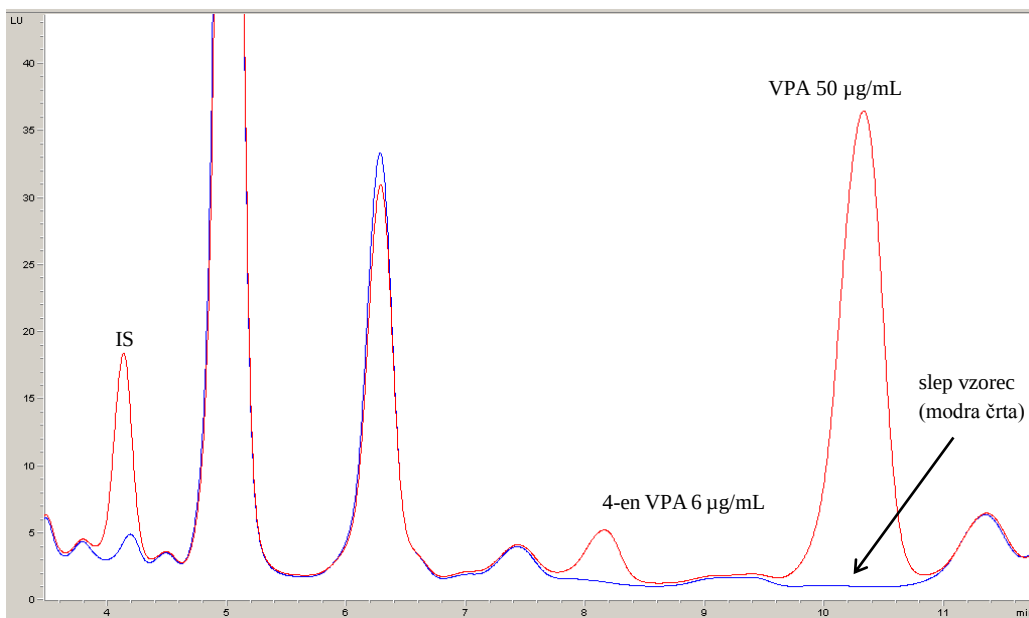
A pod VPA = delež nečistoč v slepem vzorcu glede na površino vrha VPA 50 µg/mL

A pod IS = delež nečistoč v slepem vzorcu glede na površino internega standarda

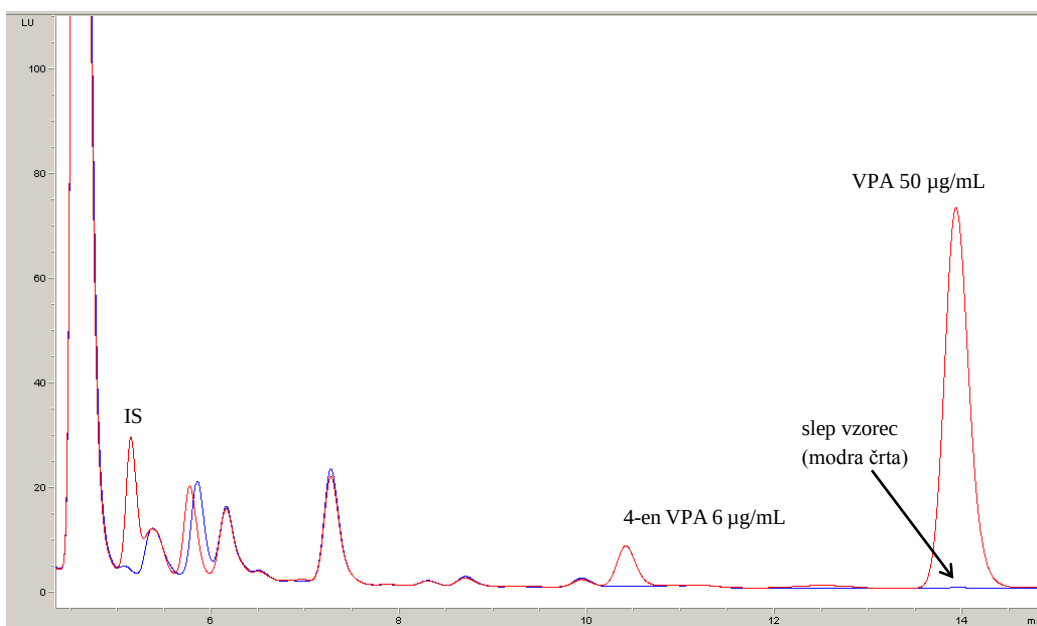
V preglednici A.IV so pri vsaki izmed testiranih kolon s temnejšo barvo označeni pogoji, ki so se na posamezni koloni izkazali za najustrežnejše. Kromatogrami ločb pri teh pogojih so prikazani na slikah A.4 - A.6. Pri nobeni izmed teh kolon s separacijo nismo bili popolnoma zadovoljni, na koncu smo se tako odločili za kolono Luna C8, kjer smo ustrezno ločbo vseh analitov dosegli z izvedbo gradientne elucije.



Slika A.4: Kromatogram najbolj optimalne ločbe na koloni Luna C18



Slika A.5: Kromatogram najbolj optimalne ločbe na koloni Luna Phenyl Hexyl



Slika A.6: Kromatogram najbolj optimalne ločbe na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18

Optimizacija metode določanja koncentracij VPA v posušeni krvnih madežih

Izbor stacionarne faze

Med optimizacijo plazemske metode smo se odločili, da pri prenosu metode iz plazemskih na DBS vzorce ostanemo kar pri koloni, ki je bila najustreznejša za analizo plazemskih vzorcev. Optimizacijo DBS metode smo torej izvajali na koloni Luna C8.

Izbor internega standarda

Pri izvajanju analiz poskusnih DBS vzorcev smo ugotovili, da korekcija z IS ne izboljša točnosti meritev, kar je sicer glavni namen uporabe IS. Odločili smo se preizkusiti nekaj spojin, dostopnih na fakulteti, ki imajo v svoji strukturi karboksilno skupino. Pri poskusih smo uporabljali mobilno fazo, ki smo jo izbrali pri plazemski metodi. Vse kandidate za IS smo testirali pri štirih različnih deležih acetonitrila (AcN) v mobilni fazi. V preglednici A.V je za vsako testirano kombinacijo navedeno, ali se je izkazala za ustrezno.

Preglednica A.V: Testirane spojine v procesu izbora IS

spojina	36% AcN	38% AcN	40% AcN	42% AcN
pentanojska kislina	ustrezna	NS	NS	ustrezna
heksanojska kislina	NS	NS	NS	NS
heptanojska kislina	NS	NS	NS	NS
oktanojska kislina	dolg t_R (15 min)	ustrezna	NS	NS
benzojska kislina	NS	NS	ustrezna	NS
5-metilsalicilna kislina	prenizek odziv	prenizek odziv	prenizek odziv	prenizek odziv
cikloheksankarboksilna kislina	K	K	K	NS
2-bromobenzojska kislina	ustrezna	ustrezna	K	NS

NS = ni zadovoljive separacije med sosednjima vrhovoma (resolucijski faktor; $R_s < 1,4$)

K = koelucija; površina v slepem vzorcu predstavlja > 20% površine analita

Za nadaljnja testiranja smo izbrali 4 kombinacije, ki so se nam zdele najustreznejše. Benzojske kisline nismo izbrali za nadaljnje poskuse, ker je imela od vseh potencialno ustreznih spojin največji delež koelucij. 2-bromobenzojsko kislino smo po analizi dveh umeritvenih krivulj in izračunu linearnosti izločili, saj smo ugotovili, da ne izboljša točnosti rezultatov. Na koncu smo izbirali med pentanojsko in oktanojsko kislino. Izbrali smo slednjo, saj se v bližini t_R oktanojske kisline eluira bistveno manj spojin, ki bi ob morebitnih drobnih spremembah t_R onemogočale analizo.

Izbor mobilne faze

V fazi izbora mobilne faze smo se odločili testirati nekaj pufrov, ki smo jih uporabili že v procesu optimizacije plazemske metode. Za izvedbo poskusa smo izbrali nekoliko višji odstotek acetonitrila (45%), saj smo želeli metodo čim bolj pospešiti. Pri tem deležu smo spreminjali vrsto in pH pufr. V preglednici A.VI so zbrane površine koelucij pod analitoma pri različnih pogojih. Najustreznejša MF je 20 mM amonijev acetat s pH 4.

Preglednica A.VI: Preiskovane mobilne faze in površine koelucij pod analitoma

MF	$A_{\text{slepi vzorec}}/A_{\text{VPA}} [\%]$	$A_{\text{slepi vzorec}}/A_{\text{IS}} [\%]$
H ₃ PO ₄ (aq) pH=2	42,0	1,8
HCOOH (aq) pH=3	51,0	1,7
10 mM amonijev acetat pH=3	15,1	1,3
20 mM amonijev acetat pH=4	8,6	1,2
20 mM amonijev acetat pH=5	ni zadovoljive separacije	1,3

Selektivnost metode

V zadnjem koraku optimizacije metode smo se želeli prepričati, da morebitne učinkovine, ki jih bolniki jemljejo sočasno z VPA, ne bodo motile določitve analitov. V ožji izbor smo vključili učinkovine, ki so se v obdobju enega leta najpogosteje pojavile v sočasni terapiji bolnikov na terapiji z VPA, hospitaliziranih v PBI. Seznam je obsegal 78 učinkovin.

S seznama smo izločili vse učinkovine, ki v svoji strukturi nimajo –COOH skupine. Ta je namreč nujna za izvedbo reakcije derivatizacije, pri kateri se med aminske skupino kumarinskega reagenta in –COOH skupino analita tvori amidna vez. V naslednjem koraku smo izločili učinkovine, ki imajo v strukturi aminske skupine, ki se pri pH ~ 2 protonira. Postopek analize namreč zahteva izvedbo ekstrakcije analita iz nakisane vodne faze v organsko fazo, zato bi morebitne spojine s protoniranimi aminskimi skupinami na tej stopnji ostale v vodni fazi in tako ne bi motile analize.

Po izločitvi vseh navedenih učinkovin je ostalo le pet učinkovin, ki so zbrane v preglednici A.VII. Pripravili smo vodne raztopine izbranih učinkovin v množinski koncentraciji, ki ustreza 200 µg/mL VPA. Izmed vseh učinkovin sta se eluirala le naproksen in acetilsalicilna kislina, njun t_R pa ni bil v območju nobenega izmed naših analitov.

Preglednica A.VII: Testirane učinkovine in njihovi retencijski časi

učinkovina	t_R [min]
naproksen	3.3
diklofenak	se ne eluira
acetilsalicilna kislina	4.4
gemfibrozil	se ne eluira
atorvastatin	se ne eluira

B. Ocena etičnosti raziskave



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE

Štefanova ulica 5, 1000 Ljubljana

T: 01 478 60 01
F: 01 478 60 58
E: gp.mz@gov.si
www.mz.gov.si

Podpisnik: Božidar Voljč
Izdajatelj: Republika Slovenija
Serijska številka: b4 b6 58 be 00 00 00 00 56 7b e7 4d
Datum podpisa: 08:55, 21.12.2016
Referenčna številka: 0120-381/2016/2

Izr. prof. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.
Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko
Fakulteta za farmacijo
Aškerčeva cesta 7
1000 Ljubljana

Številka: 0120-381/2016-2
KME 58/07/16
Datum: 7. september 2016
Zadeva: Ocena etičnosti raziskave

Spoštovani gospod prof. dr. Vovk,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 8. 7. 2016 poslali vlogo za oceno etičnosti predloga raziskave z naslovom

"Terapevtsko spremljanje koncentracij valprojske kisline in njenega presnovka z različnimi analiznimi metodami pri bolnikih s psihiatričnimi obolenji". Sodelovali bodo raziskovalci Psihiatrične bolnišnice Idrija in Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Raziskava bo vključena v magistrsko delo študentke enovitega magistrskega študija farmacije Kaje Gantar, mentor: izr. prof. dr. Tomaž Vovk, somentorica: Cvetka Bačar Bole, mag. farm., spec. klin. farm.

KME je na seji 19. julija 2016 ocenila, da je predložena raziskava etično sprejemljiva, in vam s tem izdaja svoje soglasje za njeno izvedbo.

Lepo pozdravljam,

Pripravil:
Tone Žakelj

dr. Božidar Voljč, dr. med.,
predsednik KME

P.S.: Pri morebitnih nadaljnjih dopisih v zvezi z raziskavo se obvezno sklicujte na številki tega dopisa.

C. Testni listi

Klinična raziskava: Terapevtsko spremljanje valprojske kisline - 2017

PREISKOVANEC

IDENTIFIKACIJSKA ŠTEVILKA: _ _ _ _ _

ZAČETNICA IMENA IN PRIIMKA: _ _

TESTNI LISTI

Klinična raziskava

TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJ VALPROJSKE KISLINE IN NJENEGA PRESNOVKA Z RAZLIČNIMI ANALIZNIMI METODAMI PRI BOLNIKI S PSIHIATRIČNIMI BOLENJI

1. Vključitveni kriteriji:

- bolniki, ki se zdravijo z valprojsko kislino
- bolniki, ki so napoteni na rutinski odvzem krvi z namenom terapevtskega spremljanja koncentracij
- starejši od 18 let
- bolniki obeh spolov
- bolniki, ki bodo svoj pristanek za sodelovanje in seznanjenost s potekom raziskave potrdili s podpisom informiranega pristanka

2. Bolnikom, ki so vključeni v raziskavo, je potrebno predstaviti namen raziskave.

3. Bolniku izročite en izvod „Izjave o zavestni in svobodni privolitvi sodelujoče osebe v raziskavi“. V izvod, ki je na koncu Testnih listov, se morata podpisati oba – raziskovalec in preiskovanec.

4. Ključnega pomena je zabeležiti čas odvzema krvi.

Klinična raziskava: Terapevtsko spremljanje valprojske kisline - 2017

A. Datum

Datum: ____ ____ ____ ____
D M L

B. Starost preiskovanca

Datum rojstva: ____ ____ ____ ____
D M L

C. Spol preiskovanca

Spol: M Ž

D. Telesna teža preiskovanca

Telesna teža (kg): _____

E. Telesna višina preiskovanca

Telesna višina (m): _____

F. Indeks telesne mase

Indeks telesne mase (kg/m²): _____

G. Diagnoza / šifra po ICD-10/DSM-5

Diagnoza : _____

Šifra bolezni: _____

H. Podatki o trajanju terapije z valprojsko kislino:

A Ob sprejemu je bolnik prejemal VPA;
vzorec krvi je bil odvzet ____ dan po hospitalizaciji (dan:mesec:leto ____:____:____)

B Ob hospitalizaciji bolnik ni imel predpisane terapije z VPA;
zdravljenje z VPA je bilo uvedeno ____ dan hospitalizacije (dan:mesec:leto ____:____:____);
vzorec krvi je bil odvzet ____ dan po hospitalizaciji (dan:mesec:leto ____:____:____)

C Bolnik ni hospitaliziran

Klinična raziskava: Terapevtsko spremljanje valprojske kisline - 2017

I. Dnevni odmerek valprojske kisline

Ime zdravila	Celokupni dnevni odmerek (mg/dan)	Režim jemanja
_____	_____	_____
_____	_____	_____

J. Druga zdravila

Ime	Dnevni odmerek (mg/dan)
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

K. NEŽELENI UČINKI (po kliničnem vtisu)

	Prisotnost
Slabost	
Bruhanje	
Glavobol	
Nespečnost	
Somnolenca	
Omotica, vrtoglavica	
Agitacija	
Alopecija	
Bolečine v abdomnu	
Dispepsija	
Diareja	
Anoreksija	
Tremor	
Diplopija in druge motnje vida	
Zvečanje telesne mase	

Drugo: _____

Klinična raziskava: Terapevtsko spremljanje valprojske kisline - 2017

L. Čas zadnjega odmerka zdravila z valprojsko kislino

Ura (hh/mm) : _____

M. Čas odvzema krvi

Ura (hh/mm) : _____

N. Koncentracija valprojske kisline v serumu (metoda bolnišnice)

VPA (serum) ($\mu\text{mol/L}$) : _____

VPA (serum) ($\mu\text{g/mL}$) : _____

O. Koncentracija valprojske kisline v plazmi (metoda FFA)

VPA (plazma) ($\mu\text{g/mL}$) : _____

P. Koncentracija valprojske kisline v posušениh krvnih madežih

VPA (DBS) ($\mu\text{g/mL}$) : _____

R. Koncentracija 4-en VPA v plazmi (metoda FFA)

4-en VPA (plazma) ($\mu\text{g/mL}$) : _____

S. Hematokrit

Hematokrit (vodel) : _____

T. Koncentracija katalitične aktivnosti aspartat aminotransferaze v serumu

AST (serum) ($\mu\text{kat/L}$) : _____

Klinična raziskava: Terapevtsko spremljanje valprojske kisline - 2017

U. Koncentracija katalitične aktivnosti alanin aminotransferaze v serumu

ALT (serum) ($\mu\text{kat/L}$) : _____