



archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Praca oryginalna
Original paper

Jolanta Wilimowska¹, Małgorzata Kłys², Wojciech Jawień³

Analiza zmienności stężeń kwasu walproinowego oraz jego wybranych metabolitów w surowicy krwi pacjentów podczas terapii lekiem i w zatruciach

Analysis of variability of concentrations of valproic acid (VPA) and its selected metabolites in the blood serum of patients treated with VPA and patients hospitalized because of VPA poisoning

¹ Zakład Diagnostyki, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Polska

² Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska

³ Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska

¹ Department of Diagnostics, University Hospital in Krakow, Poland

² Chair and Department of Forensic Medicine, Jagiellonian University Collegium Medicum, Krakow, Poland

³ Department of Pharmacokinetics and Clinical Pharmacy, Jagiellonian University Collegium Medicum, Krakow, Poland

Streszczenie

Cel pracy: Porównanie profilu metabolicznego kwasu walproinowego (VPA) w badanych grupach przypadków poprzez analizę zmienności stężeń VPA z jego wybranymi metabolitami (2-en-VPA, 4-en-VPA, 3-keto-VPA).

Materiał do badań: Surowica krwi pochodząca od 27 pacjentów leczonych preparatami VPA na Oddziale Psychiatrii oraz Neurologii i Udarów Mózgu WSS im. Ludwika Rydygiera w Krakowie oraz surowica krwi 26 pacjentów z podejrzeniem ostrego zatrucia VPA, hospitalizowanych w Klinice Toksykologii Katedry Toksykologii i Chorób Środowiskowych UJ CM w Krakowie.

Wyniki i wnioski: Analiza wartości stężeń VPA i jego wybranych metabolitów dowodzi odmienności profilu metabolicznego VPA w ostrym zatruciu względem terapii lekiem.

Jedną z dróg przemian VPA – proces desaturacji – nie ulega zmianie w ostrym zatruciu i ma przewagę nad procesem β-oksydacji. Przyjęcie dawek toksycznych VPA skutkuje wzmożonym powstawaniem 4-en-VPA proporcjonalnym do zwiększenia stężenia VPA. W ostrym zatruciu VPA dochodzi do wysycenia przemian metabolicznych VPA na etapie β-oksydacji. Proces utleniania 2-en-VPA do 3-keto-VPA ulega zwolnieniu po dawkach toksycznych.

Słowa kluczowe: kwas walproinowy (VPA), profil metaboliczny, ostre zatrucie, terapia lekiem.

Abstract

Aim of the study: To compare the metabolic profile of valproic acid (VPA) in the studied groups of cases through an analysis of variability of concentrations of VPA with its selected metabolites (2-ene-VPA, 4-ene-VPA, 3-keto-VPA).

Study material: Blood serum samples collected from 27 patients treated with VPA drugs in the Psychiatry Unit and in the Neurology and Cerebral Strokes Unit at the Ludwik Rydygier Provincial Specialist Hospital in Krakow, and blood

serum samples collected from 26 patients hospitalized because of suspected acute VPA poisoning at the Toxicology Department, Chair of Toxicology and Environmental Diseases, Jagiellonian University Medical College in Krakow.

Results and conclusions: The analysis of concentrations of VPA and its selected metabolites has shown that the metabolic profile of VPA determined in cases of acute poisoning is different from cases of VPA therapy. One of VPA's metabolic pathways – the process of desaturation – is unchanged in acute poisoning and prevails over the process of β -oxidation. The ingestion of toxic VPA doses results in an increased formation of 4-ene-VPA, proportional to an increase in VPA concentration. Acute VPA poisoning involves the saturation of VPA's metabolic transformations at the stage of β -oxidation. The process of oxidation of 2-ene-VPA to 3-keto-VPA is slowed down after the ingestion of toxic doses.

Key words: valproic acid (VPA), metabolic profile, acute poisoning, VPA therapy.

Wprowadzenie

Pomimo upływu 50 lat od przeprowadzenia pierwszych prób klinicznych leczenia padaczki, kwas walproinowy (VPA) jest nadal powszechnie uznanym lekiem przeciwpadaczkowym pierwszego rzutu i jednym z najczęściej przepisywanych (w ponad 100 krajach). Skuteczność leczenia VPA, odzwierciedlona jego złożonym mechanizmem działania farmakologicznego, dotyczy chorób neurologicznych, w szczególności różnych postaci padaczki u dzieci i dorosłych, jak również chorób psychiatrycznych [1].

Na szczególną uwagę zasługuje złożony szlak metaboliczny, który obejmuje co najmniej pięć dróg metabolizmu (ryc. 1.), prowadzący do wytworzenia ok. 50 metabolitów o aktywności farmakologicznej, nieaktywnych oraz odpowiedzialnych za działania niepożądane lub toksyczne leku. Główne przemiany metaboliczne VPA zachodzą w komórkach wątroby w mitochondrium i cytozolu. Są to m.in. procesy utleniania, przebiegające przy udziale enzymów mikrosomalnych (desaturacja, ω -, ω_1 -, ω_2 -hydroksylacja), mitochondrialne procesy oksydacyjne (β -oksydacja) oraz mikrosomalne reakcje sprzężania z kwasem glukuronowym [1–3].

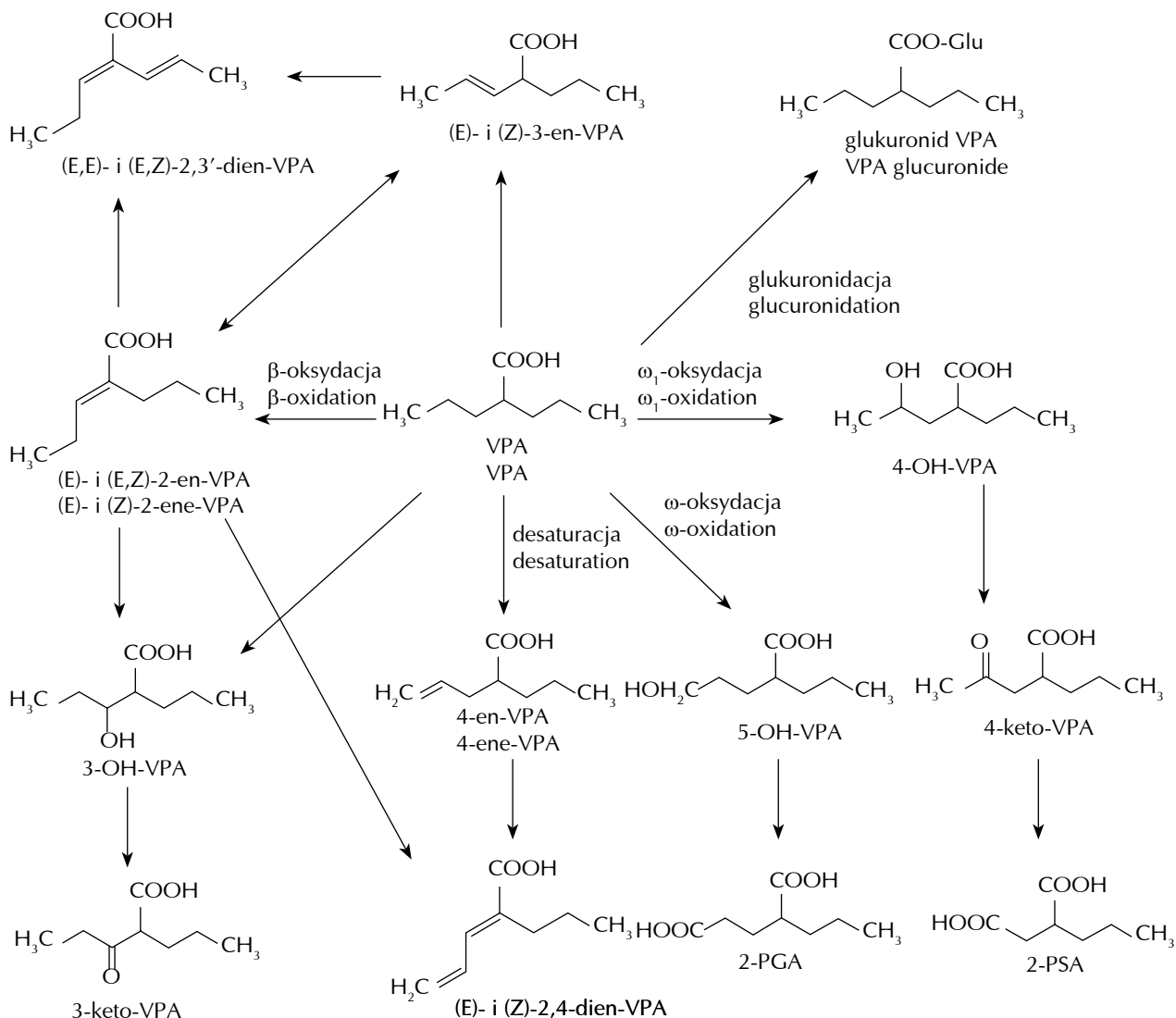
Pierwszy proces metaboliczny – β -oksydacja, zachodzący w mitochondriach hepatocytów, metabolizuje ponad 40% dawki leku do aktywnego farmakologicznie 2-en-VPA (najczęściej jako E-izomeru), następnie do 3-OH-VPA, który ostatecznie ulega przemianie do 3-keto-VPA – głównego obok 2-en-VPA metabolitu kwasu walproinowego krążącego we krwi [4–7].

Background

Although 50 years have passed since the first clinical trials on epilepsy treatment, valproic acid (VPA) is still a generally recognized first-line antiepileptic drug, and one of the most commonly prescribed antiepileptic medications (in over 100 countries). The efficacy of VPA treatment, reflecting its complex mechanism of pharmacological activity, has been confirmed in neurological disorders, particularly in different forms of epilepsy in children and in adults, and in psychiatric diseases [1].

A particularly noteworthy feature is the complex metabolic pathway of VPA which comprises at least five metabolic routes (Fig. 1), leading to the formation of ca. 50 metabolites displaying pharmacological activity, inactive and responsible for the drug's adverse or toxic reactions. The main metabolic transformations of valproic acid take place in hepatocytes, in the mitochondrium and cytosol. They include, among others, oxidation processes mediated by microsomal enzymes (desaturation, ω -, ω_1 -, ω_2 -hydroxylation), mitochondrial oxidation processes (β -oxidation) and microsomal reactions of conjugation with glucuronic acid [1–3].

The first metabolic process, i.e. β -oxidation, which takes place in the mitochondria of hepatocytes, metabolizes over 40% of the drug dose to pharmacologically active 2-ene-VPA (usually in the form of E-isomer) and then to 3-OH-VPA which is ultimately metabolized to 3-keto-VPA – the main metabolite of valproic acid circulating in the blood besides 2-ene-VPA [4–7].



Ryc. 1. Szlak metaboliczny kwasu walproinowego [2]
Fig. 1. Metabolic pathway of VPA [2]

Większość pozamitochondrialnych reakcji I fazy biotransformacji (desaturacja, hydroksylacja) przebiega przy udziale enzymów cytochromu P450 (10% dawki) [8]. Proces desaturacji VPA (σ-oksydacja) jest jednym z istotniejszych szlaków metabolicznych, zachodzącym przy udziale enzymów mikrosomalnych wątroby CYP2C9, CYP2B6, CYP2A6 (prawdopodobnie również CYP2C19), prowadzącym do powstania reaktywnego metabolitu 4-en-VPA [1, 3, 8–14].

W procesach ω-, ω₁-, ω₂-oksydacji powstają natomiast hydroksylowe pochodne kwasu walproinowego: 5-OH-VPA, 4-OH-VPA, 3-OH-VPA oraz 2-PGA [4].

The majority of extra-mitochondrial reactions of the first phase of biotransformation (desaturation, hydroxylation) involve cytochrome P450 enzymes (10% of the dose) [8]. The process of VPA desaturation (σ-oxidation) is one of the more prominent metabolic pathways mediated by microsomal hepatic enzymes CYP2C9, CYP2B6 and CYP2A6 (probably also CYP2C19), and leading to the formation of the reactive metabolite 4-ene-VPA [1, 3, 8–14].

Processes of ω-, ω₁-, ω₂-oxidation, in turn, generate hydroxyl derivatives of valproic acid, including 5-OH-VPA, 4-OH-VPA, 3-OH-VPA and 2-PGA [4].

Znaczna część leku (30–50% dawki) ulega jednak inaktywowaniu podczas glukuronidacji z wytworzeniem glukuronidu VPA wydalanego z moczem. Proces ten jest katalizowany przez izoenzymy glukuronozylotransferazy urydynodifosforanowej (UDPGT lub UGT), m.in. UGT1A6, których aktywność może być modyfikowana genetycznie, wpływając na zmianę eliminacji VPA [13, 15].

Celem pracy było porównanie profilu metabolicznego kwasu walproinowego w terapii lekiem oraz ostrym zatruciu VPA poprzez analizę zmienności stężeń kwasu walproinowego z jego wybranymi metabolitami.

Materiał i metody

Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiły:

- surowica krwi 26 pacjentów z podejrzeniem ostrego zatrucia kwasem walproinowym, hospitalizowanych w Klinice Toksykologii Katedry Toksykologii i Chorób Środowiskowych UJ CM w Krakowie. Krew do oznaczeń toksykologicznych pobierano przy przyjęciu do szpitala i kilkakrotnie podczas leczenia zatrucia wg następującego schematu: dwukrotnie w pierwszej i drugiej dobie leczenia, a następnie raz na dobę do uzyskania stężeń terapeutycznych kwasu walproinowego. Pacjenci toksykologiczni przyjmowali kwas walproinowy łącznie z innymi lekami, tj. pochodnymi benzodwiazepiny, pochodnymi fenotiazyny, karbamazepiną, chlorprotiksenem, hydroksyzyną, olanzapiną i trójpierścieniowymi lekami przeciwdepresyjnymi. Poza wyżej wymienionymi lekami zidentyfikowanymi w badaniu toksykologicznym, kwas walproinowy był przyjmowany z takimi lekami, jak diklofenak, fluoksetyna, haloperidol, risperidon, topiramet, wenlafaksyna, zolpidem. Dodatkowo wykazano spożycie kwasu walproinowego łącznie z alkoholem w przebiegu ostrego zatrucia lub uzależnienia od etanolu;
- surowica krwi 27 pacjentów leczonych preparatami kwasu walproinowego z powodu napadów padaczkowych, afektywnej choroby dwubiegunowej lub innych schorzeń psychiatrycznych na Oddziałach Psychiatrii oraz Neurologii i Udarów Mózgu WSS im. Ludwika Rydygiera w Krakowie. Krew dla celów kontroli bezpieczeństwa terapii kwasem walproinowym pobierano w stanie sta-

A major part of the drug (30–50% of the dose), however, is inactivated during glucuronidation, producing VPA-glucuronide which is eliminated in urine. The process is catalyzed by uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UDPGT or UGT) isoenzymes, e.g. UGT1A6. Their activity can be modified genetically, affecting a change in VPA elimination [13, 15].

The aim of the study was to compare the metabolic profile of valproic acid in drug therapy and in acute VPA poisoning through an analysis of the variability of concentrations of valproic acid with its selected metabolites.

Material and methods

Biological material

Biological material was:

- blood serum samples obtained from 26 patients with suspected acute VPA poisoning hospitalized at the Toxicology Department, Chair of Toxicology and Environmental Diseases, Jagiellonian University Medical College in Krakow. Blood samples for toxicological analysis were collected upon admission to hospital and several times during the treatment of poisoning according to the following scheme: twice during the first and second days of treatment, and then once a day until the achievement of therapeutic concentrations of valproic acid. Toxicological patients took valproic acid in combination with other drugs, i.e. benzodiazepine derivatives, phenothiazine derivatives, carbamazepine, chlorprothixene, hydroxyzine, olanzapine and tricyclic antidepressants. Apart from the above-mentioned drugs identified by toxicological analysis, valproic acid was also used with other medications including diclofenac, fluoxetine, haloperidol, risperidone, topiramate, venlafaxine and zolpidem. Additionally, the analysis demonstrated the ingestion of valproic acid in combination with alcohol secondary to acute poisoning or addiction to ethanol;
- blood serum samples obtained from 27 patients treated with VPA drugs due to epileptic seizures, bipolar disorder or other psychiatric conditions in the Psychiatry Unit and the Neurology and Cerebral Strokes Unit at the Ludwik Rydygier Provincial Specialist Hospital in Krakow. For the purpose of controlling the safety of therapy with valproic

cjonarnym i równowadze dystrybucyjnej (przed podaniem kolejnej dawki leku).

Pacjenci leczeni kwasem walproinowym, ze względu na złożoność procesu chorobowego i współistnienie innych schorzeń, byli równocześnie poddawani terapii lekami z różnych grup farmakologicznych, m.in. innymi lekami przeciwpadaczkowymi, uspokajająco-nasennymi, lekami neuroleptycznymi, leki przeciwdepresyjnymi, innymi lekami antypsychotycznymi, lekami nadciśnieniowymi i innymi.

Metoda analityczna

Oznaczenia stężenia kwasu walproinowego i jego wybranych metabolitów – 2-en-VPA, 4-en-VPA i 3-keto-VPA, w surowicy krwi wykonano zwalidowaną autorską metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas w opcji jonizacji elektronowej (GC-EI-MS).

Substancje wzorcowe, odczynniki chemiczne

Do oznaczeń kwasu walproinowego i jego wybranych metabolitów zastosowano następujące roztwory lub substancje wzorcowe: roztwór kwasu walproinowego (99%) zakupiony w firmie SIGMA (Poznań, Polska), substancje wzorcowe (E, Z) kwas 2-propylo-2-pentenowy (2-en-VPA) (95,6% izomeru *trans* (E) + 4,4% izomeru *cis* (Z)), sól sodowa kwasu 3-oksy-2-propylopentanowego (3-keto-VPA), roztwór (\pm) kwasu 2-propylo-4-pentenowego (4-en-VPA) z firmy TRC (Toronto Research Chemicals, Kanada) oraz roztwór deuterowanego wzorca wewnętrznego (IS) VPA-d₄ (kwas 2-(propylo-1,1-d₂)-pentanowy-3,3-d₂) (99%), który pochodził z CDN Isotope Inc. (Quebec, Kanada).

Z odczynników chemicznych wykorzystano następujące: BSTFA z 1% TMCS (bis-trimetylosililo-trifluoroacetamid z trimetylochlorosilanem) i pirydynę zamówione w firmie SIGMA (Poznań, Polska) oraz metanol, octan etylu, bufor cytrynianowy (pH 3) o czystości analitycznej zakupione w firmie POCH (Gliwice, Polska).

Przygotowanie prób do oznaczeń

W celu izolacji oznaczanych analitów z materiału biologicznego wzbogacono 100 μ l surowicy bada-

acid, blood samples were collected in the stationary state and distribution equilibrium (before the administration of the next dose of the drug).

Due to the complexity of the disease process and the presence of concomitant diseases, patients treated with valproic acid received concurrent therapy with drugs from different pharmacological groups, e.g. other antiepileptic medications, sedative and hypnotic drugs, neuroleptics, antidepressants, other antipsychotic drugs, hypotensive drugs and others.

Analytical method

Assays of the concentration of valproic acid and its selected metabolites – 2-ene-VPA, 4-ene-VPA and 3-keto-VPA, in the blood serum were performed using a validated original method of gas chromatography coupled with electron ionization mass spectrometry (GC-EI-MS).

Reference substances, chemical reagents

Assays of valproic acid and its selected metabolites were performed with the following reference solutions or substances: solution of valproic acid (99%) purchased from SIGMA (Poznań, Poland), reference substances (E, Z): 2-propyl-2-pentenoic acid (2-ene-VPA) (95.6% of E-(*trans*) isomer + 4.4% of Z-(*cis*) isomer), 3-oxo-2-propyl-pentanoic acid sodium salt (3-keto-VPA), solution (\pm) of 2-propyl-4-pentenoic acid (4-ene-VPA) from TRC (Toronto Research Chemicals, Canada) and solution of deuterated internal standard (IS) VPA-d₄ (2-(propyl-1,1-d₂)-pentanoic-3,3-d₂ acid) (99%) from CDN Isotope Inc. (Quebec, Canada).

The following chemical reagents were also used: BSTFA with 1% TMCS (bis-trimethylsilyl trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane) and pyridine ordered from SIGMA (Poznań, Poland), and methanol, ethyl acetate, citrate buffer (pH 3) – p.a. grade, purchased from POCH (Gliwice, Poland).

Preparation of samples for assays

In order to isolate assayed analytes from the biological material, a 100 μ l portion of tested blood serum was enriched with the internal standard VPA-d₄, after which liquid-liquid extraction (LLE) from the

nej dodatkiem wzorca wewnętrznego VPA-d₄ i prowadzono ekstrakcję w układzie ciecz–ciecz (LLE) octanem etylu ze środowiska kwaśnego (pH 3). Pozostałość po odparowaniu rozpuszczalnika zadano mieszaniną derywatyżującą o składzie BSTFA z 1% TMCS i pirydyny (1 : 1, v/v).

Rozdział chromatograficzny, parametry detekcji

Analizę chromatograficzną prowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego TRACE (Thermo-Electron, Austin, USA) na niepolarniej kolumnie kapilarnej Rtx-5MS (długość 60 m × średnica 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm) (Restek, PA, USA). Jako gaz nośny zastosowano hel o czystości 6, którego przepływ przez kolumnę wynosił 1,5 ml/min. Program temperaturowy pieca składał się z kilku segmentów. Temperatura początkowa kolumny wynosiła 60°C i była utrzymywana przez 1 minutę, a następnie wzrastała liniowo do 90°C z przyrostem temperatury 40°C/min. Kolejny wzrost to 2°C/min do 130°C i ponowny liniowy wzrost do 250°C z przyrostem temperatury 30°C/min utrzymywanej 2 minuty. Po osiągnięciu 250°C temperatura nadal wzrastała liniowo do 300°C, lecz z przyrostem 40°C/min. Temperaturę 300°C utrzymywano przez kolejne 2 minuty. Całkowity czas analizy wynosił 31 minut.

Identyfikacji pików chromatograficznych poszczególnych związków dokonywano na podstawie czasów retencji analitów oraz porównania widm mas eluowanych związków z widmami wcześniej analizowanych substancji wzorcowych dla VPA, 4-en-VPA, 2-en-VPA, 3-keto-VPA. W wyniku rozdzielania chromatograficznego uzyskano następujące czasy retencji dla VPA, 4-en-VPA, 2-en-VPA, 3-keto-VPA i VPA-d₄ odpowiednio: 14,05; 13,87; 16,68; 24,70 oraz 13,93 minuty.

Do detekcji badanych analitów zastosowano spektrometr mas POLARIS Q (Thermo-Electron, Austin, USA) wyposażony w analizator mas typu kwadrupolowej pułapki jonowej z opcją dodatniej jonizacji elektronowej. Temperatura źródła jonów wynosiła 230°C, prąd emisji katody 250 μA, a energia wiązki bombardujących elektronów miała wartość równą 70 eV. Napięcie powielacza elektronowego wynosiło 1350 V. Detektor mas pracował w opcji skanowania całkowitego prądu jonowego (TIC) m/z 50–350.

Jony wykorzystane do identyfikacji to: dla kwasu walproinowego jony o m/z 129, 145, dla 4-en-VPA jony

acidic environment (pH 3) was performed with ethyl acetate. The residues left after solvent evaporation were spiked with a derivatization mixture containing BSTFA with 1% of TMCS and pyridine (1 : 1, v/v).

Chromatographic separation, detection parameters

Chromatographic analysis was performed with TRACE gas chromatograph (Thermo-Electron, Austin, USA) using a non-polar capillary column Rtx-5MS (60 m in length x 0.25 mm in diameter; film thickness: 0.25 μm) (Restek, PA, USA). Helium (purity grade 6) was used as carrier gas, with a column flow rate of 1.5 ml/min. The oven temperature programme consisted of several segments. The initial column temperature was 60°C and was maintained for 1 minute, after which it rose in a linear manner to 90°C with a temperature increment of 40°C/min. Next, the temperature increased by 2°C/min to 130°C, and then again linearly up to 250°C with a temperature increment of 30°C/min maintained for 2 minutes. After reaching 250°C, the temperature continued rising in a linear manner to 300°C, but with an increment of 40°C/min. The temperature of 300°C was maintained for another 2 minutes. The total duration of the analysis was 31 minutes.

Chromatographic peaks of individual compounds were identified on the basis of analyte retention times and by comparing the mass spectra of eluted compounds with the spectra of previously analyzed reference substances for VPA, 4-ene-VPA, 2-ene-VPA and 3-keto-VPA. The chromatographic separation yielded the following retention times for VPA, 4-ene-VPA, 2-ene-VPA, 3-keto-VPA and VPA-d₄: 14.05, 13.87, 16.68, 24.70 and 13.93 minutes, respectively.

The detection of tested analytes was performed with POLARIS Q mass spectrometer (Thermo-Electron, Austin, USA) equipped with quadrupole ion trap mass analyzer with optional positive electron ionization. The temperature of the ion source was 230°C, the cathode emission current was 250 μA, and the energy of the bombarding electron beam was 70 eV. The voltage level of the electron multiplier was 1350 V. The mass detector operated in the total ion current (TIC) scanning mode at m/z 50–350.

The following ions were used in the identification process: for valproic acid – ions with m/z 129, 145; for 4-ene-VPA – ions with m/z 172, 185; for 2-ene-

o m/z 172, 185, dla 2-en-VPA jony o m/z 124, 169, dla 3-keto-VPA jony o m/z 183, 147. Podstawę analizy ilościowej stanowiły jony o m/z 201 dla kwasu walproinowego, m/z 199 dla 4-en-VPA, m/z 199 dla 2-en-VPA, m/z 287 dla 3-keto-VPA oraz m/z 205 dla VPA-d₄.

VPA – ions with m/z 124, 169; for 3-keto-VPA – ions with m/z 183, 147. The basis for the quantitative analysis were ions with m/z 201 for valproic acid, m/z 199 for 4-ene-VPA, m/z 199 for 2-ene-VPA, m/z 287 for 3-keto-VPA and m/z 205 for VPA-d₄.

Parametry walidacji

Parametry walidacji metody równoczesnego oznaczania kwasu walproinowego i jego wybranych metabolitów w surowicy krwi techniką GC-MS zebrano w tabelach I–III.

Validation parameters

The validation parameters for the method of concurrent analysis of valproic acid and its selected metabolites in the blood serum by GC-MS are listed in Tables I–III.

Metody obliczeniowe

Do analizy zmienności stężeń kwasu walproinowego i jego wybranych metabolitów wykorzystano tzw. współczynnik Apple'a, który jest ilorazem stężenia VPA i stężeń poszczególnych metabolitów, tj.

Calculation methods

The analysis of variability of concentrations of valproic acid and its selected metabolites was based on Apple's factor, i.e. the ratio between the concentration of VPA and the concentrations of individual VPA

Tabela I. Zakres liniowości, granice wykrywalności i oznaczalności dla badanych analitów

Table I. Limits of linearity, detection and quantification of the studied analytes

Parametry walidacji/Analit Validation data/Analyte	VPA [mg/l]	4-en-VPA 4-ene-VPA [mg/l]	(E)-2-en-VPA (E)-2-ene-VPA [mg/l]	3-keto-VPA 3-keto-VPA [mg/l]
zakresy liniowości limits of linearity (LOL)	1,0–100,0	0,05–10,0	0,1–10,0	0,5–30,0
granice wykrywalności limits of detection (LOD)	0,5	0,05	0,05	0,5
granice oznaczalności limits of quantification (LOQ)	1,0	0,05	0,1	1,0

Tabela II. Powtarzalność i dokładność wewnątrzgrupowa oznaczania kwasu walproinowego i jego metabolitów w surowicy krwi metodą GC-MS

Table II. Intra-assay repeatability and accuracy of determination of valproic acid and its metabolites in blood serum by GC-MS

Oznaczana substancja Analyte	Stężenie zadane Defined concentration [mg/l]	Średnie stężenie* Mean concentration [mg/l]	± SD	CV [%]	Bias [%]
kwas walproinowy valproic acid	2	2,06	0,09	4,56	–2,81
	50	51,27	1,64	3,19	–2,31
4-en-VPA 4-ene-VPA	0,2	0,19	0,006	3,15	1,16
	5	4,97	0,18	3,58	0,49
(E)-2-en-VPA (E)-2-ene-VPA	0,2	0,20	0,006	3,01	–2,34
	5	5,05	0,19	3,85	–1,08
3-keto-VPA	1,5	1,62	0,1	6,19	–7,08
	20	21,95	1,56	7,14	–7,58

* N = 5

Tabela III. Powtarzalność i dokładność międzygrupowa oznaczania kwasu walproinowego i jego wybranych metabolitów w surowicy krwi metodą GC-MS

Table III. Inter-assay repeatability and accuracy of determination of valproic acid and its metabolites in blood serum by GC-MS

Oznaczana substancja Analyte	Stężenie zadane Defined concentration [mg/l]	Średnie stężenie* Mean concentration [mg/l]	± SD	CV [%]	Bias [%]
kwas walproinowy valproic acid	1	0,95	0,05	5,40	5,21
	2	1,91	0,03	1,68	4,30
	5	4,99	0,32	6,49	0,46
	10	9,73	0,28	2,87	2,78
	20	19,64	1,18	6,01	2,11
	50	51,16	2,23	4,36	-2,13
4-en-VPA 4-ene-VPA	0,1	0,054	0,008	10,54	19,42
	0,2	0,20	0,023	11,03	-3,49
	0,5	0,48	0,005	0,96	3,9
	2	1,97	0,14	7,25	1,89
	5	5,11	0,32	6,26	-1,98
(E)-2-en-VPA (E)-2-ene-VPA	0,1	0,10	0,005	5,12	-4,52
	0,2	0,2	0,011	5,76	-1,81
	0,5	0,51	0,030	5,86	-2,56
	2	1,93	0,087	4,51	3,76
	5	5,02	0,42	8,33	0,14
3-keto-VPA	1	1,11	0,14	12,56	-4,22
	1,5	1,73	0,11	6,43	-13,7
	5	4,91	0,53	10,74	4,9
	20	18,76	1,48	7,89	9,35
	30	30,98	1,27	4,09	-3,06

* N = 5

VPA/4-en-VPA, VPA/2-en-VPA, VPA/3-keto-VPA [16]. Aby ocenić zmienność dwóch podstawowych dróg metabolizmu VPA w grupie pacjentów ze stężeniami terapeutycznymi VPA i w grupie ze stężeniami toksycznymi VPA, posłużono się wielkościami 3-keto-VPA/2-en-VPA oraz 2-en-VPA/4-en-VPA. Do porównania ww. wielkości oraz stężeń wybranych metabolitów VPA u pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia VPA z grupą pacjentów leczonych VPA zastosowano test nieparametryczny Manna-Whitneya.

Wyniki

Otrzymane wyniki stężeń kwasu walproinowego i jego wybranych metabolitów poddano analizie po-

metabolites, i.e. VPA/4-ene-VPA, VPA/2-ene-VPA and VPA/3-keto-VPA [16]. The assessment of variability of two basic metabolic pathways of VPA in the group of patients with therapeutic VPA concentrations and in the group with toxic VPA concentrations was performed using 3-keto-VPA/2-ene-VPA and 2-ene-VPA/4-ene-VPA values. In order to compare the above values and the concentrations of selected VPA metabolites in patients hospitalized due to acute VPA poisoning and in the group of patients treated with VPA, the non-parametric Mann-Whitney test was employed.

Results

The resulting concentrations of valproic acid and its selected metabolites were analyzed comparative-

równawczej w badanych grupach i pomiędzy grupami. Stężenia maksymalne kwasu walproinowego przy przyjęciu do szpitala u wszystkich 26 pacjentów toksykologicznych przekroczyły górny zakres stężenia terapeutycznego (> 125 mg/l), jak również – z wyjątkiem trzech przypadków (129,1, 136,8 i 148,4 mg/l) – granicę stężenia toksycznego kwasu walproinowego (> 150 mg/l) i wahały się od 150,6 do 714,2 mg/l. W grupie pacjentów leczonych stężenie VPA mieściło się w zakresie stężeń VPA od 25,8 do 74,8 mg/l.

Stężenia 4-en-VPA, 2-en-VPA i 3-keto-VPA w surowicy krwi zmierzone przy stężeniach toksycznych VPA oraz stężenia metabolitów VPA przy stężeniu terapeutycznym VPA w stanie stacjonarym u pacjentów poddanych terapii lekiem porównano w tabeli IV. Test Manna-Whitneya wykazał

ly within and between the study groups. Maximum concentrations of valproic acid determined upon hospital admission in all 26 toxicological patients exceeded both the upper range of the therapeutic concentration (> 125 mg/l), and – with the exception of three cases (129.1, 136.8 and 148.4 mg/l) – also exceeded the limit of the toxic concentration of valproic acid (> 150 mg/l), and varied between 150.6 and 714.2 mg/l. In the group of treated patients the concentration of VPA ranged between 25.8 and 74.8 mg/l.

The concentrations of 4-ene-VPA, 2-ene-VPA and 3-keto-VPA in the blood serum measured at toxic VPA concentrations, and the concentrations of VPA metabolites at the therapeutic range of VPA in the stationary state in patients receiving VPA therapy are compared in Table IV. The Mann-Whitney

Tabela IV. Porównanie średnich wyników stężeń VPA, 4-en-VPA, 2-en-VPA i 3-keto-VPA w badanych grupach pacjentów

Table IV. The comparison of the mean results VPA, 4-ene-VPA, 2-ene-VPA and 3-keto-VPA concentrations in the studied groups of patients

Analit/Stężenie Analyte/Concentration [mg/l]		Zatrucie VPA VPA poisoning	Terapia VPA VPA therapy	Średnie stężenia Zatrucie/Terapia Mean results Poisoning/Therapy
VPA	$\bar{x} \pm SD$	306,74 ±158,17	53,28 ±12,96	5,8
	min.–maks. min.–max.	123,39–714,20	25,80–74,80	–
	<i>n</i>	26 ^a	27 ^b	–
4-en-VPA 4-ene-VPA	$\bar{x} \pm SD$	0,84 ±0,59	0,14 ±0,06	6,0
	min.–maks. min.–max.	0,10–2,80	< LOQ – 0,38	–
	<i>n</i>	61 ^c	27	–
2-en-VPA 2-ene-VPA	$\bar{x} \pm SD$	3,42 ±1,80	3,78 ±1,63	0,9
	min.–maks. min.–max.	0,65–10,81	1,53–8,26	–
	<i>n</i>	63 ^c	27	–
3-keto-VPA	$\bar{x} \pm SD$	16,81 ±13,01	27,16 ±9,50	0,6
	min.–maks. min.–max.	2,00–56,40	10,55–52,71	–
	<i>n</i>	63 ^c	27	–

n – liczba oznaczeń analitu

^a dotyczy C_{maks} VPA

^b dotyczy C_{ss} VPA

^c dotyczy oznaczeń analitów dla stężeń VPA > 125 mg/l

n – number of analyte determinations

^a for C_{max} VPA

^b for C_{ss} VPA

^c for VPA concentrations > 125 mg/l

znamiennie statystycznie różnice w średnich stężeniach 4-en-VPA ($p < 0,0001$) oraz 3-keto-VPA ($p < 0,0001$) pomiędzy badanymi grupami pacjentów. Nie stwierdzono natomiast znamiennej istotności, porównując średnie stężenia 2-en-VPA ($p = 0,3820$) pomiędzy grupami.

Zmiany stężeń wybranych metabolitów VPA względem stężenia kwasu walproinowego (ocena współczynników VPA/4-en-VPA, VPA/2-en-VPA i VPA/3-keto-VPA) oraz porównanie dwóch szlaków metabolicznych VPA – β -oksydację i desaturację (ocena ilorazów stężeń metabolitów 3-keto-VPA/2-en-VPA oraz 2-en-VPA/4-en-VPA) w badanych grupach, przedstawiono w tabeli V.

Zmiany stężenia wybranych metabolitów oraz zmienność dwóch szlaków metabolicznych VPA zobrazowano w zależności od wielkości stężenia VPA w surowicy krwi i przedstawiono na rycinach 2.–5.

test showed statistically significant differences in mean concentrations of 4-ene-VPA ($p < 0.0001$) and 3-keto-VPA ($p < 0.0001$) between the studied groups of patients. However, no statistical significance was found when comparing the mean concentrations of 2-ene-VPA ($p = 0.3820$) between the groups.

Changes in concentrations of selected VPA metabolites in relation to the concentration of valproic acid (assessment of VPA/4-ene-VPA, VPA/2-ene-VPA and VPA/3-keto-VPA ratios) and the comparison of two metabolic pathways of VPA – β -oxidation and desaturation (assessment of 3-keto-VPA/2-ene-VPA and 2-ene-VPA/4-ene-VPA metabolite concentration ratios) in the study groups are listed in Table V.

Changes in the concentration of selected metabolites and the variability of two metabolic pathways of VPA are shown as a function of the concentration of VPA in the blood serum in Figs. 2–5.

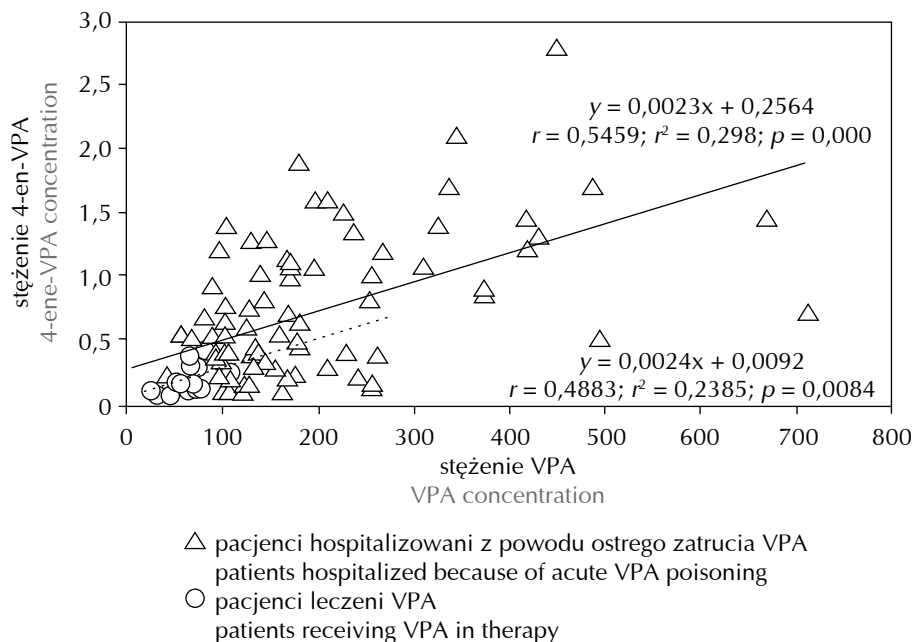
Tabela V. Porównanie rozkładu współczynników VPA/4-en-VPA, VPA/2-en-VPA, VPA/3-keto-VPA, 3-keto-VPA/2-en-VPA oraz 2-en-VPA/4-en-VPA w grupach pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia (zatrucie) i leczonych VPA (terapia) z użyciem testu Manna-Whitneya

Table V. Comparison of the distribution of VPA/4-ene-VPA, VPA/2-ene-VPA, VPA/3-keto-VPA, 3-keto-VPA/2-ene-VPA and 2-ene-VPA/4-ene-VPA ratios in groups of patients hospitalized because of suspected acute VPA poisoning (poisoning) and patients treated with VPA (therapy) by Mann-Whitney test

Współczynnik Ratio	Grupa pacjentów Group of patients	Mediana (min.–maks.) Median (min.–max.)	n	Test Manna-Whitneya Mann-Whitney test
VPA/4-en-VPA VPA/4-ene-VPA	zatrucie poisoning	413,26 (198,18–1827,86)	23	$p = 0,1883$
	terapia therapy	421,16 (168,97–623,62)	28	
VPA/2-en-VPA VPA/2-ene-VPA	zatrucie poisoning	114,59 (28,84–390,00)	24	$p < 0,0001$
	terapia therapy	15,78 (7,19–28,41)	30	
VPA/3-keto-VPA VPA/3-keto-VPA	zatrucie poisoning	26,31 (6,38–84,27)	20	$p < 0,0001$
	terapia therapy	2,01 (1,17–4,30)	30	
3-keto-VPA/2-en-VPA 3-keto-VPA/2-ene-VPA	zatrucie poisoning	5,03 (1,10–18,73)	20	$p = 0,0054$
	terapia therapy	7,29 (2,23–15,77)	30	
2-en-VPA/4-en-VPA 2-ene-VPA/4-ene-VPA	zatrucie poisoning	4,10 (0,81–15,00)	23	$p < 0,0001$
	terapia therapy	24,13 (12,38–86,63)	30	

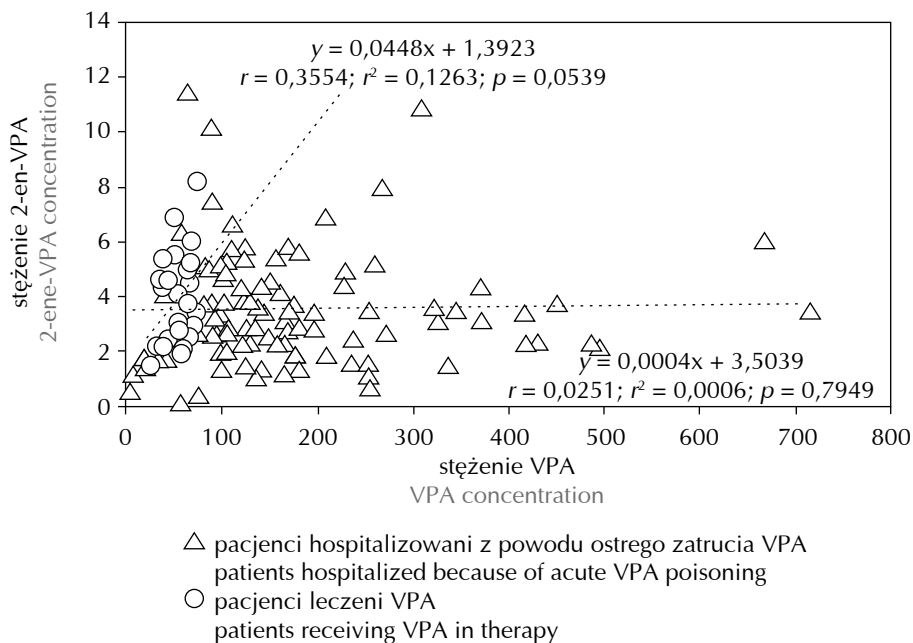
n – liczba pacjentów w grupie

n – number of patients in group



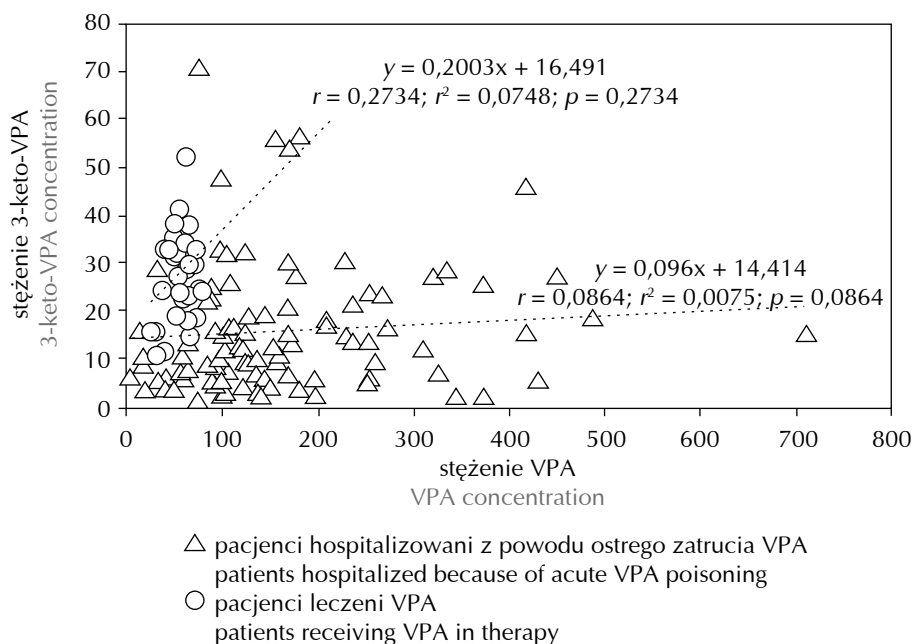
Ryc. 2. Zmiany stężenia 4-en-VPA w zależności od wartości stężenia VPA u pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia oraz w terapii lekiem

Fig. 2. Changes in 4-ene-VPA concentration depending on the value of VPA concentration in patients hospitalized because of suspected acute VPA poisoning and in VPA therapy



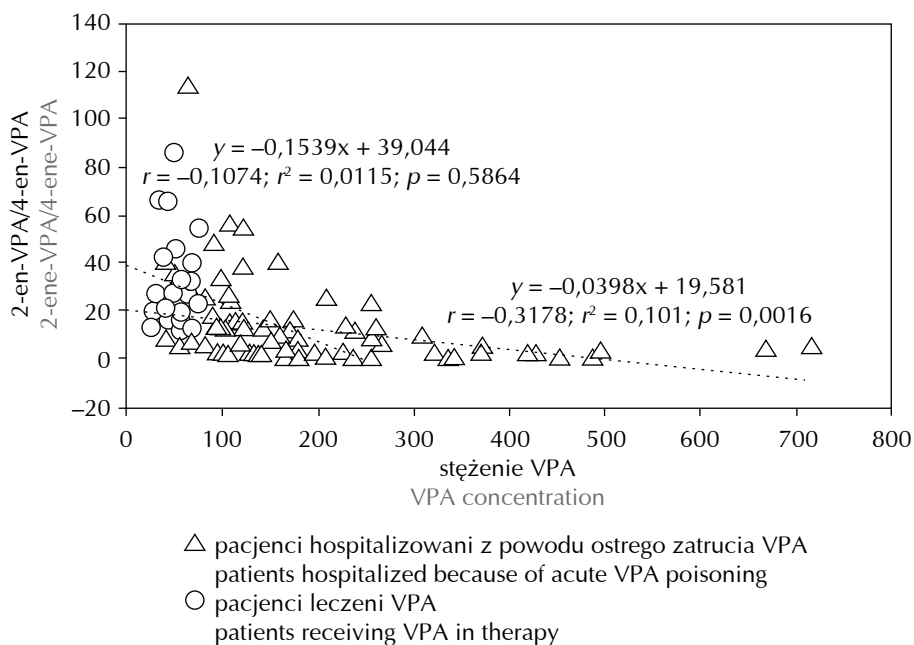
Ryc. 3. Zmiany stężenia 2-en-VPA w zależności od wartości stężenia VPA u pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia oraz w terapii lekiem

Fig. 3. Changes in 2-ene-VPA concentration depending on the value of VPA concentration in patients hospitalized because of suspected acute VPA poisoning and in VPA therapy



Ryc. 4. Zmiany stężenia 3-keto-VPA w zależności od wartości stężenia VPA u pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia oraz w terapii lekiem

Fig. 4. Changes in 3-keto-VPA concentration depending on the value of VPA concentration in patients hospitalized because of suspected acute VPA poisoning and in VPA therapy



Ryc. 5. Zmiany ilorazu stężeń 2-en-VPA/4-en-VPA w zależności od wartości stężenia VPA u pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia oraz w terapii lekiem

Fig. 5. Changes in 2-ene-VPA/4-ene-VPA concentration ratio depending on the value of VPA concentration in patients hospitalized because of suspected acute VPA poisoning and in VPA therapy

Dyskusja

W przebiegu biotransformacji kwasu walproinowego na największą uwagę zasługuje szlak β -oksydacji, który w terapii kwasem walproinowym stanowi najistotniejszą przemianę I fazy biotransformacji VPA [17]. Główny metabolit utleniania na drodze β -oksydacji – 2-en-VPA – odpowiada w dawkach terapeutycznych za działanie przeciwpadaczkowe, a po przerwaniu podawania leku znany jest z przedłużonego działania farmakologicznego [18, 19]. Wiadomo już również, że 2-en-VPA w ostrym zatruciu VPA jest odpowiedzialny m.in. za działanie neurotoksyczne. Prawdopodobnie śpiączka towarzysząca zatruciu VPA jest efektem podwyższonego poziomu GABA w mózgu i postsynaptycznego działania hamującego 2-en-VPA [20]. Końcowym i drugim głównym metabolitem mitochondrialnym jest 3-keto-VPA, którego wydalanie razem z 2-en-VPA koreluje z wydajnością procesu β -oksydacji [13].

Drugi omawiany w pracy szlak przemian VPA to proces desaturacji, który metabolizuje niewielką ilość VPA, jednak powstające metabolity mogą inicjować poważne działania toksyczne. Z dotychczasowych obserwacji najważniejsze metabolity desaturacji 4-en-VPA oraz produkty jego degradacji – 2,4-dien-VPA i 3-keto-4-en-VPA – mogą wywoływać działanie niepożądane na wątrobę oraz odpowiadać za działanie embriotoksyczne. 4-en-VPA uważany jest za silny induktor drobnopęcherzykowego stłuszczenia wątroby oraz inhibitor β -oksydacji kwasów tłuszczowych [1, 3, 8–14].

Porównując zmiany stężenia VPA i jego wybranych metabolitów podczas terapii lekiem z ostrym zatruciem kwasem walproinowym, wykazano przedstawione poniżej różnice. Pierwszy z badanych metabolitów, 4-en-VPA, występuje podczas terapii VPA w małych stężeniach w surowicy krwi. Średnie stężenie 4-en-VPA u pacjentów toksykologicznych było 6-krotnie większe niż u pacjentów leczonych VPA ($0,84 \pm 0,59$ mg/l vs $0,14 \pm 0,06$ mg/l), podobnie jak średnie stężenie VPA, które przekraczało 5,8-krotnie średnie stężenie terapeutyczne VPA w grupie badanej ($306,74 \pm 158,17$ mg/l vs $53,28 \pm 12,96$ mg/l; tab. IV). Porównywalne wyniki średniego stężenia 4-en-VPA u pacjentów leczonych VPA w monoterapii uzyskali Kreher *et al.* ($0,15 \pm 0,12$ mg/l) [21]. W grupie otrzymującej wysokie dawki terapeutyczne VPA ($74,9 \pm 12,9$ mg/kg m.c./

Discussion

The most prominent pathway in valproic acid biotransformation is β -oxidation – the most essential process occurring in the first phase of VPA biotransformation in valproic acid therapy [17]. The main metabolite of β -oxidation, 2-ene-VPA, in therapeutic doses is responsible for VPA's antiepileptic activity. After the discontinuation of the drug it is known to exhibit a prolonged pharmacological activity [18, 19]. It has also been demonstrated that, among other effects, 2-ene-VPA is responsible for the neurotoxic activity in cases of acute VPA poisoning. Coma accompanying VPA poisoning is probably an effect of an increased GABA level in the brain and the postsynaptic inhibitory activity of 2-ene-VPA [20]. The terminal and other major mitochondrial metabolite is 3-keto-VPA. Its excretion – together with 2-ene-VPA – is correlated with the efficiency of the β -oxidation process [13].

The other metabolic pathway of VPA discussed in the present study is desaturation. Even though the process metabolizes only a small amount of VPA, the resulting metabolites may initiate severe toxic effects. Observations to date reveal that the most important desaturation metabolite 4-ene-VPA, as well as the products of its degradation (2,4-diene-VPA and 3-keto-4-ene-VPA), may produce adverse reactions affecting the liver and induce embryotoxic effects. 4-ene-VPA is considered to be a potent inducer of microvesicular liver steatosis and an inhibitor of β -oxidation of fatty acids [1, 3, 8–14].

The comparison of changes in the concentration of VPA and its selected metabolites during VPA therapy and in acute VPA poisoning shows the following differences. The first of the studied metabolites, 4-ene-VPA, is found during VPA therapy at low blood serum concentrations. The mean concentration of 4-ene-VPA in toxicological patients was six times higher than in patients treated with VPA (0.84 ± 0.59 mg/l vs 0.14 ± 0.06 mg/l), similarly to the mean concentration of VPA which exceeded 5.8 times the mean therapeutic concentration of VPA in the study group (306.74 ± 158.17 mg/l vs 53.28 ± 12.96 mg/l; Table IV). Comparable results for the mean concentration of 4-ene-VPA in patients treated with VPA in monotherapy were obtained by Kreher *et al.* (0.15 ± 0.12 mg/l) [21]. Significantly different mean concentrations of 4-ene-VPA, amounting

dobę) w porównaniu z dawkami standardowymi VPA ($17,8 \pm 6,4$ mg/kg m.c./dobę) stwierdzono istotnie różne średnie stężenia 4-en-VPA wynoszące odpowiednio $0,44 \pm 0,13$ mg/l i $0,08 \pm 0,06$ mg/l [22].

W grupie osób leczonych VPA oraz hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia VPA obserwowano istotną statystycznie korelację pomiędzy VPA i 4-en-VPA (ryc. 2.). W obu grupach zależność stężenia 4-en-VPA od stężenia VPA jest zbliżona, co pozwala sądzić, że każdemu wzrostowi stężenia VPA w zakresie stężeń terapeutycznych czy w zakresie stężeń toksycznych VPA (zmierzonych do wartości 714,2 mg/l) towarzyszył podobny wzrost stężenia 4-en-VPA (współczynniki kierunkowe prostych regresji dla obu grup badanych są prawie identyczne – 0,0023 i 0,0024). Zatem szlak desaturacji VPA do 4-en-VPA nie ulega wysyceniu w wyniku przekroczenia zakresu stężeń terapeutycznych VPA, a stężenie 4-en-VPA w surowicy krwi zwiększa się proporcjonalnie do wartości stężenia VPA. Podobnie duże dawki terapeutyczne VPA skutkowały wzmożonym powstawaniem 4-en-VPA dodatnio korelującym z całkowitym stężeniem VPA [22].

Potwierdzeniem braku zmian w metabolizmie VPA do 4-en-VPA w zależności od dawki są porównywalne wartości współczynnika VPA/4-en-VPA w grupach hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia i leczonych VPA (mediana: 413,26 mg/l vs 421,16 mg/l; tab. V).

Stężenia metabolitów procesu β -oksydacji pomiędzy badanymi grupami nie były istotnie różne dla 2-en-VPA (średnie \pm SD; $3,42 \pm 1,80$ mg/l vs $3,78 \pm 1,63$ mg/l), podczas gdy stężenia 3-keto-VPA pacjentów leczonych VPA było ok. 2-krotnie większe względem otrzymanych po dawkach toksycznych VPA (średnie \pm SD; $27,16 \pm 9,50$ mg/l vs $16,81 \pm 13,01$ mg/l, tab. IV). W badaniach innych autorów, wykonanych dla wysokich dawek terapeutycznych VPA (średnio \pm SD; $74,9 \pm 12,9$ mg/kg/dobę), wykazano większe stężenia 2-en-VPA ($p = 0,05$) względem dawek standardowych (średnio \pm SD; $17,8 \pm 6,4$ mg/kg m.c./dobę) oraz zbliżone stężenia 3-keto-VPA pomiędzy grupami [22], natomiast odmienne od wyników prezentowanych w niniejszej publikacji dla dawek terapeutycznych VPA.

Zmiany stężeń 2-en-VPA i 3-keto-VPA w zależności od wartości stężenia kwasu walproinowego

to $0,44 \pm 0,13$ mg/l and $0,08 \pm 0,06$ mg/l respectively, were noted in the group receiving high therapeutic doses of VPA ($74,9 \pm 12,9$ mg/kg/24 h) compared to standard VPA doses ($17,8 \pm 6,4$ mg/kg/24 h) [22].

In the group of patients treated with VPA and patients hospitalized because of acute VPA poisoning, there was a statistically significant correlation between VPA and 4-ene-VPA (Fig. 2). The relationship between the concentration of 4-ene-VPA and the concentration of VPA is similar in both groups, which gives grounds to assume that every increase in VPA concentration, either within the range of therapeutic or toxic concentrations (measured up to the value of 714.2 mg/l), was accompanied by a similar increase in the concentration of 4-ene-VPA (at 0.0023 and 0.0024, the slope coefficients of regression lines for both study groups are nearly identical). Therefore, the pathway of VPA desaturation to 4-ene-VPA does not become saturated as a result of exceeding of the range of VPA's therapeutic concentrations, and the concentration of 4-ene-VPA in the blood serum rises proportionally to the value of VPA concentration. Similarly, high therapeutic doses of VPA resulted in an increased formation of 4-ene-VPA exhibiting a positive correlation with the total concentration of VPA [22].

The fact that there are no changes in the metabolism of VPA to 4-ene-VPA depending on the dose is confirmed by comparable values of the VPA/4-ene-VPA ratio in the groups of patients hospitalized because of acute poisoning and treated with VPA (median: 413.26 mg/l vs. 421.16 mg/l; Table V).

The concentrations of metabolites of the β -oxidation process between the study groups were not significantly different for 2-ene-VPA (mean \pm SD; $3,42 \pm 1,80$ mg/l vs. $3,78 \pm 1,63$ mg/l), whereas the concentrations of 3-keto-VPA in patients treated with VPA were approximately twice as high as the concentrations obtained after toxic doses of VPA (mean \pm SD; $27,16 \pm 9,50$ mg/l vs. $16,81 \pm 13,01$ mg/l; Table IV). Studies conducted by other authors for high therapeutic doses of VPA (mean \pm SD; $74,9 \pm 12,9$ mg/kg/24 h) have demonstrated higher concentrations of 2-ene-VPA ($p = 0,05$) than for standard doses (mean \pm SD; $17,8 \pm 6,4$ mg/kg/24 h) and similar concentrations of 3-keto-VPA between the groups [22], however different from results obtained in the present study for therapeutic doses of VPA.

Changes in 2-ene-VPA and 3-keto-VPA concentrations depending on the concentration of valproic acid are different for cases of acute poisoning and

różnią się pomiędzy przypadkami ostrego zatrucia a terapią VPA (ryc. 3. i 4.). Korelacja pomiędzy stężeniami 2-en-VPA i 3-keto-VPA a stężeniami terapeutycznymi VPA jest wyraźnie dodatnia (odpowiednio $r = 0,3554$ i $0,2734$). W zakresie stężeń toksycznych VPA stężenia 2-en-VPA i 3-keto-VPA nie ulegały istotnej zmianie. Jedynie korelacja pomiędzy stężeniami 2-en-VPA a stężeniami terapeutycznymi VPA była bliska istotności statystycznej ($p = 0,0539$). Z dużą pewnością można zatem stwierdzić, że zwiększenie stężenia VPA w zakresie terapeutycznym skutkuje proporcjonalnym wzrostem stężenia 2-en-VPA. W ostrym zatruciu natomiast ulega zahamowaniu przemiana VPA do 2-en-VPA.

Średnie i mediany współczynników VPA/2-en-VPA i VPA/3-keto-VPA wykazują istotne różnice pomiędzy grupami badanymi (tab. V). Po dawce toksycznej VPA oba współczynniki ulegają zwiększeniu względem dawki terapeutycznej VPA, potwierdzając wcześniejsze stwierdzenie, że u pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia przemiana metaboliczna VPA do 2-en-VPA i 3-keto-VPA na drodze β -oksydacji ulega osłabieniu. Tak jak po dużych dawkach terapeutycznych w ostrym zatruciu VPA dochodzi do zmniejszenia konwersji VPA do 2-en-VPA, której przyczyną może być autoinhibicja lub wysycenie mitochondrialnego szlaku β -oksydacji kwasu walproinowego [20].

Analizując przemianę metaboliczną 2-en-VPA do 3-keto-VPA, posłużono się ilorazem stężeń 3-keto-VPA/2-en-VPA. Porównanie otrzymanych współczynników po dawce terapeutycznej i toksycznej wykazało, że średnie wartości (mediany) 3-keto-VPA/2-en-VPA były istotnie statystycznie niższe u pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia VPA (5,03 vs 7,29; tab. V). Obniżenie ilorazu stężeń 3-keto-VPA/2-en-VPA dowodzi, że zahamowaniu uległa również przemiana metaboliczna 2-en-VPA do 3-keto-VPA oraz prawdopodobnie powstawanie produktu pośredniego β -oksydacji – 3-OH-VPA.

Wielkość ilorazu stężeń 2-en-VPA/4-en-VPA pozwala ocenić różnicę w przebiegu dwóch szlaków metabolicznych VPA (β -oksydacji i desaturacji) w zależności od wielkości dawki. W grupie pacjentów leczonych z powodu ostrego zatrucia VPA obserwuje się istotną statystycznie różnicę w średniej (medianie) dla ilorazu stężeń 2-en-VPA/4-en-VPA,

cases of VPA therapy (Figs. 3 and 4). The correlation existing between concentrations of 2-ene-VPA and 3-keto-VPA, and therapeutic concentrations of VPA is clearly positive ($r = 0.3554$ and 0.2734 , respectively). There was no significant change in 2-ene-VPA and 3-keto-VPA concentrations for the range of toxic concentrations of VPA. Only the correlation determined between 2-ene-VPA concentrations and therapeutic concentrations of VPA was close to statistical significance ($p = 0.0539$). It is therefore possible to conclude with a high degree of certainty that an increase in VPA concentration within the therapeutic range causes a proportional increase in 2-ene-VPA concentration. In cases of acute poisoning, however, the conversion of VPA to 2-ene-VPA is inhibited.

Both mean and median VPA/2-ene-VPA and VPA/3-keto-VPA ratios differ significantly between the study groups (Table V). After a toxic dose of VPA both ratios increase in relation to the therapeutic dose of VPA, corroborating the previous finding that the metabolic transformation of VPA to 2-ene-VPA and 3-keto-VPA in the process of β -oxidation is weakened in patients hospitalized because of acute poisoning. Similarly to the ingestion of high therapeutic doses, acute VPA poisoning results in a decreased VPA conversion to 2-ene-VPA – possibly due to self-inhibition or saturation of the mitochondrial pathway of β -oxidation of valproic acid [20].

The analysis of the metabolic conversion of 2-ene-VPA to 3-keto-VPA was based on the ratio between 3-keto-VPA and 2-ene-VPA concentrations. A comparison of ratios determined after therapeutic and toxic doses showed that the mean values (medians) of 3-keto-VPA/2-ene-VPA were lower in a statistically significant manner in patients hospitalized due to acute VPA poisoning (5.03 vs. 7.29; Table V). A decrease in the 3-keto-VPA/2-ene-VPA concentration ratio also proves the inhibition of the metabolic conversion of 2-ene-VPA to 3-keto-VPA and, probably, the formation of the intermediate product of β -oxidation, i.e. 3-OH-VPA.

The value of the 2-ene-VPA/4-ene-VPA concentration ratio makes it possible to evaluate the difference in the progression of both metabolic pathways of VPA (β -oxidation and desaturation) depending on the dose size. In the group of patients treated because of acute VPA poisoning there is a statistically significant difference in mean (median) for the 2-ene-VPA/4-ene-VPA concentration ratio

która ulega obniżeniu względem dawek terapeutycznych VPA (4,1 vs 24,13; tab. V). Wraz ze wzrostem dawki VPA powstaje proporcjonalnie więcej 4-en-VPA, który jako inhibitor procesu β -oksydacji hamuje również metabolizm VPA w kierunku 2-en-VPA. Iloraz stężeń 2-en-VPA/4-en-VPA wykazuje istotną ujemną korelację ze stężeniem toksycznym VPA ($r = -0,3178$; $p = 0,0016$; ryc. 5.). W zakresie stężeń toksycznych VPA przewagę zyskuje proces desaturacji, a odmiennie przebiega proces tworzenia 2-en-VPA, którego stężenie nie ulega proporcjonalnemu zwiększeniu wraz ze wzrostem dawki kwasu walproinowego.

W dostępnych badaniach w piśmiennictwie zastosowanie dużych dawek terapeutycznych kwasu walproinowego było związane z osłabieniem reakcji β -oksydacji, z wyjątkiem zwiększonego tworzenia 2-en-VPA. W konsekwencji zahamowania metabolizmu 2-en-VPA do 3-OH-VPA i 3-keto-VPA (wzrasta stosunek stężeń 2-en-VPA/3-keto-VPA) zwiększeniu proporcjonalnie do dawki ulegały reakcje ω - i ω_1 -oksydacji [21, 22].

Otrzymane wyniki badania zmienności stężeń kwasu walproinowego i jego wybranych metabolitów pozwolą na poszerzenie diagnostyki pacjentów zatrutych VPA o ilościowe oznaczenie toksycznych metabolitów leku (2-en-VPA i 4-en-VPA). Odmienny metabolizm kwasu walproinowego w ostrym zatruciu w porównaniu z terapią lekiem na etapie β -oksydacji oraz proporcjonalne do stężenia VPA zwiększenie stężenia 4-en-VPA może się przełożyć na skuteczniejsze leczenie, mniejsze ryzyko powikłań oraz ograniczenie kosztów leczenia.

Wnioski

Analiza zmienności stężeń kwasu walproinowego i jego metabolitów (2-en-VPA, 4-en-VPA, 3-keto-VPA) w surowicy krwi dowodzi odmienności profilu metabolicznego kwasu walproinowego względem terapii, a w szczególności wykazuje, że:

- proces desaturacji nie ulega zmianie w ostrym zatruciu i ma przewagę nad procesem β -oksydacji,
- przyjęcie dawek toksycznych VPA skutkuje wzmożonym powstawaniem 4-en-VPA proporcjonalnym do wzrostu stężenia kwasu walproinowego,

which decreases in relation to the therapeutic doses of VPA (4.1 vs. 24.13; Table V). An increase in the dose of VPA causes a proportional increase in the quantity of 4-ene-VPA which, being an inhibitor of the β -oxidation process, also inhibits the metabolism of VPA to 2-ene-VPA. The 2-ene-VPA/4-ene-VPA concentration ratio exhibits a significant negative correlation with toxic VPA concentrations ($r = -0.3178$; $p = 0.0016$; Fig. 5). In the range of toxic VPA concentrations, the dominant role is assumed by the process of desaturation, and the process of 2-ene-VPA formation proceeds differently, with no increase in 2-ene-VPA concentration proportionally to an increase in the dose of valproic acid.

Studies available in the literature show that the administration of high therapeutic doses of valproic acid has been associated with a weakening of the reaction of β -oxidation with the exception of increased formation of 2-ene-VPA. An inhibition of the metabolism of 2-ene-VPA to 3-OH-VPA and 3-keto-VPA (with an increase in the 2-ene-VPA/3-keto-VPA concentration ratio) has produced an increase in the reactions of ω - and ω_1 -oxidation in proportion to the dose [21, 22].

The results of the study investigating the variability of concentrations of valproic acid and its selected metabolites will make it possible to extend the diagnostics of patients with VPA poisoning by performing a quantitative assay of toxic metabolites of the drug (2-ene-VPA and 4-ene-VPA). Differences in the metabolism of valproic acid in acute poisoning and in drug therapy at the stage of β -oxidation, and the increase in 4-ene-VPA concentration in proportion to the concentration of VPA, may translate into more effective treatment options, a lesser risk of complications and lower costs of therapy.

Conclusions

The analysis of variability of concentrations of valproic acid and its metabolites (2-ene-VPA, 4-ene-VPA and 3-keto-VPA) in the blood serum has found that the metabolic profile of valproic acid in acute poisoning and in therapy is different. In particular, it has been shown that:

- the process of desaturation is unchanged in acute poisoning and prevails over the process of β -oxidation;

- w ostrym zatruciu VPA dochodzi do wysycenia przemian metabolicznych VPA na etapie β -oksydacji,
- proces utleniania 2-en-VPA do 3-keto-VPA ulega zwolnieniu po dawkach toksycznych.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

- the ingestion of toxic doses of VPA causes an increased formation of 4-ene-VPA, proportional to an increase in valproic acid concentration;
- acute VPA poisoning involves the saturation of VPA's metabolic pathways at the stage of β -oxidation;
- the process of oxidation of 2-ene-VPA to 3-keto-VPA slows down after the ingestion of toxic doses.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate. A summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* 2002; 16: 695-714.
2. Kumar S, Wong H, Yeung SA, Riggs W, Abbott FS, Rurak DW. Disposition of valproic acid in maternal, fetal, and newborn sheep II: metabolism and elimination. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 857-864.
3. Kiang TKL, Ho PC, Anari MR, Tong V, Abbott FS, Chang TKH. Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9*1/*1 genotype. *Toxicol Sci* 2006; 94: 261-271.
4. Löscher W. Concentration of metabolites of valproic acid in plasma of epileptic patients. *Epilepsia* 1981; 22: 169-178.
5. McLaughlin DB, Andrews JA, Hooper WD, Cannell GR, Eadie MJ, Dickinson RG. Apparent autoinduction of valproate β -oxidation in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 49: 409-415.
6. Grunze H, Walden J. Kwas walproinowy w zaburzeniach afektywnych dwubiegunowych. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2002.
7. Brent J, Wallace KL, Burkhart KK, et al. *Critical care Toxicology. Diagnosis and management of the critically poisoned patient.* Elsevier, Philadelphia 2005.
8. Tan L, Yu JT, Sun YP, Ou JR, Song JH, Yu Y. The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2010; 112: 320-323.
9. Sadeque JM, Fischer MB, Korzekwa KR, Gonzalez FJ, Rettie AE. Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 698-703.
10. Franssen EJJ, van Essen GG, Portman AT, de Jong J, Go G, Stegeman CA, Uges DRA. Valproic acid toxicokinetics: serial hemodialysis and hemoperfusion. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 289-293.
11. Anari MR, Burton RW, Gopaul S, Abbott FS. Metabolic profiling of valproic acid by DNA-expressed human cytochrome P450 enzymes using negative-ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 742: 217-227.
12. Ho PC, Abbott FS, Zanger UM, Chang TK. Influence of CYP2C9 genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes. *Pharmacogenomics J* 2003; 3: 335-342.
13. Silva MF, Aires CC, Luis PB, Ruiten JPN, IJlst L, Duran M, Wanders RJ, Tavares de Almeida I. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inher Metab Dis* 2008; 31: 205-216.
14. Jiang D, Bai X, Zhang Q, Lu W, Wang Y, Li L, Müller M. Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genotypes on pharmacokinetic variability of valproic acid in Chinese epileptic patients: nonlinear mixed-effect modeling. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65: 1187-1193.
15. Anderson GD. Children versus adults: pharmacokinetic and adverse-effect differences. *Epilepsia* 2002; 43 Suppl 3: 53-59.
16. Apple FS. Postmortem tricyclic concentrations: Assessing cause of death using parent drug to metabolite ratio. *J Anal Toxicol* 1989; 13: 197-198.
17. Sztajnkrzyca MD. Valproic acid toxicity: overview and management. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002; 40: 789-801.
18. Nau H, Löscher W. Valproic acid and metabolites: pharmacological and toxicological studies. *Epilepsia* 1984; 25 Suppl 1: S14-S22.
19. Löscher W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol* 1999; 58: 31-59.
20. Snodgrass WR. Valproic acid. In: Brent J, Wallace KL, Burkhart KK, Phillips SD, Donovan JW. *Critical care toxicology: diagnosis and management of the critically poisoned patient.* Elsevier, Philadelphia 2005; 565-569.
21. Kreher U, Darius J, Wien F. Establishing individual metabolite patterns for patients on valproate therapy. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2001; 26: 99-107.

22. Sugimoto T, Muro H, Woo M, Nishida N, Murakami K. Metabolite profiles in patients on high-dose valproate monotherapy. *Epilepsy Res* 1996; 25: 107-112.

Adres do korespondencji

Jolanta Wilimowska
Zakład Diagnostyki
Szpital Uniwersytecki w Krakowie
ul. Kopernika 15 B
31-501 Kraków, Polska
e-mail: jolanta.wilimowska@gmail.com

Address for correspondence

Jolanta Wilimowska
Department of Diagnostics
University Hospital in Krakow
Kopernika 15B
31-501 Krakow, Poland
e-mail: jolanta.wilimowska@gmail.com