

**Uniwersytet
Collegium**



**Jagielloński
Medicum**

Beata Bystrowska

**Zastosowanie metody chromatografii cieczowej z detekcją
masową do oceny stężeń leków i ich metabolitów w zatruciach na
przykładzie karbamazepiny.**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. Małgorzata Kłys

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej CMUJ

Bibl. Medyczna CMUJ



1816036024

Kraków 2002

Spis treści:

1.	Część teoretyczna	5
1.1	Wprowadzenie.....	6
1.1.1	Dane statystyczne.....	8
1.1.2	Metody analityczne w toksykologii.....	10
1.2	Chromatografia cieczowa z detektorem masowym (LC/MS).....	12
1.2.1	Elektrosprej.....	15
1.2.2	Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI).....	16
1.2.3	Tandemowa spektrometria mas.....	18
1.3	Karbamazepina.....	20
1.3.1	Dane farmakologiczne.....	20
1.3.2	Toksyczność karbamazepiny.....	21
1.3.3	Metabolizm karbamazepiny.....	21
1.3.4	Dane toksykokinetyczne.....	24
2.	Cel pracy	26
3.	Część doświadczalna	27
3.1	Metodyka badań.....	28
3.1.1	Materiał.....	28
3.1.2	Metodyka przygotowania analitów.....	28
3.1.3	Metodyka oznaczania.....	29
3.1.3.1	Chromatografia cieczowa.....	29
3.1.3.2	Detekcja.....	31
3.2	Wyniki.....	32
3.2.1	Identyfikacja CBZ, CBZ-E i CBZ-OH	32
3.3	Walidacja metody.....	38
3.3.1	Specyficzność i selektywność.....	38
3.3.2	Liniiowość.....	40
3.3.3	Czułość.....	42
3.3.4	Dokładność i precyzja.....	42
3.3.5	Odzysk.....	43
4.	Analiza przypadków zatruc karbamazepiną	46
4.1	Zatrucia bez skutku śmiertelnego.....	47

4.2	Zatrucia śmiertelne.....	52
4.3	Karbamazepina w terapii.....	57
4.4	Analiza pozostałych materiałów biologicznych pochodzących z zatrucia karbamazepiną.....	60
4.4.1	Tkanka mózgowa.....	60
4.4.2	Płyny ustrojowe.....	64
4.5	Analiza metabolitów karbamazepiny.....	66
5.	Omówienie wyników.....	75
6.	Wnioski	87
7.	Piśmiennictwo.....	88
8.	Streszczenie.....	100

*Składam serdeczne podziękowania pani
dr hab. Małgorzacie Kłys
za opiekę, cenne wskazówki i wszelką pomoc w
wykonaniu tej pracy.
Pragnę również podziękować wszystkim z pracowni
toksykologicznej Krakowskiego Zakładu Medycyny
Sądowej za okazaną pomoc i życzliwość w trakcie
realizacji badań.*

I. Część teoretyczna

1.1 Wprowadzenie

Zgodnie z podstawową definicją toksykologia jest nauką zajmującą się badaniem toksyczności ksenobiotyków oraz relacjami pomiędzy substancjami toksycznymi i organizmem żywym. Początki toksykologii są ściśle powiązane z toksykologią sądową, która będąc częścią współczesnej medycyny sądowej zajmuje się opiniowaniem w tych wszystkich przypadkach, w których działanie trucizny w pojęciu kodeksu karnego doprowadziło do uszkodzenia na zdrowiu ciała ze śmiercią włącznie [57, 91, 107, 127].

Historia trucizn rozpoczęła się wraz z rozwojem cywilizacji. Najstarszą trucizną, która towarzyszy człowiekowi od momentu opanowania umiejętności rozpalania ognia jest tlenek węgla. Do innych trucizn znanych od dawna należą jady zwierzęce, trucizny roślinne i metaliczne.

W Starożytności trucizny stanowiły ulubione narzędzie w rękach przestępców, co było związane z niemożnością wykrycia ich w materiale biologicznym. Odzwierciedleniem zainteresowania truciznami są prace Hipokratesa, Arystotelesa i Theophrasta opisujące działania trucizn roślinnych, ich właściwości, możliwości zastosowania w medycynie a także leczenie w razie przedawkowania.

Inną dziedziną, w której w podobnym stopniu interesowano się truciznami był system prawny. Było to związane ze stosowaniem związków trujących jako narzędzi zbrodni. Brak sposobu wykrycia użytej trucizny dawał szerokie możliwości zarówno łamiącym prawo jak i sędziom wydającym wyroki.

W świetle takich faktów postępował rozwój nauk toksykologicznych, natomiast za przełomowy moment w rozwoju tej gałęzi nauki uważany jest okres, w którym Mateo Bonawetura Orfila, wybitny hiszpański lekarz i chemik opublikował swoje dzieło pt. „Toksykologia ogólna” w 1813 roku i tym samym rozpoczął nowy etap w historii nauk toksykologicznych, a zarazem w medycynie sądowej. Udowodnił on szczególną rolę analizy chemiczno-toksykologicznej w ustalaniu przyczyny zatrucia, ponadto wprowadził liczne metody wykrywania trucizn w materiale biologicznym. W opracowywaniu opisanych metod wykorzystał wyniki eksperymentów na zwierzętach [91, 127].

Narzędziem, którym posługuje się toksykologia sądowa jest ekspertyza chemiczno-toksykologiczna, stanowiąca jeden z elementów tzw. opinii sądowo-lekarskiej.

Opinia o przyczynie śmierci ma charakter kompleksowy i obejmuje: informacje o wszystkich okolicznościach, które mogły doprowadzić do zgonu; opinię lekarza sądowego dotyczącą badania makro- i mikroskopowego oraz wynik analizy chemiczno-

toksykologicznej materiału pobranego od denata i ewentualnych dowodów rzeczowych znalezionych przy nim. Ekspertyza chemiczno-toksykologiczna jest integralną częścią opinii sądowo-lekarskiej, pozwalającej ustalić związki przyczynowe pomiędzy ekspozycją organizmu żywego na określony ksenobiotyk a odpowiedzią organizmu w postaci efektu biologicznego ze śmiercią włącznie [69, 72, 91].

W medycynie sądowej wynik ekspertyzy toksykologicznej może mieć charakter rozstrzygający. W nieco młodszej dziedzinie - toksykologii klinicznej, wynik analizy toksykologicznej badanego materiału ma charakter pomocniczy zarówno w diagnozie, jak i w leczeniu zatrucia, jest również pomocny w ocenie stanu zdrowia pacjenta [14, 38, 69, 72, 73, 81, 92, 94].

Obecnie, w związku z rozwojem nauk biomedycznych, a także powstawaniem nowych związków chemicznych o działaniu farmakologicznym, w tym leków nowej generacji, możliwość kontaktu z substancjami potencjalnie toksycznymi stale wzrasta. Łatwiejszy dostęp do tak szerokiej grupy ksenobiotyków powoduje, że problem diagnozowania zatruc, przyczyny zgonu z zatrucia, stał się jednym z trudniejszych zadań postawionych przed toksykologiem. Duże znaczenie ma sam wynik analizy chemicznej, jednakże musi on być oparty o rzetelną i szeroką wiedzę badacza [25, 35, 37, 40, 53, 92, 94].

Współczesna toksykologia zarówno kliniczna, jak i sądowa, stawia nowe zadania przed toksykologiem. Pojawia się problem oznaczenia nie tylko podstawowych związków chemicznych, ale także metabolitów, a nawet markerów narażenia na ksenobiotyk. Stąd duże znaczenie ma poznanie metabolizmu ksenobiotyków, w tym leków. Leki są obecnie jedną z najczęstszych przyczyn ostrych zatruc, a w ich następstwie także i zgonów. Śledzenie przemian metabolicznych w organizmie w postaci prekursorów i metabolitów wykrywanych w tkankach osoby zmarłej, może być wykorzystane w praktyce do rozwiązywania problemów nie tylko klinicznych, ale także i orzecznictwa sądowo-lekarskiego. Wiedza taka stanowi podstawę interpretacji wyników ekspertyzy chemiczno-toksykologicznej, a także pozwala na lepsze zrozumienie mechanizmów działania wielu związków. Stwarza to możliwość zwiększenia efektywności leczenia zatruc w praktyce toksykologii klinicznej oraz w przypadku opiniowania sądowo-lekarskiego pozwala na korzystanie z utworzonej w ten sposób bazy danych o przyczynie zatrucia i zgonu denata [4, 14, 38, 39, 69, 72, 82, 124, 132].

Niezwykle ważnym zagadnieniem jest rozpatrywanie przypadków zatruc, w których obok zachodzących przemian metabolicznych ksenobiotyku pojawia się problem interakcji zarówno toksykokinetycznych jak i toksykodynamicznych. Poznanie tych procesów pozwala na pewniejszą interpretację uzyskanych wyników, uwzględniając towarzyszące zatruciu

objawy i okoliczności zgonu, jeśli są one znane [32, 42, 49, 67, 68, 98, 107, 113, 114, 119, 129, 130, 141].

Poznanie większości przemian metabolicznych ksenobiotyków (leków) wiąże się z koniecznością rozwoju nowych metod analitycznych, dzięki którym możliwe jest uchwycenie bardzo niskich stężeń oznaczanych związków w materiale biologicznym oraz wykrycie powstających metabolitów z dużą precyzją, dokładnością i wiarygodnością [9, 10, 25, 29, 35, 73, 77].

W medycynie sądowej, do wydania opinii o przyczynie śmierci z powodu zatrucia, konieczna jest nie tylko interpretacja wyników jakościowych i ilościowych analizy chemiczno-toksykologicznej, ale również konfrontacja tych wyników z danymi klinicznymi i sekcyjnymi oraz wiedzą o mechanizmie działania trucizny. Wykazanie obecności metabolitów, czasami przy braku macierzystego leku, może mieć kluczowe znaczenie dla ustalenia przyczyny zgonu [4, 37, 82, 95, 104, 121].

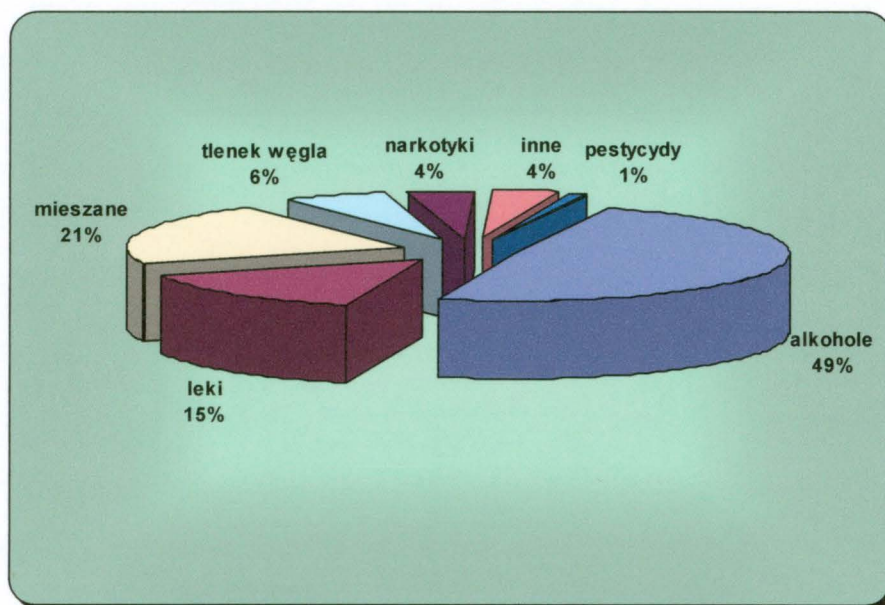
1.1.1 Dane statystyczne

Statystyka toksykologiczna w Polsce w ostatnich 10 latach wykazała, że wśród zatruc bez skutku śmiertelnego leki znajdują się na II miejscu po zatruciach alkoholem etylowym (dotyczy to zarówno zatruc prostych, jak i mieszanych - dane wg Kliniki Toksykologii CMUJ w Krakowie) [ryc. 1], a wśród zatruc śmiertelnych plasują się na III miejscu po zatruciach alkoholem i tlenkiem węgla (dane z Zakładu Medycyny Sądowej CMUJ w Krakowie) [ryc. 2] [65, 70, 91, 107].

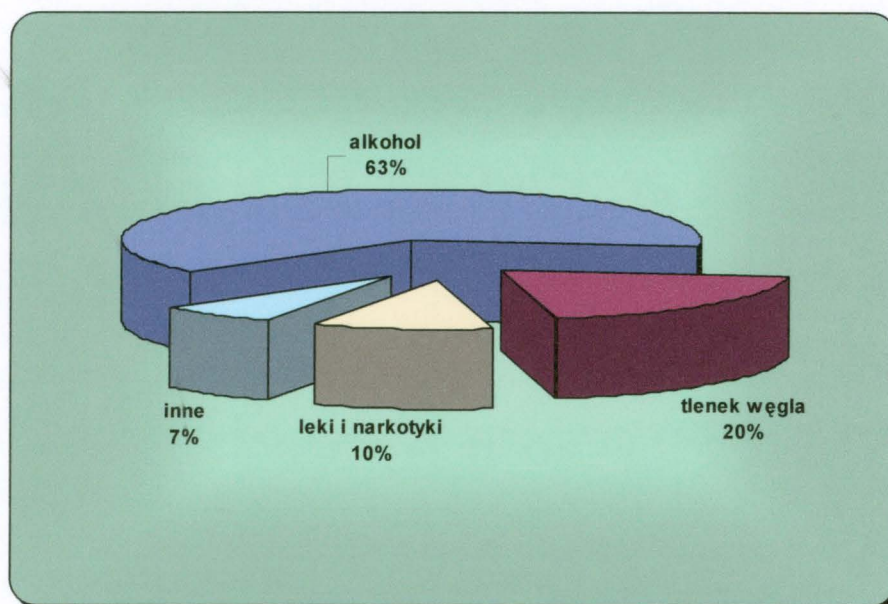
Wśród zatruc śmiertelnych najczęściej spotykaną grupą związków są trójcykliczne leki przeciwdepresyjne oraz mieszaniny leków, a zwłaszcza zatrucia mieszane, często z komponentą alkoholową. Procentowy udział różnych grup leków spotykanych w zatruciach śmiertelnych przedstawiono na ryc. 3 (dane z Zakładu Medycyny Sądowej CMUJ w Krakowie) [91].

Jednym z leków, stosunkowo często przyjmowanych z uwagi na szerokie zastosowanie w leczeniu zespołów psychoruchowych i padaczek jest karbamazepina [Tegretol (Geigy), Amizepin (Polfa)]. Równolegle, ze wzrostem częstości zastosowania leku w terapii, wzrosła liczba zatruc bez skutku śmiertelnego i śmiertelnych spowodowanych przez ten lek. Coraz więcej przypadków ostrych zatruc karbamazepiną trafia na oddział kliniki toksykologicznej i coraz częściej zatruciu towarzyszą inne leki lub/i alkohol etylowy [2, 9, 10, 65, 70, 107].

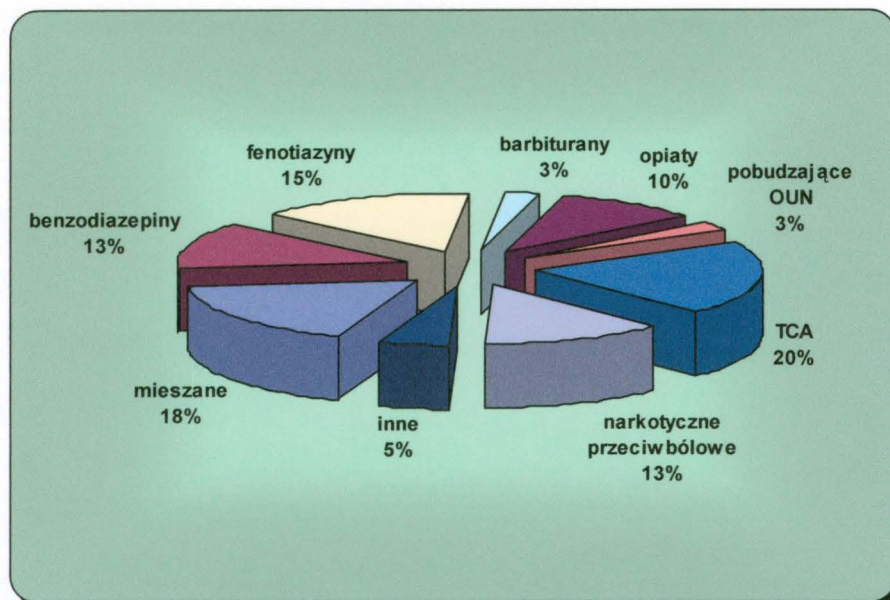
Najczęstszymi przyczynami ostrych zatruc karbamazepiną są przypadkowe spożycia leku przez dzieci oraz samobójcze przyjęcie leku w dawce toksycznej, często łączone z innymi lekami lub etanolem [107, 127].



Ryc. 1. Struktura zatruc śmiertelnych w 1999 roku (dane z Kliniki Toksykologii CMUJ w Krakowie).



Ryc. 2. Struktura zatruc śmiertelnych w 2001 roku (dane na podstawie materiału Zakładu Medycyny Sądowej CMUJ w Krakowie).



Ryc. 3. Procentowy udział najczęściej spotykanych grup leków w przypadkach zatruc śmiertelnych w 2001 roku (dane na podstawie materiału Zakładu Medycyny Sądowej CMUJ w Krakowie).

1.1.2 Metody analityczne w toksykologii

Wprowadzenie nowoczesnych metod instrumentalnych do analityki toksykologicznej, poszerzyło zakres wykorzystania uzyskanych wyników do interpretacji problemów toksykologicznych. Nowe metody uzyskały możliwość detekcji i identyfikacji ksenobiotyków znajdujących się w wieloskładnikowych próbkach, z reguły na niskim poziomie stężeń. Jedną z najnowocześniejszych metod stosowanych do oznaczania leków i metabolitów, zarazem umożliwiającą dogłębną analizę struktur związków chemicznych, są metody chromatograficzne z detekcją masową [14, 20, 40, 51-53, 64, 92, 94, 146].

W analizie toksykologiczno-sądowej i w wielu pokrewnych dziedzinach zastosowanie znalazło sprzężenie detektora masowego z metodami – chromatografii gazowej (GC/MS) oraz ciekłowej (LC/MS). Techniki te różnią się postacią próbki wprowadzanej do detektora masowego (gazowa w GC/MS lub ciekła w LC/MS). Zastosowanie metody chromatograficznej sprzężonej z detektorem masowym daje możliwość wykrycia nawet śladowych stężeń metabolitów. Analiza jonów fragmentarycznych zawartych w widmie masowym umożliwia identyfikację metabolitów [19, 20, 34, 40, 51, 53, 54, 61, 64, 86, 92, 94, 134, 140, 146].

Newralgicznym ogniwem tego rodzaju oznaczenia jest niewątpliwie proces izolowania badanych metabolitów, a dobranie właściwej metody ekstrakcji stanowi kluczowe zadanie dla analityków. Dzięki LC/MS można odpowiedzieć na pytanie, jakie metabolity powstają w reakcjach procesów biotransformacji, w jakim stężeniu, i w jakiej tkance, zwłaszcza gdy dotyczy to oznaczenia w materiale sekcyjnym [10, 73, 101, 136].

Chromatografia cieczowa jest metodą pozwalającą na rozdział badanych substancji wyizolowanych z materiału biologicznego oraz ich ilościowe oznaczenie. Spektrometria mas to metoda dostarczająca głównie informacji o masie i strukturze chemicznej związków. Charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością, a także możliwością wykrywalności bardzo niskich stężeń, dzięki czemu zajmuje szczególne miejsce wśród metod analitycznych, służących do oceny metabolizmu ksenobiotyków [72, 73, 92, 94].

Identyfikacja związków chemicznych w spektrometrii masowej polega na analizie widm masowych badanych substancji, dodatkowym elementem jest możliwość fragmentacji struktury chemicznej i uzyskania kolejnych widm stanowiących potwierdzenie budowy chemicznej badanego związku. Czas retencji w rozdziale chromatograficznym pozwala na dokładniejszą identyfikację związków, a wielkość uzyskanego sygnału jest miarą stężenia [5, 19, 34, 61, 140].

W ostatnich latach wzrosła popularność chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem masowym. W Polsce technika ta została wprowadzona do laboratoriów toksykologicznych w ostatniej dekadzie, stąd tylko kilka placówek dysponuje tą aparaturą.

Możliwości zastosowanie LC/MS w toksykologii są bardzo szerokie. Obejmują m.in. identyfikację ksenobiotyków w procedurze Systematycznej Analizy Toksykologicznej, analizę ksenobiotyków w próbkach biologicznych do celów klinicznych i orzecznich oraz badanie metabolizmu leków w terapii monitorowanej i w zatruciach [37, 40, 44, 51-55, 66, 69, 73, 86, 92, 94, 146].

1.2 Chromatografia cieczowa z detektorem masowym (LC/MS):

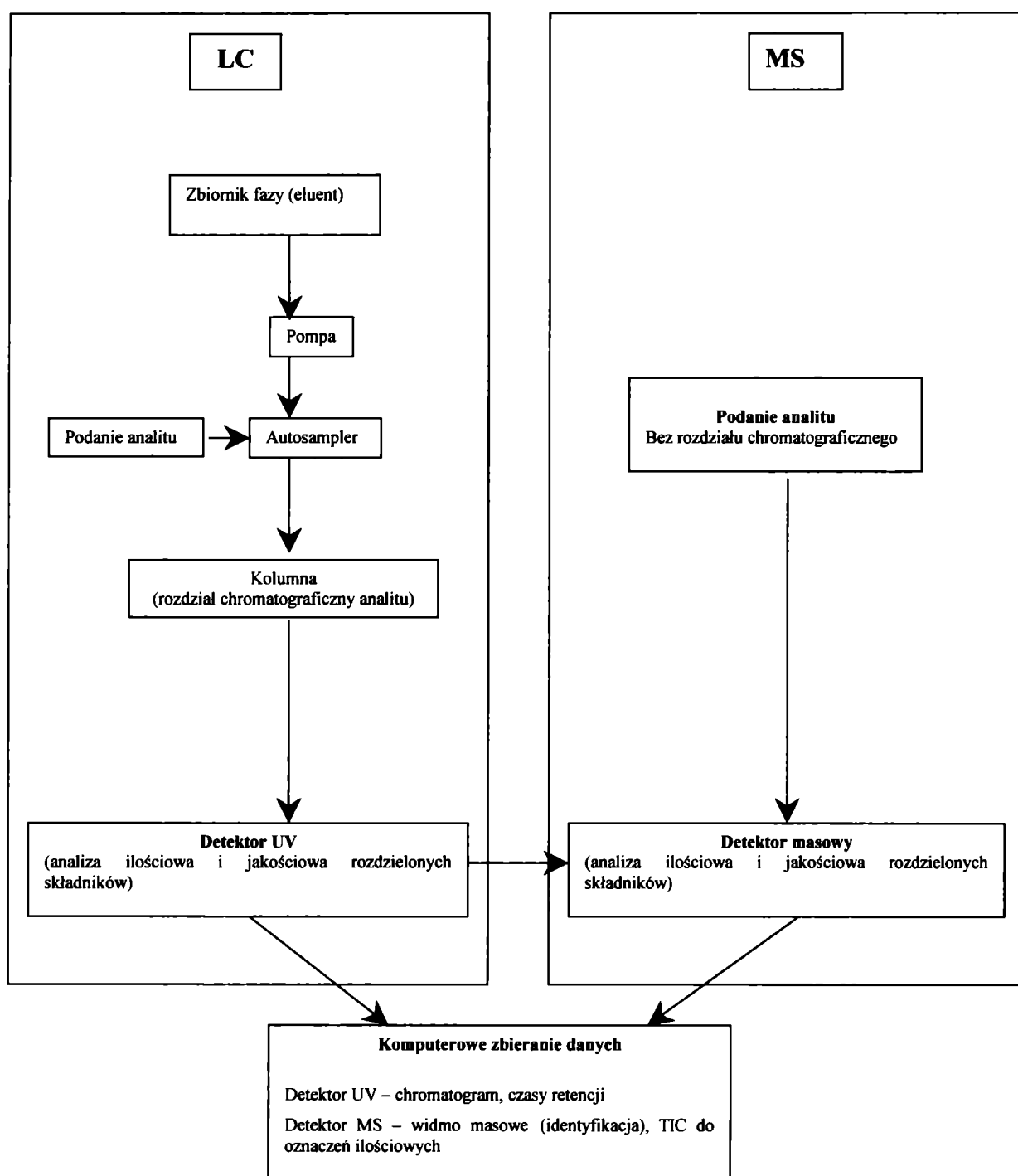
Metoda chromatografii cieczowej z detektorem masowym (LC/MS) łączy w sobie dwie techniki - chromatografię cieczową i spektrometrię masową. Schemat chromatografu cieczowego został przedstawiony na ryc. 4.

Zarówno chromatografia cieczowa, jak i detektor masowy mogą być stosowane jako odrębne metody analizy substancji chemicznych, natomiast ich połączenie stworzyło nowe możliwości. Dotyczy to zwłaszcza tych dziedzin nauk chemicznych, biologicznych i medycznych, w których podstawowym narzędziem pracy są różne techniki a końcowym etapem pracy - wyniki analizy chemicznej różnego rodzaju materiału (w tym również biologicznego). Takie połączenie chromatografii ze spektrometrią mas jest ważne ze względu na uzupełniające się cechy obu technik. Dotyczy to zarówno chromatografii gazowej, jak i cieczowej [5, 19, 20, 34, 40, 54, 61, 86, 92, 94, 146].

Spektrometria mas, stosowana jako samodzielna technika jest metodą o olbrzymich możliwościach identyfikacji czystych substancji, natomiast widma masowe mieszanin są zwykle dosyć skomplikowane, co stanowi poważny problem w ich analizie. Stąd też połączenie chromatografii ze spektrometrią masową dostarcza bardzo skutecznego narzędzia do jakościowej analizy mieszanin złożonych [34, 61].

Chromatografia cieczowa pozwala na rozdział substancji chemicznych znajdujących się w mieszaninie, dzięki zastosowaniu odpowiednich materiałów wypełniających kolumny chromatograficzne oraz odpowiednio dobranym fazom ruchomym w celu otrzymania czystych składników (w przepływającym strumieniu), które pozwalają uzyskać optymalny rozdział. Rozdzielone substancje są następnie identyfikowane i zostaje obliczone ich stężenie. Ostatecznym etapem analizy jest opracowanie uzyskanych wyników, dokonywane z zastosowaniem programów komputerowych [34, 61, 117].

Istnieje wiele rodzajów detektorów, wykorzystujących różne właściwości rozdzielonych związków (UV, spektrofluorymetr, Diode Array Detektor-DAD itp.). Wymogi jakie stawia współczesna toksykologia konstruktorom aparatów stosowanych w analizie chemiczno-toksykologicznej, to opracowanie takich technik, aby wynik uzyskany przy ich zastosowaniu był możliwie wiarygodny i rzetelny [25, 26, 34, 47, 80].



Ryc. 4. Schemat LC/MS.

Idealny detektor chromatograficzny powinien cechować się możliwie najwyższą czułością i uniwersalnością tzn. za jego pomocą można wykrywać wszystkie wychodzące z chromatografu substancje, powinien umożliwiać uzyskanie informacji o strukturze badanych substancji, oraz wykazywać selektywność (w optymalnym przypadku możliwa jest identyfikacja wszystkich rozdzielonych składników). Detektor nie może zmieniać rozdziału chromatograficznego tzn. zmieszania substancji rozdzielonych przed detekcją oraz nie powinien niszczyć badanego związku. Nie powinien też dopuszczać do powstawania artefaktów. Aby można było oznaczać ilościowo badane związki odpowiedź z detektora powinna być proporcjonalna do ich stężenia, mieć stałą lub przynajmniej przewidywalną względną wielkość sygnału wyjściowego i umożliwiać dekonwolucję pików chromatograficznych, tzn. rozłożenie na składniki pików nie rozdzielonych [34].

Spektrometr masowy jest jednym z detektorów, który spełnia powyższe warunki, a dodatkowym korzystnym rozwiązaniem jest możliwość zastosowania go jako samodzielnej techniki lub w postaci sprzężonej z metodami chromatograficznymi jako GC/MS czy LC/MS [40, 61, 92, 94].

Detektor masowy zawiera cztery podstawowe elementy:

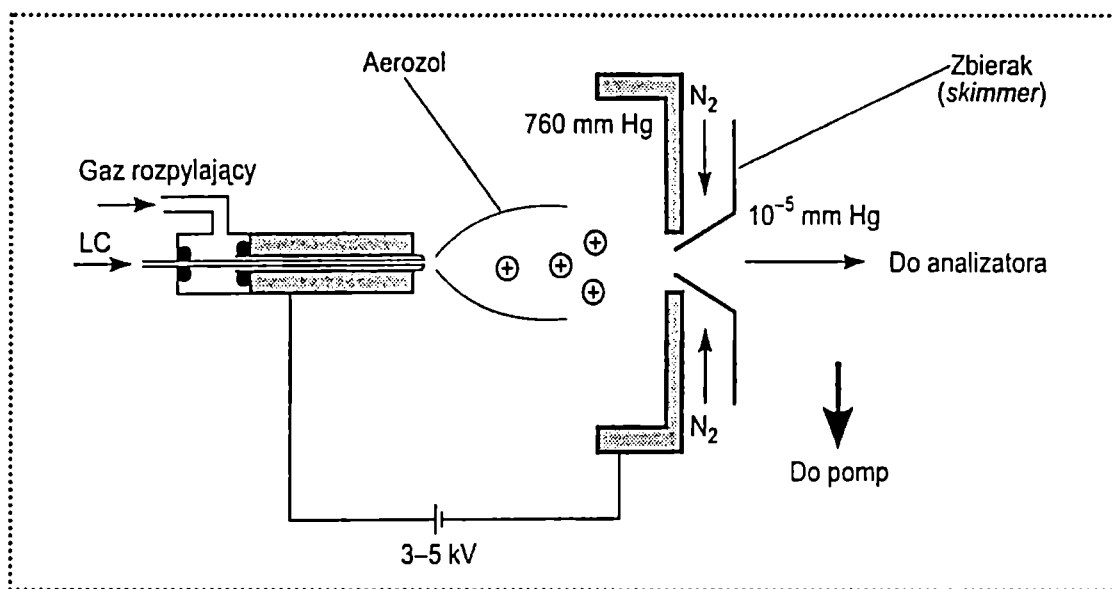
- Źródło jonów, w którym następuje jonizacja próbki
- Analizator, rozdzielający jony w zależności od ich mas. W analizatorze zachodzi dalsza ewentualna fragmentacja wybranych jonów, a następnie ich analizowanie w systemie pułapki jonowej
- Detektor masowy, którego zadaniem jest wykrywanie jonów opuszczających analizator oraz przypisywanie im masy w postaci odpowiednich wartości m/z (m – masa jonu; z – ładunek).
- Analizator (komputer z odpowiednim oprogramowaniem umożliwiającym zbieranie i przetwarzanie danych)-wspólny element w połączeniu z chromatografem.

Badana próbka może być analizowana w spektrometrze masowym tylko w postaci gazowej. W przypadku analizy metodą GC/MS analit opuszczający kolumnę chromatograficzną ma już odpowiednią formę i może bezpośrednio ulec jonizacji w źródle jonów. Przy sprzężeniu chromatografii cieczowej z detektorem masowym jonizacja jest procesem bardziej skomplikowanym, ponieważ próbka musi ulec przekształceniu z formy ciekłej w formę gazową. Można to osiągnąć stosując różne metody łączenia (interfejsowania) w pierwszym etapie analizy spektrometrycznej. Najczęściej stosowaną metodą jest jonizacja

pod ciśnieniem atmosferycznym (API- Atmospheric Pressure Ionization) a zwłaszcza jej dwie odmiany tj. elektrosprej (ESI-Electrospray) i jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI- Atmospheric Pressure Chemical Ionization) [5, 8, 17-20, 27, 34, 44, 61, 143].

1.2.1 Elektrosprej (ESI)

Rozpylanie w polu elektrycznym, polega na wprowadzeniu strumienia cieczy o niewielkim przepływie (zwykle 1- 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) w silne pole elektryczne (rzędu kilku kV) pod ciśnieniem atmosferycznym. Pole powoduje akumulację ładunków w powierzchniowej warstwie cieczy na końcu kapilary, w efekcie powoduje to przekształcenie cieczy w strumień naładowanych kropelek. Krople następnie ulegają kaskadowemu rozszczepieniu, aż do momentu, gdy pole elektryczne na ich powierzchni stanie się wystarczająco duże, aby spowodować desorpcję jonów. Zastosowanie strumienia gorącego i suchego gazu (zwykle azotu), który przepływa pomiędzy przeciwelektrodą a dyszą próbującą, ułatwia odparowanie cząsteczek rozpuszczalnika zebranych wokół jonów i zapobiega ich wniknięciu do części spektrometru mas znajdującej się pod próżnią. Powstające jony przechodzą przez dyszę oraz zbierak wprost do analizatora znajdującego się pod wysoką próżnią.

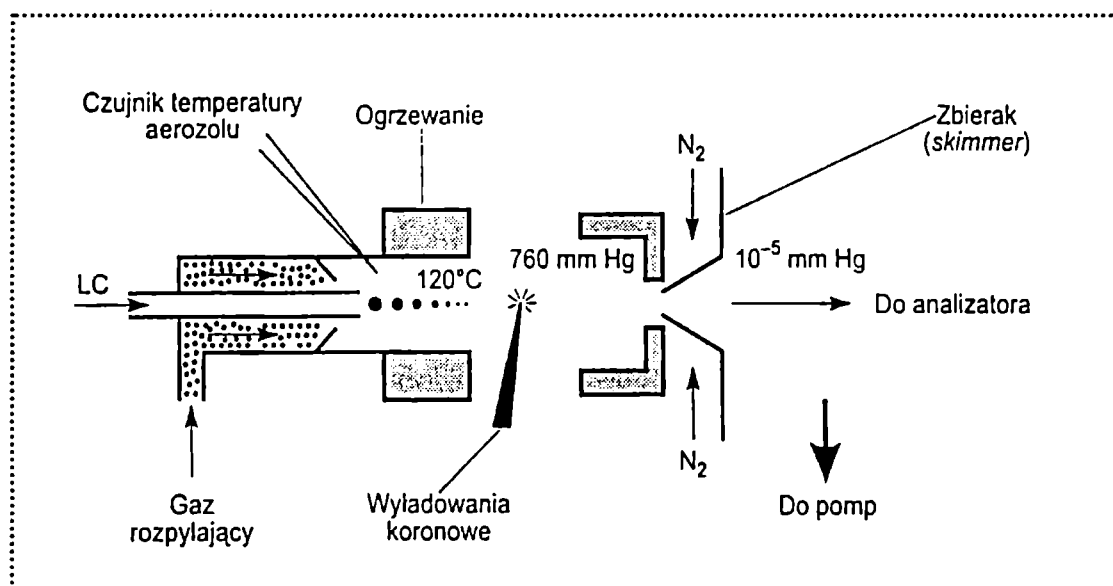


Ryc.5. Schemat jonizacji związków poprzez rozpylanie jonów (jonosprej)

Cechy otrzymanego aerozolu, wyrażone jako średnia wielkość kropelek cieczy i ich ładunek, uzależnione są od rodzaju rozpuszczalnika, szybkości przepływu fazy ciekłej i zastosowanego napięcia. Przy przepływie ponad 5 ml/min źródło ESI wytwarza strumień

zbyt dużych kropelek i otrzymany aerozol jest nietrwały. Podwyższenie napięcia może poprawić jakość aerozolu, ale jednocześnie może powodować wyładowania koronowe, co zakłóca analizę. Aby uzyskać odpowiedni przepływ do wytwarzania trwałego aerozolu, elektrosprej musi być połączony z kolumnami kapilarnymi lub z kolumnami zaopatrzonymi w dzielnik strumienia wychodzącego. Schemat jonizacji związków z zastosowaniem metody ESI przedstawiono na rycinie 5 [5, 19, 20, 27, 44, 103].

Elektrosprej należy do najłagodniejszych metod jonizacji. Generuje pozorne jony molekularne w trybie jonów ujemnych lub dodatnich i umożliwia wyznaczenie względnej masy cząsteczkowej. Do celów identyfikacji struktury poprzez fragmentację może zachodzić konieczność zastosowania innego rodzaju jonizacji [34, 61, 92, 94].



Ryc.6. Schemat źródła jonów APCI

1.2.2 Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI)

Aby doprowadzić do jonizacji związku stosuje się reakcje jon-cząsteczka w fazie gazowej pod ciśnieniem atmosferycznym. Przepływ fazy ruchomej jest nie większy niż 2ml/min. Jest ona wprowadzana bezpośrednio do rozpylacza, gdzie za pomocą strumienia azotu o wysokiej szybkości jest przekształcana w mgłę. Faza ciekła ulega odparowaniu w strumieniu gazu przechodząc przez ogrzewaną rurę kwarcową, zwaną komorą desolwatacyjną lub odparowującą (o temperaturze do 150°C). Ogrzany gaz wraz z cząsteczkami dociera do regionu reakcji w źródle jonów, pod ciśnieniem atmosferycznym, gdzie zachodzi jonizacja badanej substancji przez przeniesienie protonu w trybie jonów dodatnich oraz przez przeniesienie elektronu lub protonu w trybie jonów ujemnych. Rolę gazu jonizującego

odgrywa faza ruchoma, wytwarzając pozorne jony molekularne odpowiednio $[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$. Elektrony niezbędne do otrzymania jonów pierwotnych powstają na skutek wyładowań koronowych lub pochodzą ze źródeł promieniowania β . Jonizacja pierwotna zachodzi z dużą wydajnością ponieważ w ciśnieniu atmosferycznym częstotliwość zderzeń jest bardzo duża dzięki krótkiej średniej drodze swobodnej. Szybka desolvatacja i odparowanie cieczy z kropelek znacznie ogranicza rozkład termiczny, zatem pozorny jon molekularny ma dużą intensywność. Jest to przykład miękkiej jonizacji (soft ionization). Schemat jonizacji APCI przedstawiono na rycinie 6 [5, 17-20, 37, 40, 43, 44, 103].

Metodę jonizacji dobiera się pod kątem analizowanych związków. APCI stosuje się głównie w analizie związków średnio polarnych o masach poniżej 2000 Da, ESI zaś przy analizie wysoko-cząsteczkowych substancji polarnych lub jonowych [34, 61, 92, 94].

Niezależnie od zastosowanej metody jonizacji, stosuje się trzy rodzaje zbierania danych w detektorze spektrometrii mas tj.

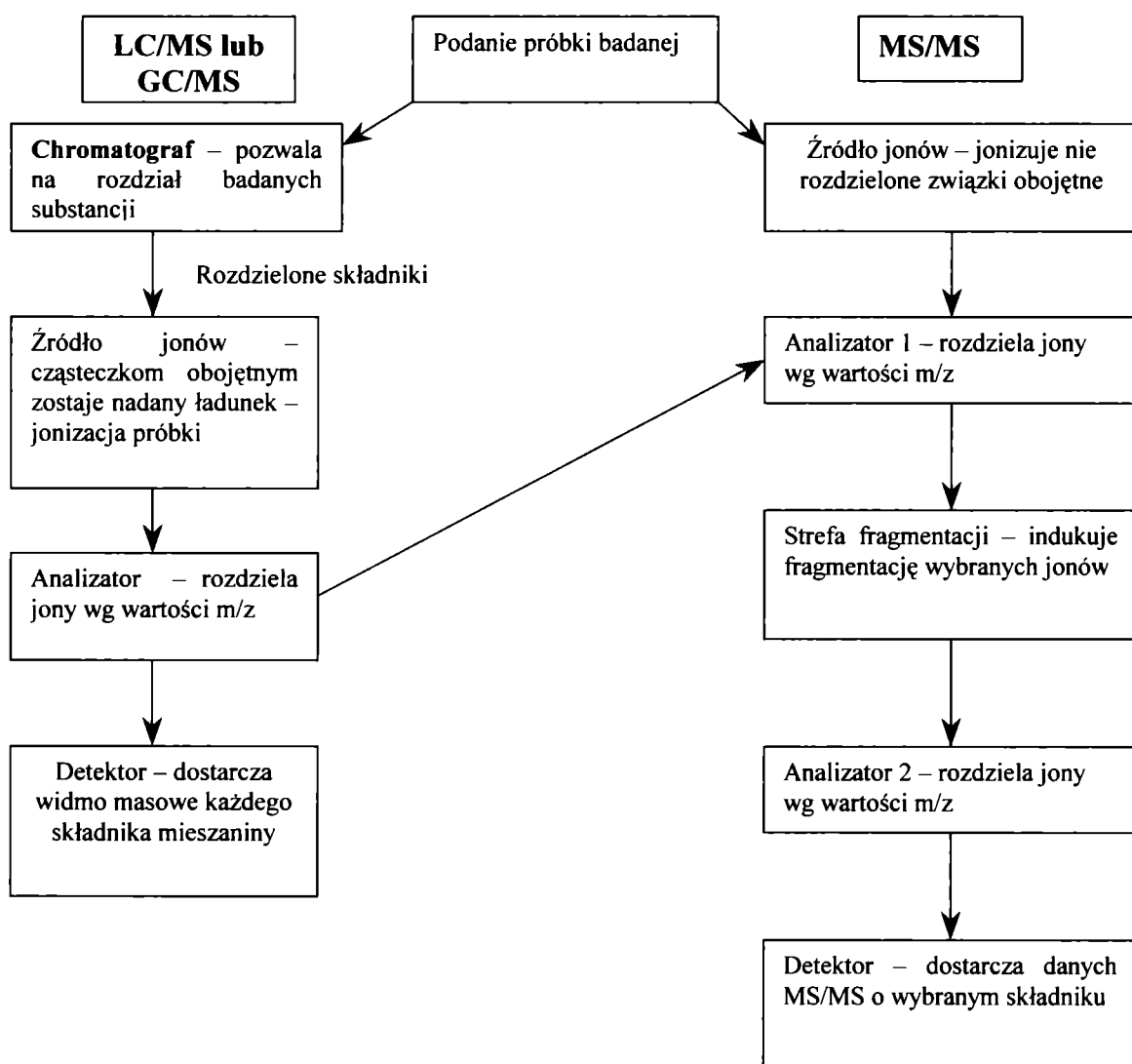
1. Przemiatanie (scanning)
2. Fragmentografia mas – wykrywanie wybranych jonów (SIM)
3. Wykrywanie wybranych reakcji (SRM)

W trybie przemiatania rejestruje się pełne widma masowe między dwoma zadanymi skrajnymi wartościami mas i pomiar ten jest powtarzany z określoną częstotliwością. Im czas akwizycji będzie dłuższy, tym większa będzie czułość ponieważ zwiększy się całkowita liczba zliczanych jonów. Czułość można zwiększyć bądź zmniejszając zakres przemiatanych mas, bądź też przedłużając czas przemiatania. W pierwszym przypadku zachodzi ryzyko utraty informacji analitycznych, w drugim natomiast otrzymania widma złej jakości albo nawet utraty możliwości dekonwolucji dwóch substancji nie rozdzielonych i wychodzących w tym samym pikie chromatograficznym.

Jeżeli celem analizy jest wykrycie określonych substancji o znanych widmach z największą czułością można zastosować fragmentografię mas (SIM) czyli monitorowanie wybranych jonów typowych dla analizowanej substancji. Wykrywanie wybranych reakcji (SRM) umożliwia dalsze zwiększenie czułości i selektywności w porównaniu z SIM. SRM polegające na wykrywaniu reakcji rozpadu jonów charakterystycznych dla analizowanej substancji, wymaga zastosowania spektrometru tandemowego [34, 61].

1.2.3 Tandemowa spektrometria mas:

Tandemowa spektrometria mas (MS/MS...) polega na poddaniu fragmentacji jonów macierzystych, wytworzonych w pierwszym etapie analizy, celem wytworzenia jonów potomnych. Jony potomne można poddawać dalszym procesom fragmentacji. Stwarza to możliwości zbadania struktury nieznanego związku, znajdujących się w analizowanej próbce. Proces ustalania struktury jest zabiegiem dosyć skomplikowanym, jednakże ma bardzo duże znaczenie, zwłaszcza w analizie próbek zawierających leki i ich metabolity. Istotnym czynnikiem, który ma znaczenie w tandemowej spektrometrii mas jest rodzaj zastosowanego analizatora [34, 61].



Ryc. 7. Schemat porównujący działanie chromatografii sprzężonej z detektorem masowym (LC/MS lub GC/MS) oraz opcję tandemowej spektrometrii mas (MS/MS...).

Obecnie istnieje wiele typów analizatorów. Do najczęściej stosowanych należy analizator kwadrupolowy oraz jego specyficzna odmiana tj. kwadrupolowa pułapka jonowa (ion trap). Spektrometry masowe stosujące jako analizator pułapkę jonową są obecnie najczęściej stosowanymi aparatami w laboratoriach dokonujących analizy chemicznej [34, 61, 92, 94].

Działanie pułapki jonowej polega na wylapywaniu przez specjalną elektrodę o kształcie zbliżonym do torusa, wytworzonych w analizatorze jonów o różnych masach, gdzie krążą w polu elektrycznym po torze w kształcie trójwymiarowej ósemki. Jony wysyłane są kolejno w funkcji ich mas do detektora w celu otrzymania widma. W miarę upływu czasu jony ulegają fragmentacji wewnątrz pułapki, można więc, poddając je selektywnej ekspulsji, otrzymać jony fragmentaryczne pochodzące od jonu macierzystego o wybranej masie. Zaletą detektora z analizatorem typu pułapki jonowej jest fakt, że fragmentacja wybranych jonów w tym typie analizatora zachodzi w „czasie” zamiast w „przestrzeni”, co usuwa konieczność stosowania wielu sprzężonych analizatorów (taka konieczność zachodzi w przypadku detektora z analizatorem kwadrupolowym). Kolejne etapy fragmentacji są realizowane w tym samym aparacie, osiągając liczbę możliwych etapów 7-8 [34, 61, 92, 94].

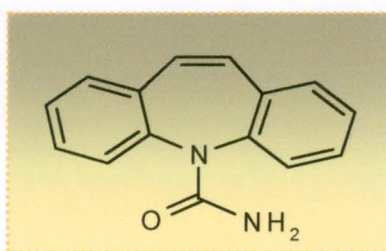
Schemat porównujący działanie chromatografii sprzężonej z detektorem masowym i opcję tandemowej spektrometrii mas (MS/MS...) przedstawiono na rycinie 7.

1.3 Karbamazepina

1.3.1 Dane farmakologiczne:

Pod względem chemicznym jest to pochodna iminostilbenu o budowie chemicznej zbliżonej do trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych. Chemicznie jest to amid kwasu 5H-dibenzo[b,f]azepino-5-karboksyłowego. Wzór chemiczny karbamazepiny przedstawiono na rycinie 8 [2, 23, 109, 116].

Stosowana jest w napadach ruchowych prostych i uogólnionych oraz toniczno - klonicznych. Niezależnie od właściwości przeciwdrgawkowych jest stosowana w neuralgii nerwu trójdzielnego oraz w przypadkach chorób afektywnych opornych na leczenie solami litu. Ma znaczące działanie uspokajające, cholinolityczne i antydiuretyczne. Jej skuteczność jest porównywalna ze skutecznością pochodnych hydantoiny, fenobarbitalu i prymidonu. Karbamazepina jest szczególnie polecana w terapii u dzieci, u których występuje niedorozwój emocjonalny [2, 16, 23, 32, 85, 116, 144].



Ryc. 8. Karbamazepina.

Mechanizm działania tego leku polega na stabilizacji błon komórkowych, wpływając na napięciowo zależne kanały sodowe (co modyfikuje przewodnictwo sodowe) a w następstwie hamuje fosforylację białek regulowaną układem Ca⁺⁺- kalmodulina, konieczną do uwalniania neuroprzekaźników hamujących (m.in. serotoniny, dopaminy) oraz zmniejsza pobudliwość błony neuronu. Działa przez zwiększenie hamowania postsynaptycznego i hiperpolaryzację błony komórkowej. Hamuje aktywność ośrodku nerwu trójdzielnego [6, 58, 60, 63, 78, 79, 85, 100, 105, 106, 109, 116, 144, 147].

Działanie przeciwdrgawkowe polega na zdolności tego leku do zmniejszenia transmisji w jądrze przedsionkowym przedniej części wzgórza (pola, gdzie dochodzi do tworzenia i rozprzestrzeniania się zmian epileptycznych). Karbamazepina obniża poskruczową

wrażliwość organizmu i może działać ochronnie zwiększając stężenie cyklicznego AMP (cAMP) [7].

Zakres stężeń terapeutycznych dla karbamazepiny wynosi 4-12 mg/l. Objętość dystrybucji leku wynosi 0,8 –2 l/kg i w zatruciu zwiększa się do 3,0 l/kg masy ciała. Biologiczny okres półtrwania dla karbamazepiny jest uzależniony od autoindukcyjnego działania samego leku i mieści się w granicach 20-65 godzin. Przenika barierę krew-mózg, przenika do płynu owodniowego i mleka matki (gdzie może osiągać stężenie w wysokości 60% stężenia w surowicy).

We krwi ulega wiązaniu z białkami w 60 - 85% (głównie z albuminami i α_1 kwaśną glikoproteina). W 1 – 2% wydalana się z moczem w stanie nie zmienionym, ok. 72% jest wydalane z moczem w formie metabolitów, około 15-30% przyjętej dawki jest wydalane z kałem [2, 23, 85, 109, 118, 124, 132, 144].

1.3.2 Toksyczność karbamazepiny:

Do zatruć ostrych najczęściej dochodzi na skutek próby samobójczej, najczęściej wśród pacjentów już leczonych psychiatrycznie. Dodatkowym czynnikiem działającym niekorzystnie jest fakt interakcji karbamazepiny z innymi lekami (np. TCA) lub etanolem (co często jest wykorzystywane w próbach samobójczych).

Objawami przedawkowania są: ze strony OUN - pobudzenie psychoruchowe, bóle i zawroty głowy, zaburzenia świadomości, równowagi, senność przechodząca w śpiączkę, drżenia mięśniowe, drgawki; ze strony układu krążenia – tachykardia, spadek ciśnienia tętniczego krwi, zaburzenia rytmu; ze strony układu oddechowego – spłycenia oddechu, porażenie ośrodka oddechowego; skóra i błony śluzowe – zaczerwienienie, suchość i wzrost temperatury; narządy zmysłu – poszerzenie źrenic, zaburzenia widzenia [85, 107, 116, 124, 132, 144].

1.3.3 Metabolizm karbamazepiny:

Zgodnie z danymi z piśmiennictwa głównym szlakiem metabolicznym dla karbamazepiny jest tworzenie 10,11-epoksykarbamazepiny przy udziale monooksygenaz wątrobowych w obecności cytochromu P-450, następnie przekształcenie go w formę diolową poprzez hydrolazę epoksydową frakcji mikrosomalnej. W tej postaci ulega sprzęganiu z glukuronianami i jest wydalana z moczem [3, 11, 13, 31, 50, 62, 83, 89, 97, 119].

Inną drogą metaboliczną jest tworzenie N-glukuronianów oraz hydroksylacja pierścienia z utworzeniem mono- i dihydroksypochodnych metabolitów [ryc. 9] [3, 13, 83, 89].

Opisano 33 metabolity karbamazepiny [82, 83, 85, 89]. Ze względu na to, że epoksyd karbamazepiny wykazuje aktywność farmakologiczną zbliżoną do leku pierwotnego i jego wolna frakcja w osoczu jest dwukrotnie wyższa niż leku macierzystego (nie wiąże się z α_1 kwaśną glikoproteina), ten szlak metaboliczny ma największe znaczenie w terapii, a zwłaszcza gdy stosowane są inne leki, w tym przeciwpadaczkowe, co ma duże znaczenie zarówno w terapii jak i w przebiegu zatruc. W związku z tym faktem istotnym elementem jest oznaczanie stężenia tego metabolitu w surowicy krwi pacjentów podczas ustalania dawkowania. Referencyjny zakres stężeń nie został ustalony, ale dotychczasowe badania sugerują zakres 0,4 - 4 mg/l [10, 13, 95, 115, 118, 131].

Badania dotyczące karbamazepiny opisane w literaturze podają, że 25% przyjętej dawki w przypadku monoterapii ulega przemianom do epoksydu, natomiast w politerapii aż 40 – 50% przyjętego leku. Jest to związane ze zjawiskiem indukcji enzymatycznej [85, 87].

Karbamazepina jest lekiem wykazującym właściwości indukujące przemiany enzymatyczne w organizmie (w tym również ma właściwości autoindukcyjne tj. wpływa na zmianę przebiegu własnego metabolizmu). Ze względu na to, iż większość przemian metabolicznych zachodzi w wątrobie, w tym narządzie występuje największe zróżnicowanie enzymów. Najszerszą grupę stanowi cytochrom P450, który ma szereg izoform odpowiedzialnych za biotransformację różnych grup ksenobiotyków [22, 23, 30, 39, 45, 102, 129, 130].

Izozym CYP3A stanowi jedną z grup izoform cytochromu P450, a w tej grupie izozym CYP3A4 stanowi główną formę w tkance wątrobowej u dorosłych [45, 102, 104, 129, 130].

Badania nad zjawiskiem indukcji enzymatycznej leków wskazują, że karbamazepina indukuje izozym CYP3A4 oraz CYP2C8 [32, 33, 45, 48, 97, 104, 108, 133]. Kolejno - główny metabolit 10,11-epoksykarbamazepina, wykazuje właściwości indukujące cytochromy wątrobowe CYP2B i CYP3A (CYP3A5, CYP3A6, CYP3A7, CYP1A2) [45, 58, 76, 84, 108, 129-131, 133].

1.3.4 Dane toksykokinetyczne:

Eliminacja leków może zachodzić w procesie kinetycznym I-go rzędu (zależnym od stężenia) lub zerowego rzędu (wysyceniowy, Michaelisa-Menten). W zakresie stężeń terapeutycznych eliminacja przebiega zazwyczaj według kinetyki I-go rzędu, stąd wzrost ilości aktywnego leku pozwala obserwować liniowy wzrost stężenia (można obliczyć stężenie końcowe). W zatruciu wysycenie enzymów ogranicza kinetykę do zerowego rzędu, co może oznaczać, że nawet małe zmiany w dawce leku mogą powodować duże lub nieprzewidywalne zmiany stężenia leku w osoczu [2, 23, 32, 107, 124, 127, 132].

W zatruciu zmienia się znaczenie dróg biorących udział w eliminacji leku. W granicach stężeń terapeutycznych największy udział w eliminacji leku ma wątroba, gdzie zachodzą procesy metaboliczne, a następnie nerki, które biorą udział w eliminacji metabolitów z ustroju, wydalając je z moczem. Gdy dochodzi do zatrucia, obie drogi eliminacji mają równorzędne znaczenie, co przejawia się m.in. obecnością dużych stężeń niezmienionego leku w moczu. W przypadku zatrucia karbamazepiną stwierdzono znaczący udział krążenia wątrobowo-jelitowego w przebiegu klinicznego obrazu zatrucia. Ze względu na słabą rozpuszczalność leku w wodzie eliminacja przejawia się ekstremalnie szerokim plateau zmian stężenia w osoczu (120 – 180 godzin). Stan kliniczny zatrutego pogarsza farmakologiczna aktywność metabolitu – 10,11-epoksykarbamazepiny oraz w przypadkach wielolekowych zatruc interakcje przejawiające się blokowaniem metabolizmu karbamazepiny [2, 23, 32, 107].

Klirens karbamazepiny jest zależny od dwóch czynników – wieku pacjenta (współczynnik stężenie/dawka dla tego leku wzrasta liniowo z wiekiem) i zastosowanego schematu leczenia tj. mono- lub politerapii. [2, 23, 30, 32, 85, 87, 112, 115, 118, 131].

Istotnym problemem, który należy uwzględnić w terapii jest możliwość wystąpienia interakcji zastosowanego leku z innymi ksenobiotykami obecnymi w ustroju. Interakcje lek-lek w przypadku karbamazepiny mogą przebiegać w kilku postaciach:

- 1) zjawiska autoindukcji czyli wpływu na przebieg własnego metabolizmu przejawiające się zwiększeniem wskaźnika klirensu dla CBZ, skróceniem biologicznego okresu półtrwania oraz zmniejszeniem stężenia leku w surowicy (co ma znaczenie w początkowym okresie leczenia i musi być uwzględniane przez klinicystów) [2, 23, 32, 85].

- 2) możliwości indukowania metabolizmu innych leków przeciwdrgawkowych (zmiana klirensu dla fenytoiny, primidonu, kwasu walproinowego, klonazepamu i etosuksymidu – zwiększenie szybkości przemian metabolicznych) [23, 84, 85].
- 3) możliwości wpływu innych leków włączonych do terapii pacjentów cierpiących na padaczkę, które mogą indukować metabolizm CBZ, powodując zwiększenie lub zmniejszenie stężenia tego leku w surowicy [2, 23, 85].
- 4) hamowania metabolizmu karbamazepiny przez inne leki, co może spowodować wystąpienie objawów niepożądanych lub nawet doprowadzić do zatrucia w krótkim okresie czasu. Do takich leków należą m.in. antybiotyki makrolidowe, cymetydyna, propoxyfen, kwas walproinowy i izoniazyd [42, 78, 85, 123, 126].

Obok interakcji typu lek-lek mogą wystąpić również interakcje z innymi związkami np. z etanolem. Etanol jest ksenobiotykiem o bardzo dużym znaczeniu zarówno w toksykologii klinicznej jak i w orzecznictwie sądowo-lekarskim. Alkohol etylowy ma właściwości indukujące metabolizm wątrobowy (indukcja enzymatyczna), jak również może wypierać leki z wiązania z białkami surowicy krwi, co prowadzi do zwiększenia stężenia aktywnej formy leku i może spowodować wystąpienie objawów zatrucia. W przypadkach zatruc, gdzie obok leku występuje etanol należy zawsze uwzględnić taką możliwość w interpretacji wyników [10, 23, 32, 42, 81, 91, 107, 114, 127].

2. Cel pracy

Celem pracy jest ocena stężeń karbamazepiny i jej metabolitów w materiale biologicznym, pochodzącym z przypadków zatruc bez skutku śmiertelnego i śmiertelnych oraz prześledzenie zmian w przebiegu procesów biotransformacji tego leku w zatruciach na podstawie wyników uzyskanych metodą HPLC/MS.

Ocena ta, poprzedzona została opracowaniem metodycznym, obejmującym badanie identyfikacyjne wzorców karbamazepiny i metabolitów oraz procedurę walidacyjną.

Uzyskane wyniki mogą stanowić toksykologiczną bazę danych dla karbamazepiny celem wykorzystania przede wszystkim w ekspertyzie chemiczno-toksykologicznej. Niektóre wnioski, wypływające z prześledzenia zmian stężeń metabolitów karbamazepiny w interakcjach, mogą mieć znaczenie nie tylko w leczeniu zatruc, ale także w terapii psychiatrycznej.

II. Część doświadczalna

3.1 Metodyka badań

3.1.1 *Material:*

- Wzorce analityczne karbamazepiny (**CBZ**) i epoksykarmazepiny (**CBZ-E**) zakupione w firmie Sigma (USA), oraz 10,11-dihydroksydiolu karbamazepiny (**CBZ-OH**) (Promochem-Polska) w postaci roztworów metanolowych o stężeniach wyjściowych 1mg/ml.
- Wzorce biologiczne:
 - a) próbki surowicy krwi ludzkiej, czystej, pochodzącej ze stacji krwiodawstwa, które wzbogacano CBZ, CBZ-E i CBZ-OH, a następnie poddano procedurze analitycznej – izolacji i oznaczenia w kierunku karbamazepiny i jej dwóch metabolitów (epoksydu i diolu).
 - b) próbki krwi i wątroby sekcyjnej, pochodzące od osób nie zatrutych, sekcjonowanych w Zakładzie Medycyny Sądowej, poddane takiej samej procedurze, jak próbki surowicy czystej.
- Próbki materiału biologicznego:
 - a) surowica krwi pobrana od pacjentów w trakcie hospitalizacji w zatruciu ostrym (liczba próbek surowicy zależała od stanu zdrowia pacjenta przy przyjęciu i procesu leczenia).
 - b) próbki krwi, wątroby i nerki oraz moczu pobieranych w czasie sekcji zwłok osoby, której przyczyną zgonu było zatrucie karbamazepiną; lub karbamazepiną i innymi lekami; lub karbamazepiną i etanolem.
 - c) surowica krwi pacjentów leczonych karbamazepiną w Klinice Psychiatrii.

3.1.2 *Metodyka przygotowania analitów:*

- Przygotowanie metanolowych roztworów karbamazepiny, epoksykarmazepiny i 10,11-dihydroksydiolu karbamazepiny stosowanych przy identyfikacji oraz sporządzaniu krzywej kalibracyjnej do procesu walidacji metody: roztwór metanolowy o stężeniu 1 mg/ml rozcieńczano do stężenia 100 µg/ml.
- Przygotowanie wzorców biologicznych poprzez dodanie metanolowego roztworu CBZ i metabolitów w określonych ilościach do materiałów biologicznych (surowica, krew sekcyjna i wątroba) w celu uzyskania znanych stężeń badanych związków (karmamazepiny i jej metabolitów epoksykarmazepiny i dihydroksydiolu), z których następnie

sporządzano krzywe kalibracji. Jako standard wewnętrzny stosowano metanolowy roztwór chinidyny o stężeniu 10 µg/ml.

- Przygotowanie ekstraktów biologicznych (proces izolowania badanych związków):

Próbki przygotowywano według standardowej procedury, wg następującego schematu:

Do badania pobierano próbki surowicy (0,5g) oraz krwi sekcyjnej, wątroby i nerki (5g). Tkanki były homogenizowane a następnie poddawane procesowi ekstrakcji.

W przypadku tkanki wątroby, w pierwszym etapie homogenat był poddawany procesowi trawienia z zastosowaniem proteazy bydlęcej (pochodzącej z firmy Sigma), w temperaturze 37°C, przez 24 godziny, w środowisku buforu TRIS. Po tym czasie strawioną tkankę przesączano i roztwór poddawano ekstrakcji.

Do homogenatów próbek dodawano standard wewnętrzny - chinidynę (roztwór metanolowy w stężeniu 10mg/l), następnie bufor TRIS (hydroksymetylo-aminometan) o pH=9,0 w stosunku 1:1. Próbki umieszczano w ultradźwiękowej łaźni na 15 minut. Następnie dodawano acetonitryl (proces odbiałczania) w proporcji 1:1,5 i po wymieszaniu wirowano. Zebrany supernatant poddano ekstrakcji octanem etylu w proporcji 1:1, po czym rozdzielono fazy na separatorach firmy Whatman 1PS. Uzyskane fazy organiczne odparowano do sucha na łaźni wodnej. Suche pozostałości rozpuszczano ilościowo w metanolu i poddano analizie metodą LC/MS.

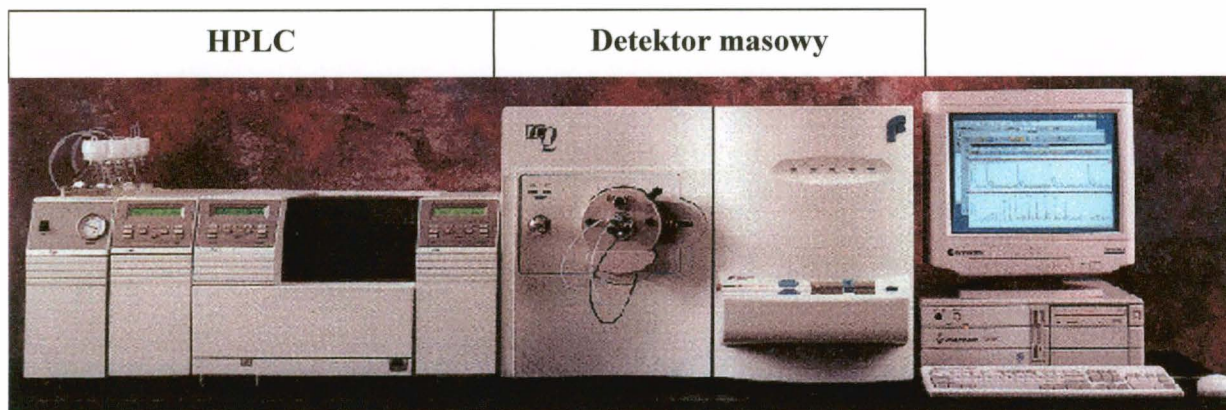
Uzyskane wyniki opracowano komputerowo z wykorzystaniem programów Xcalibur i Excel.

3.1.3 Metodyka oznaczania:

- Warunki analizy chromatograficznej z detekcją masową:

3.1.3.1 Chromatografia cieczowa:

Krakowski Zakład Medycyny Sądowej posiada aparat LC/MS firmy Finnigan Mat w popularnej wersji technicznej, rekomendowanej do celów analityki toksykologicznej, z możliwością pracy w dwóch opcjach jonizacji (ESI/APCI), przedstawiony na rycinie 10.



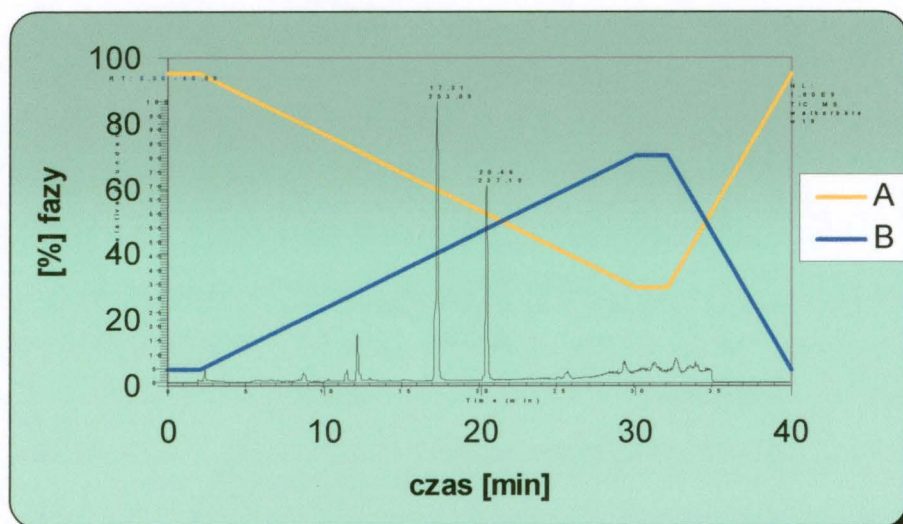
Ryc. 10. Aparat LCQ firmy Finnigan Mat (San Jose), wyposażony w pompę, autosampler, detektor UV oraz detektor masowy.

Do oznaczeń wykorzystano chromatograf cieczowy Finnigan Mat (San Jose, USA) wyposażony w pompę - model TSP 4000 (gradient) i autosampler - model TSP AS 3000 z pętlą o pojemności 10 μ l. Rozdział chromatograficzny prowadzono w systemie gradientowym, z zastosowaniem kolumny Purospher RP 18 (125 x 3 mm I.D., wielkość ziaren 5 μ m) i przedkolumny Lichrocard (4 x 4 mm I.D. z wypełnieniem Lichrospher 60, wielkość ziaren 5 μ m) (Merck, Darmstadt, Germany).

Fazę ruchomą stanowiła mieszanina fazy A – 1 % wodny roztwór kwasu trifluorooctowego (TFA), i fazy B – 90 % acetonitrylu + 10 % fazy A. Przepływ fazy wynosił 0,4 ml/min. W tabeli 1 i na rycinie 11 przedstawiono schemat gradientu do rozdziału karbamazepiny i jej metabolitów.

Tabela 1. Program gradientowego rozdziału chromatograficznego opracowanego dla karbamazepiny i jej metabolitów.

Czas [minuty]	[%] Fazy A	[%] Fazy B
0	95	5
2	95	5
30	30	70
32	30	70
40	95	5



Ryc. 11. Schemat gradientu faz naniesiony na chromatograficzny rozdział karbamazepiny i jej metabolitów

3.1.3.2 *Detekcja:*

Zastosowano detektor masowy LCQ z pułapką jonową (Finnigan Mat, San Jose, USA) ze źródłem jonów w opcji ESI i APCI.

Warunki dla źródła jonów w opcji ESI były następujące: gaz (azot) pod ciśnieniem 70 p.s.i., przepływ gazu (azot) 10ml/minutę, ogrzewanie kapilary do temperatury 200 °C, źródło prądu o natężeniu 100 mA.

Warunki dla źródła jonów w opcji APCI: przepływ gazu nośnego i jonizującego pod ciśnieniem 60 p.s.i., gaz pomocniczy pod ciśnieniem 10 p.s.i., temperatura źródła jonów 450 °C, temperatura kapilary 200 °C, natężenie źródła prądu 100 μ A, napięcie oktapolu 10 μ A.

Widma masowe były badane w zakresie 50 – 650 m/z w trybie jonizacji dodatniej, dla obu opcji źródeł jonizacji tj. opcji ESI i APCI.

Po przeprowadzeniu badań stwierdzono brak istotnych różnic w obu opcjach źródła jonizacji, w związku z tym do dalszej analizy stosowano opcję APCI.

3.2 Wyniki

3.2.1 Identyfikacja CBZ, CBZ-E i CBZ-OH

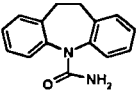
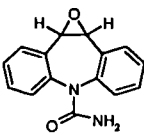
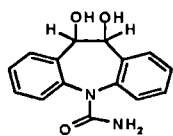
Identyfikację karbamazepiny i jej metabolitów przeprowadzono w oparciu o chromatogramy TIC (Total Ion Current - całkowitego prądu jonowego) [ryc.12, 13] otrzymane z detektora masowego oraz na podstawie widm masowych poszczególnych związków [ryc.14; 15 A, B, C] uzyskanych z analizy roztworów wzorcowych. Przeprowadzono również ocenę matrycy biologicznej w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności związków interferujących z badanymi. Matrycę biologiczną stanowił materiał biologiczny tj. surowica krwi, krew sekcyjna i wątroba nie zawierający badanych związków.

W badanych próbkach oznaczano karbamazepinę ($m/z=236$) i dwa główne metabolity o wartościach $m/z=252$ (epoksyd) i $m/z=270$ (forma diolowa). W zastosowanym trybie jonizacji dodatniej badane związki tworzą pozorny jon molekularny typu $[M+H]^+$, stąd szukane piki w widmach masowych przyjmowały odpowiednio wartości m/z równe 237 dla karbamazepiny, 253 dla formy epoksydowej i 271 dla dihydroksydiolu.

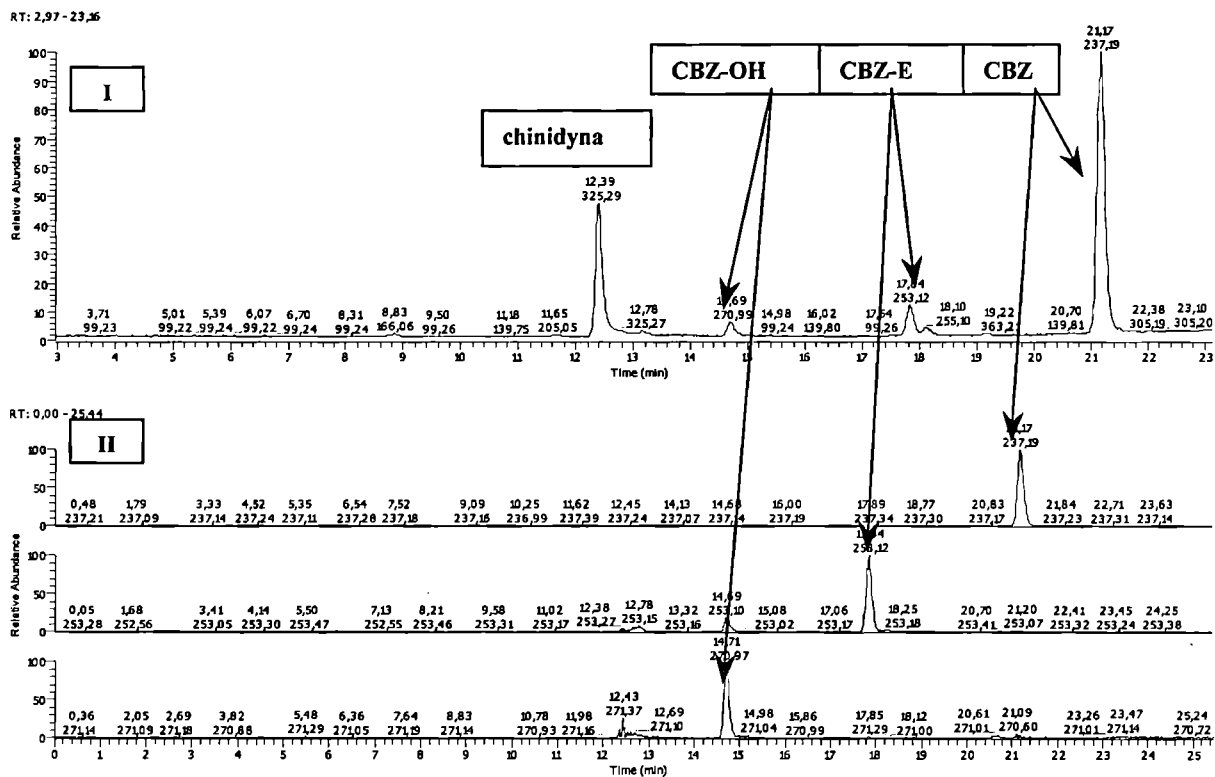
Obecność karbamazepiny stwierdzono na podstawie czasu retencji, uzyskanego z rozdziału chromatograficznego oraz widm masowych prezentujących pik o wartości $m/z=237$ i dwóch pików $m/z=194$ i $m/z=210$ odpowiadających fragmentom struktury leku uzyskanych z wcześniejszej fragmentacji związków wzorcowych (MS^2 i MS^3). Formę epoksydową karbamazepiny prezentuje pik $m/z=253$ i fragmenty $m/z=236$, $m/z=210$ (MS^2) oraz $m/z=206$ i $m/z=180$ (MS^3). Forma diolowa w widmie masowym jest reprezentowana przez pik $m/z=270$ i fragmenty $m/z=253$, $m/z=236$, $m/z=210$ (MS^2 i MS^3). Czasy retencji dla badanych związków wynosiły odpowiednio: dla CBZ = 20,17 minut, dla CBZ-E = 17,16 minut i dla CBZ-OH = 14,15 minut.

Czas retencji dla standardu wewnętrznego chinidyny wynosił 11,04 minut. Zestawienie wartości m/z , stanowiących charakterystyczną sekwencję pików uzyskanych w wyniku fragmentacji związków wzorcowych z wykorzystaniem opcji tandemowej spektrometrii masowej pokazano w tabeli 2.

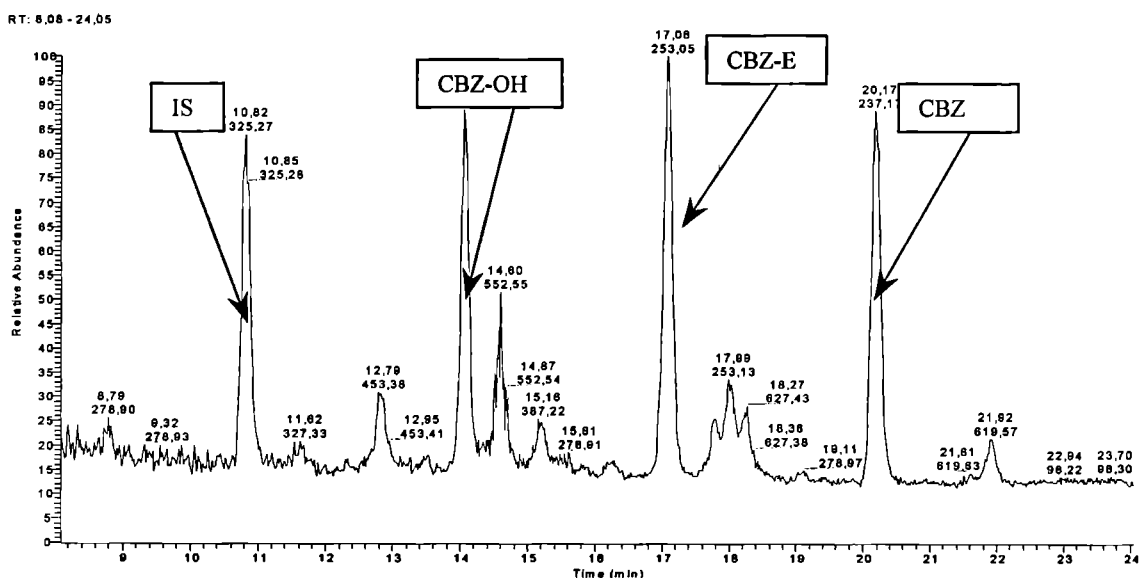
Tabela 2. Zestawienie wartości m/z widm karbamazepiny i jej metabolitów uzyskanych w opcji tandemowej spektrometrii masowej.

Nazwa związku	Wzór sumaryczny i strukturalny	M. ⁺	M _{fragm} (MS ⁿ)	
			MS 2	MS 3
Karbamazepina CBZ	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O 	237	220, 210, 194	
10,11-epoksykarbamazepina CBZ-E	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ 	253	236, 210, 208	236, 210, 208, 180
10,11-dihydroksykarbamazepina CBZ-OH	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃ 	271	253, 236, 209	253, 236, 254, 210

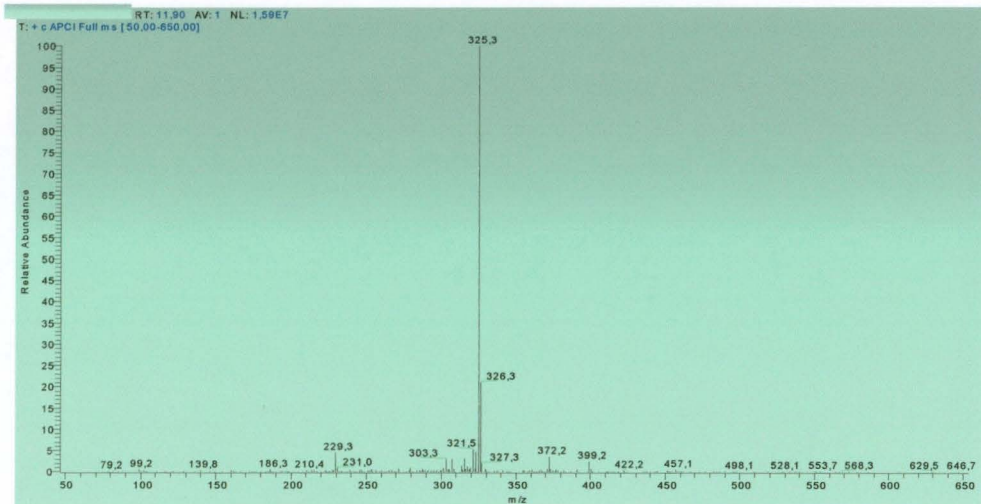
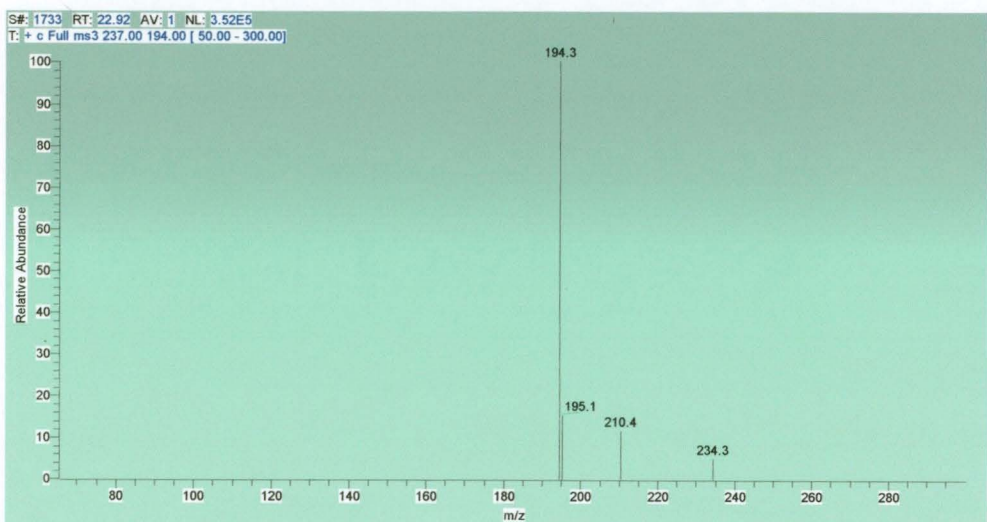
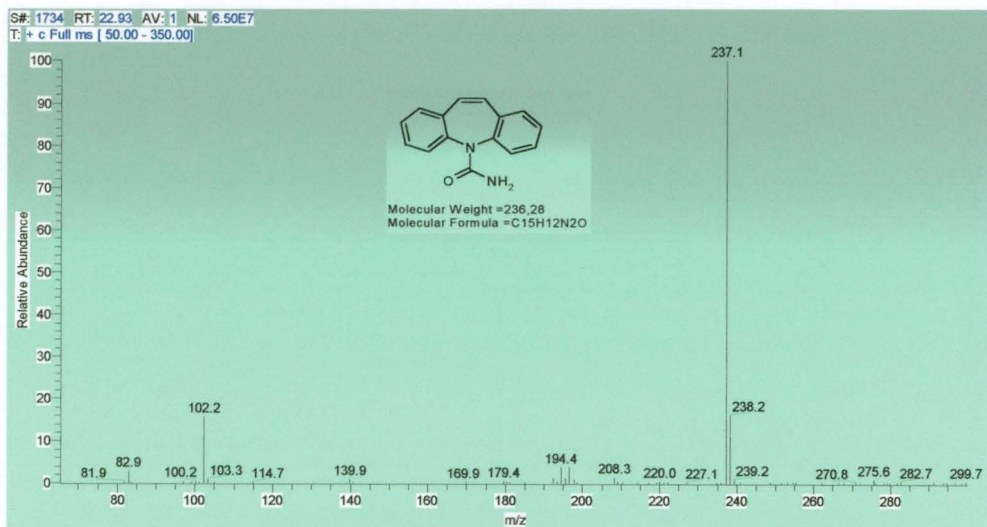
2000-03-30 05:16:45 surowica2



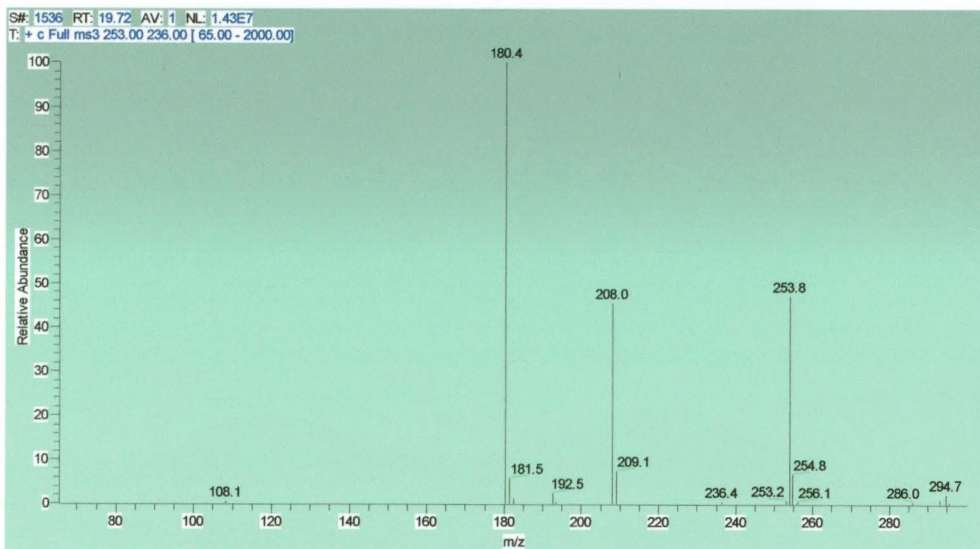
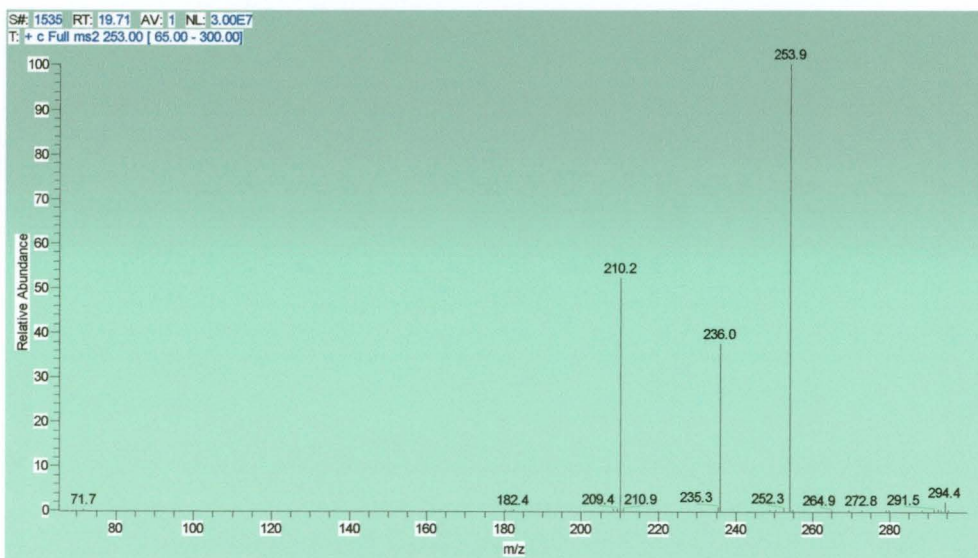
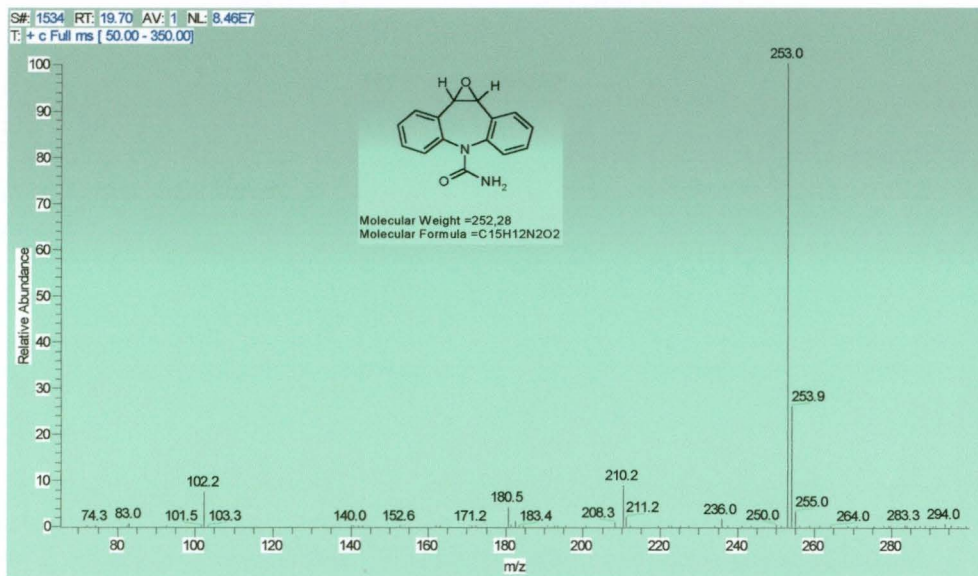
Ryc. 12. Chromatogram TIC (I) oraz widma TIC (II) dla poszczególnych mas odpowiadającym utworzonemu jonowi $[M+H]^+$, obrazujący rozdział karbamazepiny i jej metabolitów.



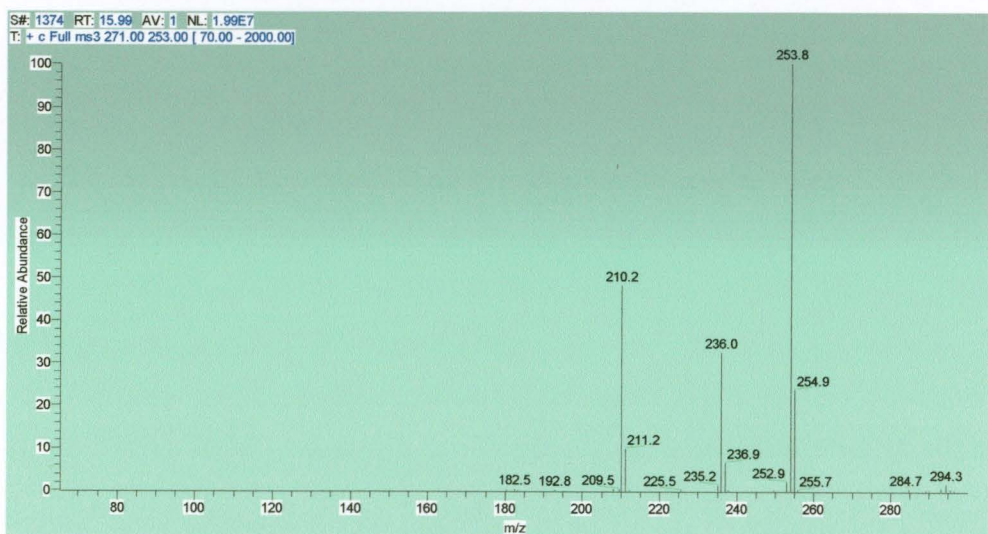
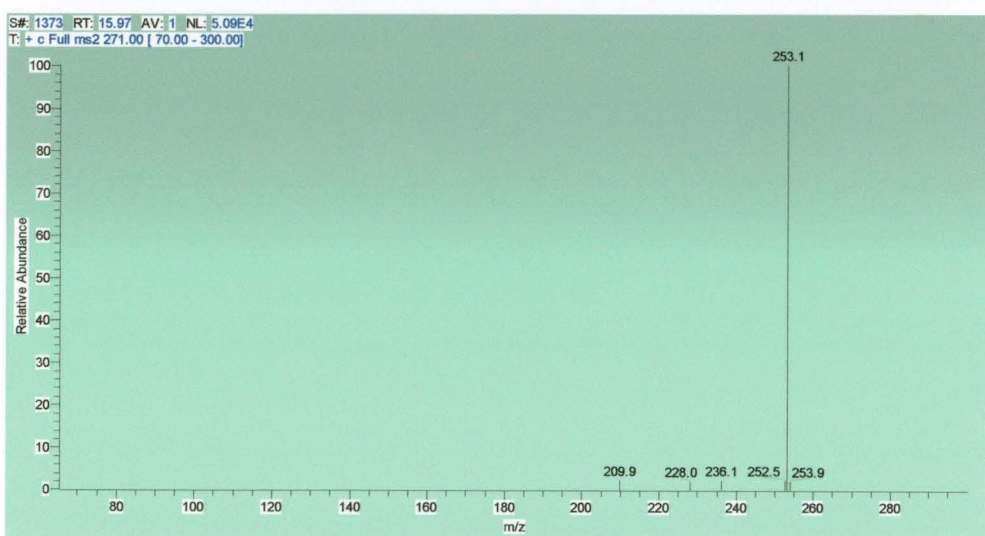
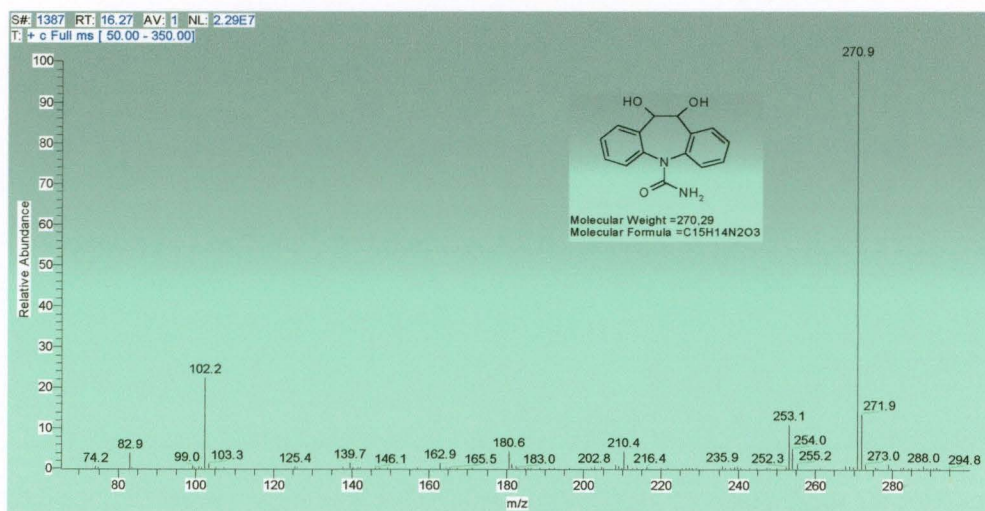
Ryc. 13. Przykładowy rozdział wzorcowy karbamazepiny, epoksydu i standardu wewnętrznego chinidyny.

Ryc. 14. Widmo masowe standardu wewnętrznego chinidyny ($m/z=325$)

- A. Widmo masowe karbamazepiny - $m/z = 237$ (MS i MS³) oraz widma fragmentacyjne MS/MS.



B. Widmo masowe epoksydu karbamazepiny - $m/z = 253$ (MS, MS² i MS³).



C. Widmo masowe 10,11-dihydrodiolu karbamazepiny - $m/z = 271$ (MS, MS² i MS³).

Ryc. 15. Poszczególne widma masowe dla identyfikacji karbamazepiny i jej metabolitów (A, B, C).

3.3 Walidacja metody

Metodę chromatografii cieczowej z detektorem masowym poddano procesowi walidacji, uwzględniając takie parametry jak specyficzność i selektywność, zakres liniowości, granica wykrywalności i oznaczalności, odzysk, powtarzalność i odtwarzalność oznaczenia dla surowicy, krwi sekcyjnej i wątroby [15, 21, 29, 74, 75, 80, 96, 110, 145].

Oszacowano również różnice wynikające z rodzaju zastosowanego źródła jonizacji. Nie stwierdzono znaczących różnic dla źródeł jonizacji ESI i APCI. W związku z tym w procesie walidacji i badaniach ekstraktów stosowano opcję APCI.

3.3.1 Specyficzność i selektywność:

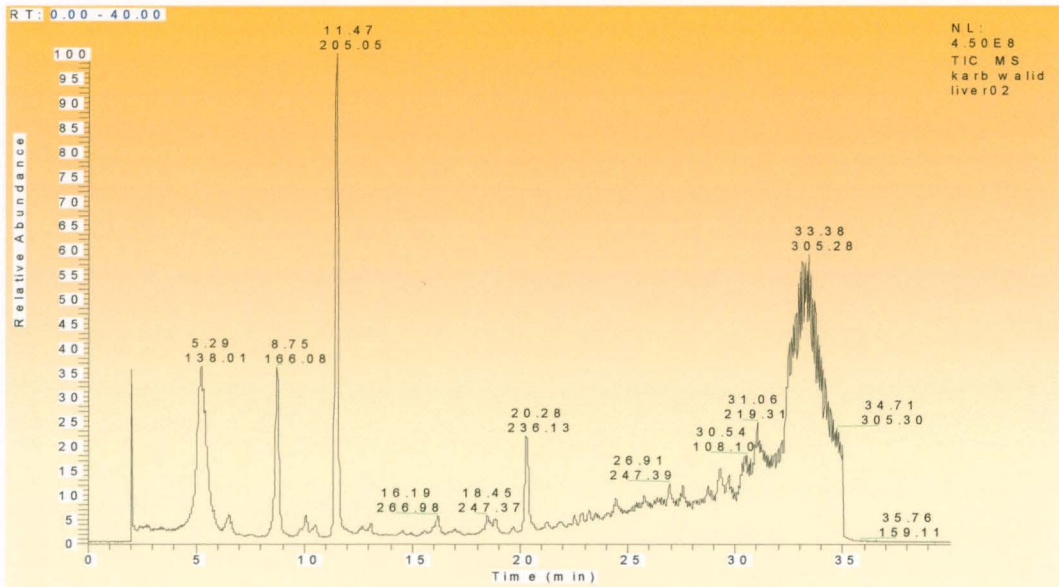
Specyficzność należy rozumieć jako zdolność do jednoznacznego określenia badanej substancji w obecności składników, które mogą być obecne w próbce, np. zanieczyszczeń, produktów degradacji, bądź innych ksenobiotyków.

Selektywność to możliwość rozróżniania związków o podobnej strukturze, które prawdopodobnie mogą być obecne w próbce. Rozróżnienie może być pewne, gdy uzyskamy pozytywny wynik np. przez porównanie ze znanym materiałem odniesienia lub, gdy uzyskamy wynik negatywny np. dla próbki nie zawierającej analizowanej substancji [15, 21, 55, 59, 110].

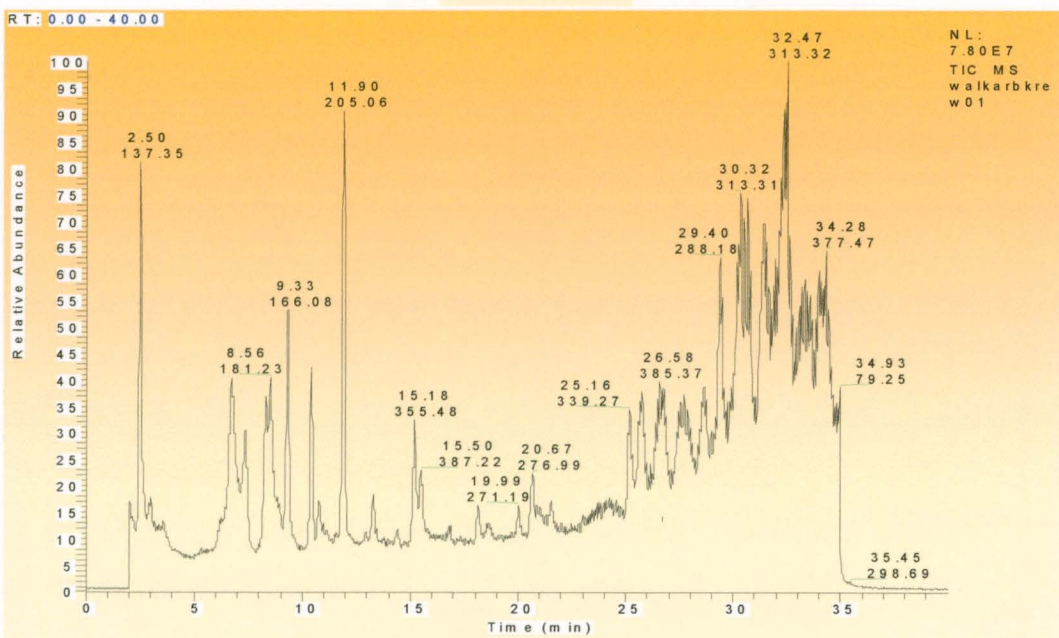
Zastosowana metoda detekcji (spektrometr masowy) cechuje się wysoką specyficznością ze względu na sposób zbierania danych analitycznych. Identyfikacji związku dokonuje się na podstawie kilku parametrów, co zmniejsza ryzyko uzyskania wyniku fałszywie dodatniego tj. czasu retencji (rozdział na kolumnie chromatograficznej) i widma uzyskanego z detektora UV oraz utworzonego jonu molekularnego, o znanej masie cząsteczkowej [1, 51, 52, 62, 89, 99, 101, 136].

W pierwszym etapie badań ustalono wymagane parametry na podstawie analizy roztworów wzorcowych, bez matrycy biologicznej. Następnie dla potrzeb obliczeń walidacyjnych analizowano materiał biologiczny tzw. ślepy - nie zawierający badanych związków oraz pochodzący z różnych źródeł [15, 21, 71, 80, 101, 139] [ryc.16]. Umożliwiło to wstępną analizę tła biologicznego.

Wysokość pików stanowiących tło jest wielkością względną, stąd pozornie nierówna linia bazowa w rzeczywistości stanowi linię prawie pozbawioną pików (parametrem określającym wielkość tła jest wartość E^x).



Wątroba
sekcyjna



Krew
sekcyjna

Ryc. 16. Analiza metodą LC/MS tkanki wątrobowej i krwi sekcyjnej nie zawierającej badanego leku, (TIC).

W wyniku przeprowadzonych oznaczeń w badanym materiale nie stwierdzono substancji interferujących z oznaczanymi lekami i ich metabolitami.

Przy niskich poziomach stężeń badanych związków jednakże zaobserwowano znaczący wpływ tła. Dotyczy to zwłaszcza tkanek np. wątroby, prawdopodobnie ze względu na sposób ekstrakcji. W celu zapewnienia wiarygodności i pewności wyników do obliczeń wykorzystywano dwa parametry tj. pole powierzchni i wysokość piku uzyskanego na chromatogramie TIC. Ze względu na sposób dokonywanych obliczeń zawartości badanych związków w materiałach biologicznych, wpływ tła biologicznego oceniano jako minimalny [9, 51, 54, 71, 92, 94, 101].

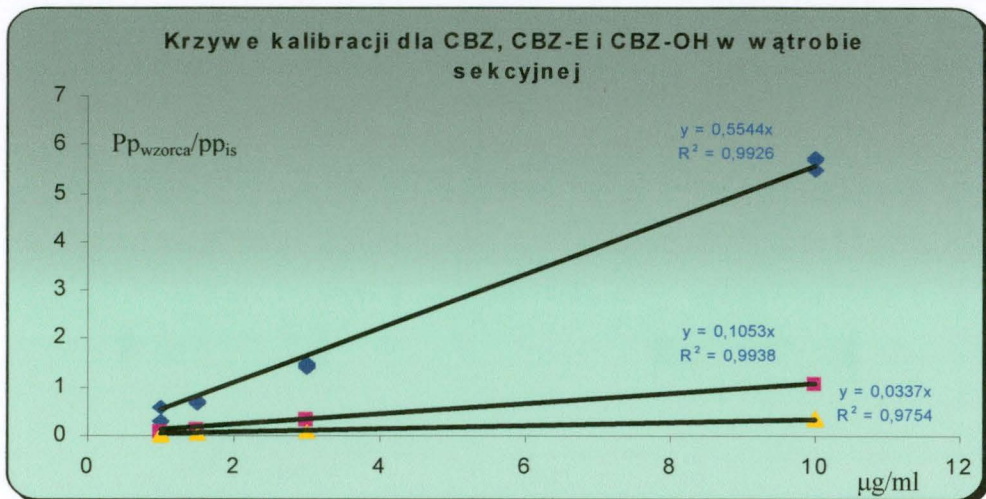
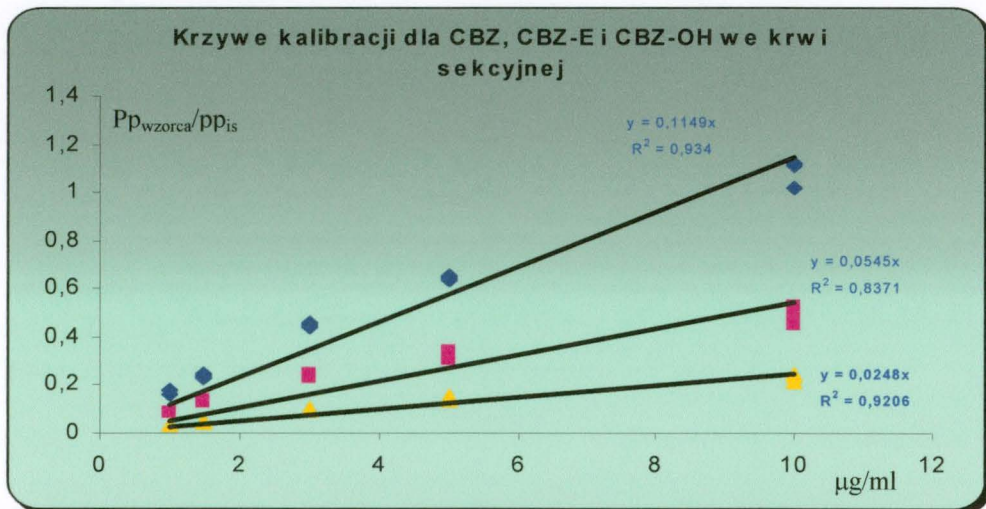
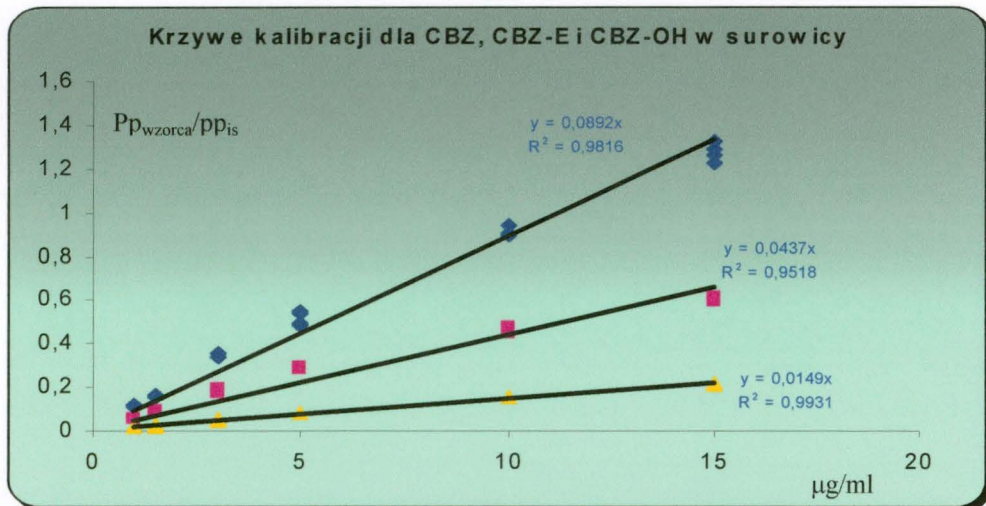
3.3.2 Liniowość:

Liniowość określa zdolność metody do uzyskiwania wyników pomiaru analitycznego wprost proporcjonalnych do stężenia (zawartości) substancji oznaczanej w próbce, w określonym zakresie, zgodnie z wyznaczonym równaniem matematycznym (równanie krzywej regresji $y=ax+b$). Zależność między obu zmiennymi charakteryzuje współczynnik korelacji r^2 [15, 80, 110, 139].

Krzywe kalibracyjne sporządzano do każdej serii oznaczeń, w celu zapewnienia wiarygodności i dokładności badania. Do czystego materiału biologicznego (surowica, krew sekcyjna i wątroba) dodawano roztwory metanolowe CBZ, CBZ-E i CBZ-OH o stężeniach, odpowiednio: 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$. Tak uzyskane próbki poddawano procedurze ekstrakcji i analizie metodą LC/MS. Z uzyskanych wyników obliczono zależność odpowiedzi od stężenia w postaci równań krzywych kalibracyjnych i wartości współczynnika korelacji r^2 . Obliczeń dokonano w oparciu o pole powierzchni i wysokość pików chromatograficznych uzyskanych z TIC-u.

Wykonane badania i obliczenia wykazały liniową zależność dla karbamazepiny, epoksykarbamazepiny i dihydroksykarbamazepiny w zakresie od 0,5 – 100 $\mu\text{g/ml}$. Współczynniki korelacji r^2 dla krzywych kalibracyjnych mieściły się w granicach od 0,9518 – 0,9931 dla surowicy, 0,9754 – 0,9938 dla wątroby sekcyjnej i 0,8371 – 0,9340 dla krwi sekcyjnej.

Krzywe kalibracyjne dla badanych materiałów biologicznych wraz z równaniami i wartością r^2 przedstawiono na rycinie 17.



Ryc. 17. Krzywe kalibracji dla CBZ, CBZ-E i CBZ-OH w ludzkiej surowicy, krwi sekcyjnej i wątrobie.

3.3.3 Czulość:

Granica wykrywalności danej metody analitycznej jest to najmniejsza ilość (stężenie) badanej substancji w próbce, która może być wykryta, lecz niekoniecznie oznaczona z wymaganą dokładnością.

Granica oznaczalności danej metody analitycznej jest to najmniejsza ilość (stężenie) badanej substancji w próbce jaka może być ilościowo oznaczona z odpowiednią precyzją i dokładnością [15, 21, 110].

W opisanych warunkach analitycznych dolna granica wykrywalności wynosiła 0,05 µg/ml dla karbamazepiny i jej dwóch głównych metabolitów – epoksykarmazepiny i dihydroksykarmazepiny. Ze względu na znaczący wpływ tła biologicznego na niższych poziomach stężeń jako dolną granicę oznaczalności przyjęto stężenie 1 µg/ml.

3.3.4 Dokładność i precyzja:

Dokładność pozwala określić zgodność między wartością rzeczywistą przedstawioną jako stężenie, a wartością będącą wynikiem analizy. Miarą dokładności metody analitycznej jest wielkość jej błędu systematycznego.

Precyzja metody jest stopniem zgodności między pojedynczymi wynikami analizy (rozrzut wyników), gdy dana procedura jest stosowana dla wielokrotnie powtarzanych, niezależnych oznaczeń jednorodnej próbki. Miarą precyzji jest odchylenie standardowe s lub względne odchylenie standardowe RSD, określane jako współczynnik zmienności CV [15, 21, 29, 47, 55, 59, 110, 145].

W wyniku obliczeń stwierdzono, że współczynnik zmienności oznaczeń dla karbamazepiny przyjmował wartości od 2,3 – 11,9 % dla surowicy, od 1,4 – 18,1 % dla krwi sekcyjnej oraz 1,9 – 43,4 % dla wątroby. Dla epoksykarmazepiny wartości współczynnika zmienności były w granicach 0,5 – 29,8 % dla surowicy, 5,0 – 29,8 % dla krwi sekcyjnej i 0,3 – 15,3 % dla wątroby. Dla dihydroksykarmazepiny wartości te prezentowały się następująco: 1,0 – 19,9 % dla surowicy, 1,9 – 18,5 % dla krwi sekcyjnej i 1,6 – 35,3 % dla wątroby.

Sugerowane wartości współczynnika zmienności wynoszą $\pm 15\%$ na wyższych poziomach stężeń, na niskich poziomach stężeń wartości te powinny mieścić się w granicach $\pm 20\%$. Wytyczne te dotyczą analizy postaci farmaceutycznych nowych leków bądź zanieczyszczeń preparatów farmaceutycznych jak również badań biodostępności,

biorównoważności i farmakokinetycznych [21, 25, 26, 29, 47, 55, 75, 77, 80, 96, 110]. Nie zostały ustalone kryteria odnośnie materiału sekcyjnego, często o bardzo dużym stopniu zanieczyszczenia produktami rozpadu tkanek [101].

3.3.5 Odzysk:

Ten parametr określa zdolność do wyizolowania badanego związku z próby biologicznej przy zastosowanej procedurze ekstrakcji. Wskazane jest, aby wartości te były jak najbardziej zbliżone do 100%, jednakże, w niektórych przypadkach mogą one być mniejsze. Dotyczy to sytuacji, gdy zastosowana metoda kompensuje niską wydajność ekstrakcji [15, 21].

Wartości te obliczono na podstawie wyników uzyskanych z oznaczenia próbek ekstrahowanych tj. cztery próbki w czterech stężeniach obejmujących zakres oznaczanych stężeń, i próbek metanolowych roztworów wzorca (również cztery stężenia). Do obliczeń wykorzystano zależność:

$$\text{Odzysk} = \frac{\text{sygnał od badanego związku, po ekstrakcji (matryca ze znaną ilością badanego związku)}}{\text{odpowiedź uzyskana z analizy roztworu wzorcowego (nie poddanego ekstrakcji)}} \times 100$$

Wartości odzysku dla karbamazepiny w badanych materiałach tj. surowicy krwi, krwi sekcyjnej i wątroby, wynoszą odpowiednio od 64,75 – 81,73 % i mieszczą się w przyjętych kryteriach wydajności ekstrakcji. Dla 10,11-epoksykarbamazepiny wartości te są w zakresie 51,28 – 92,47 % oraz dla 10,11-dihydroksykarbamazepiny zakres ten wynosi 36,80 – 45,50%.

Stosunkowo niski % odzysku w przypadku drugiego metabolitu jest prawdopodobnie spowodowany warunkami procesu ekstrakcji. Jednakże zastosowany sposób zbierania danych analitycznych tj. spektrometr masowy pozwala na wiarygodne oznaczenie stężeń tego metabolitu.

Dane dotyczące wartości odzysku zebrano w tabeli 3.

Wszystkie parametry walidacyjne zebrano w tabeli 4.

Tabela 3. Wydajność ekstrakcji dla różnych matryc biologicznych.

Lek / metabolit	Materiał	Odzysk (%)				Średnia (%)	S.D.
		1 mg/l	10 mg/l	50 mg/l	100 mg/l		
CBZ	Surowica	93,29	57,29	63,58	112,74	81,73	25,96
	Krew	59,80	61,75	92,01	107,97	79,63	22,42
	Wątroba	45,93	79,27	79,67	54,12	64,75	17,33
CBZ-E	Surowica	33,95	36,67	57,52	89,07	54,30	25,45
	Krew	81,69	90,77	89,22	108,21	92,47	11,22
	Wątroba	48,31	46,98	59,40	50,42	51,28	5,60
CBZ-OH	Surowica	42,15	44,23	40,62	56,41	45,85	7,19
	Krew	38,57	43,10	42,68	46,94	42,82	3,42
	Wątroba	35,21	38,47	35,12	37,52	36,58	1,68

Tabela 4. Parametry walidacyjne metody LC/MS dla oznaczenia karbamazepiny i jej metabolitów epoksykarmazepiny i dihydroksydiolu w ludzkiej surowicy, krwi sekcyjnej i wątrobie.

związek	Stężenie [µg/ml]	Średnie stężenie leku lub metabolitu w materiale biologicznym			R.S.D. (%)			Bias (%)		
		surowica	krew	wątroba	surowica	krew	wątroba	surowica	krew	wątroba
CBZ	1	1,25	0,74	0,81	4,9	15,7	43,4	24,80	-26,31	-19,08
	1,5	1,81	1,28	1,37	4,4	4,7	2,3	20,45	-14,60	-8,45
	3	3,85	3,44	3,00	2,8	2,2	2,5	28,24	14,57	-0,03
	5	5,79	5,39	4,17	5,8	1,4	5,7	15,83	7,81	-16,52
	10	10,33	9,75	11,67	2,3	5,8	1,9	3,30	-2,52	16,66
	15	14,29	11,72	13,91	3,5	7,2	2,1	-4,73	-21,89	-7,25
	30	27,24	32,61	34,29	11,9	9,4	6,1	-9,19	8,69	14,31
	50	53,62	52,62	48,82	4,1	18,1	4,6	7,23	5,24	-2,35
	100	98,66	97,50	93,30	7,3	8,3		-1,34	-2,50	-6,70
10.11-epoxide-CBZ	1	1,34	0,86	0,84	0,5	14,6	15,3	34,09	-14,08	-15,66
	1,5	2,09	1,35	1,30	1,2	12,2	3,9	39,14	-9,89	-13,10
	3	4,12	3,71	3,27	5,1	5,0	2,6	37,22	23,81	9,16
	5	6,52	5,62	4,93	2,5	6,9	4,0	30,37	12,48	-1,43
	10	10,54	9,58	11,37	2,6	9,6	1,1	5,38	-4,19	13,72
	15	13,80	12,05	13,76	1,1	29,8	0,3	-7,98	-19,66	-8,29
	30	30,12	32,86	35,13	29,8	8,4	6,3	0,38	9,45	17,09
	50	49,95	53,65	46,72	9,7	23,6	9,9	-0,10	7,30	-6,56
	100	100,15	96,72	101,45	16,1	22,0		0,15	-3,28	1,45
10.11-diol-CBZ	1	1,06	0,96	0,84	9,0	11,0	35,3	5,55	-3,96	-16,02
	1,5	1,58	1,32	1,25	3,3	4,5	24,2	5,07	-12,26	-16,60
	3	3,48	3,53	2,82	4,3	1,9	8,2	15,99	17,82	-5,85
	5	5,47	5,70	4,25	3,4	6,4	7,3	9,30	14,03	-14,92
	10	10,38	9,60	11,34	1,0	8,4	1,6	3,81	-3,96	13,45
	15	14,50	16,06	13,70	2,1	8,3	2,8	-3,35	7,05	-8,68
	30	26,78	31,48	34,64	19,9	18,5	10,4	-10,74	4,94	15,48
	50	55,34	53,51	44,16	5,8	16,8	6,6	10,68	7,03	-11,68
	100	99,51	98,97	100,61	8,3	9,3		-0,49	-1,03	0,61

*N = 4

4. Analiza przypadków zatruc karbamazepiną.

W celu prześledzenia przemian metabolicznych karbamazepiny badaniem objęto trzy grupy przypadków tj. zatrucia ostre bez skutku śmiertelnego, zatrucia śmiertelne i grupę pacjentów leczonych karbamazepiną w Klinice Psychiatrii. W przypadkach zatruc można wyszczególnić zatrucia samą karbamazepiną oraz zatrucia złożone, wielolekowe i zatrucia z obecnością etanolu. Oznaczenia zawartości karbamazepiny i jej metabolitów w surowicy krwi pacjentów leczonych w Klinice Psychiatrii były wykonywane w celach orientacyjnych i porównawczych [107, 127].

Podjmując próbę oceny przebiegu metabolizmu starano się wykazać obecność metabolitów karbamazepiny w autentycznym materiale biologicznym w odniesieniu do danych teoretycznych z piśmiennictwa [3, 41, 50, 56, 62, 83, 87, 89, 90, 95, 99, 111, 120, 135, 138]

We wszystkich badanych materiałach biologicznych, zarówno w surowicy pacjentów leczonych, jak i w jak materiale sekcyjnym, analiza wykazała obecność CBZ, CBZ-E, CBZ-OH jako podstawowych metabolitów na różnych poziomach stężeń. Pozwoliła na wykazanie obecności także innych metabolitów, w bardzo małych ilościach, wystarczających jednakże na ich identyfikację. W związku z bardzo niskimi poziomami tych metabolitów nie można było dokonać obliczenia ich stężeń.

Obecność innych metabolitów w samych tkankach była zróżnicowana, uzależniona przede wszystkim od rodzaju materiału biologicznego. Np. obecność niektórych metabolitów można było wykazać tylko w moczu, ze względu na mechanizm zagęszczania oraz drogę eliminacji tych związków z organizmu. Są to metabolity identyfikowane w postaci pików o widmie masowym metabolitów karbamazepiny (epoksydu i diolu) jednakże uzyskanych o innych czasach retencji i dodatkowych pikach w widmie masowym ($m/z = 441, 429, 413$). Z danych piśmiennictwa wynika, że takie widma masowe uzyskano dla metabolitów CBZ wydalanych w formie N- i O-glukuronianów [62, 89, 101].

Innymi tkankami, w których można było stwierdzić obecność niektórych metabolitów karbamazepiny były: surowica krwi, nerka, żółć i wątroba. W pozostałych dostępnych materiałach biologicznych stwierdzenie obecności tych związków było utrudnione ze względu na bardzo niskie stężenia i obecność tła biologicznego [41, 90, 95, 99, 101, 120, 125, 135, 138].

Analizę widm masowych pozostałych metabolitów karbamazepiny w badanych materiałach biologicznych oraz omówienie ich identyfikacji przedstawiono w dalszej części pracy.

4.1 Zatrucia bez skutku śmiertelnego

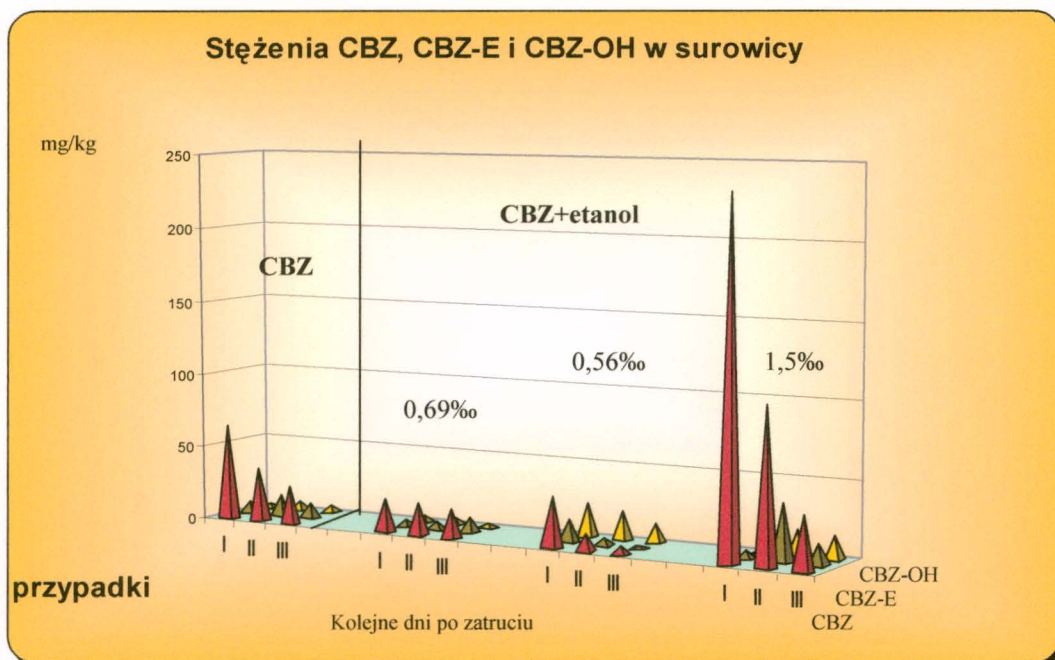
Oznaczenia wykonano w surowicy krwi, pochodzącej od 33 osób hospitalizowanych w Klinice Toksykologii szpitala im. Rydygiera z powodu zatrucia karbamazepiną lub mieszaniną lek/leki-etanol.

Wśród badanych przypadków większość stanowili mężczyźni (63,4%). W około 30% przypadków była to kolejna próba samobójcza. W 14 przypadkach zatruciu towarzyszył alkohol etylowy, jedna osoba trafiła na oddział z powodu zatrucia złożonego tj. karbamazepina + etanol + lek z grupy fenotiazyn. W kilku przypadkach zatruc obok karbamazepiny stwierdzono obecność innych leków, najczęściej były to związki z grupy fenotiazyn (np. Tisercin) oraz leki stosowane w chorobach układu nerwowego. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 5.

Stężenia CBZ mieściły się w przedziale 5,37 – 233,08 mg/l. W większości przypadków były to zatrucia ostre, w których stężenie CBZ znacznie przekraczało poziom przyjmowany za terapeutyczny (4 – 12 mg/l) lub nawet spotykany w zatruciach śmiertelnych (powyżej 20 mg/l) [2, 10, 23, 85, 107, 116].

W czterech przypadkach, w których była możliwość pobrania krwi w trzech kolejnych dniach od przyjęcia pacjenta do szpitala można było prześledzić stopniową eliminację karbamazepiny i jej metabolitów (epoksydu i formy diolowej). Trzy zatrucia były próbą samobójczą, jedna to wypadek. Jeden przypadek dotyczył zatrucia tylko samą karbamazepiną, w trzech pozostałych zatruciu karbamazepiną towarzyszył etanol.

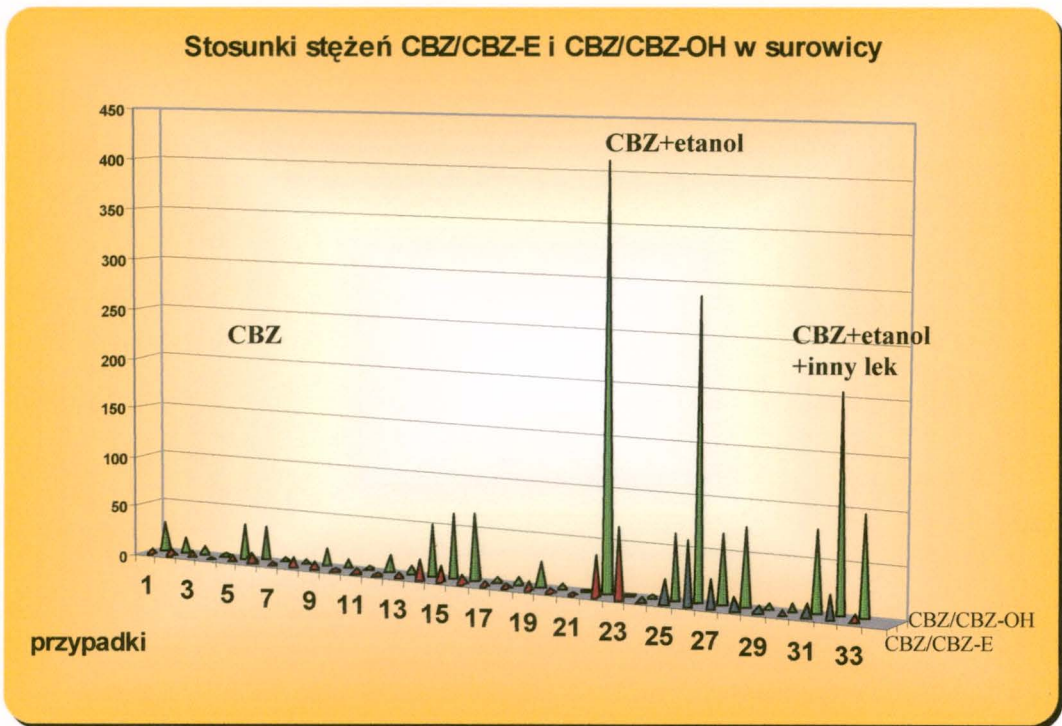
Śledząc proces eliminacji CBZ i metabolitów u tych pacjentów w zatruciu samą karbamazepiną można zauważyć szybki ubytek karbamazepiny z surowicy krwi (malejące stężenia) i powolny wzrost stężenia formy diolowej (zachodząca biotransformacja CBZ do CBZ-E a następnie do diolu). W przypadkach, w których zatruciu towarzyszył alkohol etylowy widoczne było spowolnienie procesów metabolicznych, przejawiające się bardzo niskimi poziomami metabolitów lub minimalnymi zmianami w ich stężeniach w kolejnych dniach hospitalizacji, przy wysokich stężeniach samej karbamazepiny [42, 85, 107, 112, 114, 124, 132]. Na rycinie 18 przedstawiono graficznie kolejne dni obrazujące eliminację CBZ i jej głównych metabolitów.



Ryc. 18. Zmiany stężeń CBZ i metabolitów – epoksydu i diolu w surowicy, w przypadkach zatruc samą karbamazepiną oraz w zatruciach mieszanych (CBZ + etanol), w kolejnych dniach leczenia.

Posługując się regułą wprowadzoną przez Apple [4] obliczono wartości stosunku CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH, które mogą sugerować szybkość przemian procesu metabolicznego. Niskie wartości wskazują na wysoki poziom wytworzonego metabolitu a tym samym na intensywny przebieg procesu metabolicznego, prowadzącego do wytworzenia wysokich stężeń tych metabolitów, i odwrotnie. Analizując obliczone wartości stosunków CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH można zaobserwować pewne zależności. Widoczne są różnice w przebiegu procesu metabolicznego w przypadku zatruc samą CBZ i zatruc złożonych (CBZ – etanol, CBZ – fenotiazyny). Zakres wartości stosunku CBZ/CBZ-E mieścił się w przedziale od 2,22 – 69,41 (górną granicą wartości dotyczyła zatrucia mieszanego z obecnością etanolu), natomiast zakres ten dla stosunku CBZ/CBZ-OH przyjmował wartości od 1,53 – 411,1. Podobnie jak w poprzedniej sytuacji najwyższe wartości można spotkać w zatruciach, w których był obecny alkohol etylowy.

Graficznie przyjęte zależności CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH dla poszczególnych przypadków przedstawiono na ryc. 19.



Ryc. 19. Stosunki stężeń CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH w surowicy, w zatruciu ostrym, bez skutku śmiertelnego.

Tabela 5.

Zestawienie przypadków zatruc ostrych karbamazepiną, osób przyjętych na oddział Kliniki Toksykologicznej szpitala im. Rydygiera w Krakowie (okres od 1998 do pierwszej połowy 2000 roku)

No.	płeć	wiek	Samobójst wo lub wypadek	Czas pobytu w szpitalu	Próbka po przyjęciu	stężenie [mg/l]					etanol [%o]	Inne leki
						CBZ [mg/l]	CBZ-E		CBZ-OH			
							[mg/l]	C/E	[mg/l]	C/H		
1	K	12	S	4	I	28,91	4,88	5,93	1,01	28,69	----	----
2	M	45	S	10	I	82,73	10,55	7,84	5,59	14,80		----
					II	49,40	6,14	8,04	2,66	18,57		
3	K	50	S	4	I	72,40	10,33	7,01	8,77	8,26	----	----
4	M	37	S	14	I	40,98	17,14	2,39	11,18	3,67	----	----
					II	23,1	20,15	1,15	14,4	1,60		
5	K	17	S	7	I	85,17	11,64	7,32	2,53	33,65	----	----
					II	49,67	20,03	2,48	10,94	4,54		
6	K	58	S	6	I	73,07	6,68	10,94	2,12	34,38	----	----
					II	47,11	12,67	3,72	15,46	3,05		
7	M	36	S	21	I	92,83	28,52	3,25	19,40	4,79	----	----
					II	29,21	10,40	2,81	15,97	1,83		
8	M	37	S	7	I	43,32	4,71	9,20	8,98	4,82	----	----
					II	24,60	6,51	3,78	5,26	4,68		
9	K	18	S	7	I	67,75	8,87	7,64	4,08	16,62	----	----
					II	43,90	14,38	3,05	8,25	5,32		
10	M				I	29,44	8,56	3,44	3,18	9,26	----	----
					II	57,04	14,86	3,84	12,14	4,70		
11	M	19	S	7	I	53,70	11,44	4,69	13,19	4,07	----	----
12					I	111,47	33,40	3,34	6,40	17,43	----	----
13					I	19,36	3,29	5,88	2,31	8,38	----	----
14	K	54	S	14	I	55,45	2,93	18,94	1,09	51,07	----	----
					II	90,05	16,03	5,62	7,28	12,36		
15	K	33	W	8	I	82,00	5,56	14,76	1,29	63,60	----	----
					II	36,19	11,18	3,24	6,82	5,31		
16	M	16	S	3	I	35,82	4,14	8,66	0,55	64,89	----	----
					II	12,31	4,94	2,50	3,71	3,32		
17	M	49	S	9	I	19,47	4,92	3,96	3,10	6,29	----	----
18	M	45	S	8	I	26,05	5,83	4,47	3,79	6,88	----	----

Zatrucia bez skutku śmiertelnego

19	M	27	S	7	I	63,46	7,63	8,32	2,62	24,22	----	----
					II	35,93	14,17	2,53	5,70	6,30		
					III	25,32	9,71	2,61	5,29	4,78		
20	M	32	S	10	I	22,74	5,36	4,24	4,68	4,86	0,69	----
					II	21,96	5,12	4,29	4,52	4,86		
					III	19,43	10,29	1,89	3,12	6,23		
21	M	44	W	3	I	33,72	15,20	2,22	22,05	1,53	0,56	----
					II	11,76	5,57	2,11	18,27	0,64		
					III	5,40	1,54	3,51	13,40	0,40		
22	K	19	S	5	I	233,08	5,81	40,12	0,57	411,1	1,5	----
					II	102,35	37,24	2,75	17,05	6,00		
					III	35,94	13,17	2,73	15,69	2,29		
23	M	31	S	10	I	74,96	1,08	69,41	NA	NA	0,94	----
24	M	30	W	2	I	5,37	1,04	5,16	1,37	3,92	0,94	----
					II	3,70	0,16	23,13	NA	NA		
25	M	52	S	21	I	22,28	0,99	22,53	0,36	62,30	1,02	----
26	M	33	S	4	I	30,73	0,49	62,69	0,11	287,7	1,87	----
27	K	51	W	10	I	8,42	0,30	27,89	0,12	67,77	1,85	----
28	M	47	S	6	I	31,29	2,29	13,68	0,42	74,05	1,02	----
					II	19,71	4,59	4,30	2,11	9,32		
29	M	41	S	6	I	8,89	1,11	7,99	1,66	5,35	0,81	----
30	M	18	S	7	I	22,74	3,90	5,84	2,64	8,60	----	Fenotiazyny
					II	17,06	3,54	4,82	7,31	2,33		
31	M	47	S	5	I	91,88	6,82	13,47	1,17	78,45	----	Fenotiazyny
					II	77,40	2,77	27,94	NA	NA		
32	K	39	W	9	I	60,27	2,48	24,31	0,29	205,6	----	Benzodiazepiny
33	K	48	S	3	I	128,94	17,52	7,36	1,33	97,23	2,3	Fenotiazyny

4.2 Zatrucia śmiertelne

Przedmiotem badań było 21 przypadków zatruc śmiertelnych karbamazepiną. Oznaczenie stężenia leku i jego metabolitów wykonano we krwi sekcyjnej, nerce i w wątrobie oraz w kilku przypadkach, w tkankach dostępnych z sekcji tj. w mózgu, żółci, płynie mózgowo-rdzeniowym i w moczu.

Jakkolwiek w przypadkach śmiertelnych trudno jest ponad wszelką wątpliwość podać motywy zatrucia, to w badanych przypadkach analiza danych osobowych pozwoliła stwierdzić z pewnym prawdopodobieństwem, że w dziewięciu przypadkach było to prawdopodobnie samobójstwo, w pięciu wypadek, dwa naturalne zgony, w dwóch prawdopodobnie zabójstwo oraz trzy przypadki, w których nie można było ustalić przyczyny zgonu.

W ośmiu przypadkach, oprócz CBZ, stwierdzono obecność etanolu. Jeden wypadek dotyczył zatrucia mieszaniną - karbamazepina + etanol + amitryptylina. Innymi lekami (związkami) wykrytymi w zatruciach mieszanych z CBZ w badanych przypadkach zatruc były chlordiazepoksyd, estazolam, diazepam, paracetamol i perazyna, fenobarbital, lewomepromazyna, morfina, lorazepam oraz w jednym przypadku okskarbamazepina. Stężenia CBZ mieściły się w przedziale 2,33 – 99,45 mg/l we krwi; 1,57 – 362,48 mg/l dla wątroby oraz 0 – 58,85 mg/l w nerce.

Istotne dane dotyczące przyczyny śmierci i okoliczności tych zgonów zamieszczono w tabeli 6. Obok informacji odnośnie przyczyny zgonu umieszczono również dane o rodzaju zatrucia (proste lub złożone) oraz informację, czy zatruciu towarzyszył etanol. Podano również stężeni etanolu we krwi i moczu.

Próbie oceny szybkości procesu biotransformacji karbamazepiny w analizowanych przypadkach przedstawiono na ryc.20 w postaci wartości stosunków CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH, posługując się regułą zaproponowaną przez Apple'a [4]. Obliczone wartości współczynników mieściły się w następujących zakresach: dla krwi sekcyjnej stosunek CBZ/CBZ-E zawierał się w przedziale od 0,4 – 69,6, wartości współczynnika CBZ/CBZ-OH były w przedziale od 0 – 126; oraz odpowiednio dla tkanki wątrobowej CBZ/CBZ-E = 1,3 – 195,3 i CBZ/CBZ-OH = 0 – 293; dla tkanki nerkowej: CBZ/CBZ-E = 0,3 – 66,33 i CBZ/CBZ-OH = 0 – 109.

We krwi i nerkach wartości stosunków CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH wskazują na podobny przebieg, natomiast w przypadku tkanki wątroby przedstawione wartości CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH są wyższe. Podobnie jak w przypadkach zatruc bez skutku śmiertelnego badane przypadki wykazują różnice w przebiegu metabolizmu wynikającego z obecności innego ksenobiotyku, mającego wpływ na wystąpienie efektu toksycznego [114, 124, 132].

Tabela 6.

Zestawienie przypadków zatruczeń śmiertelnych karbamazepiną, badanych w Zakładzie Medycyny Sądowej w Krakowie (okres od 1998 do pierwszej połowy 2000 roku)

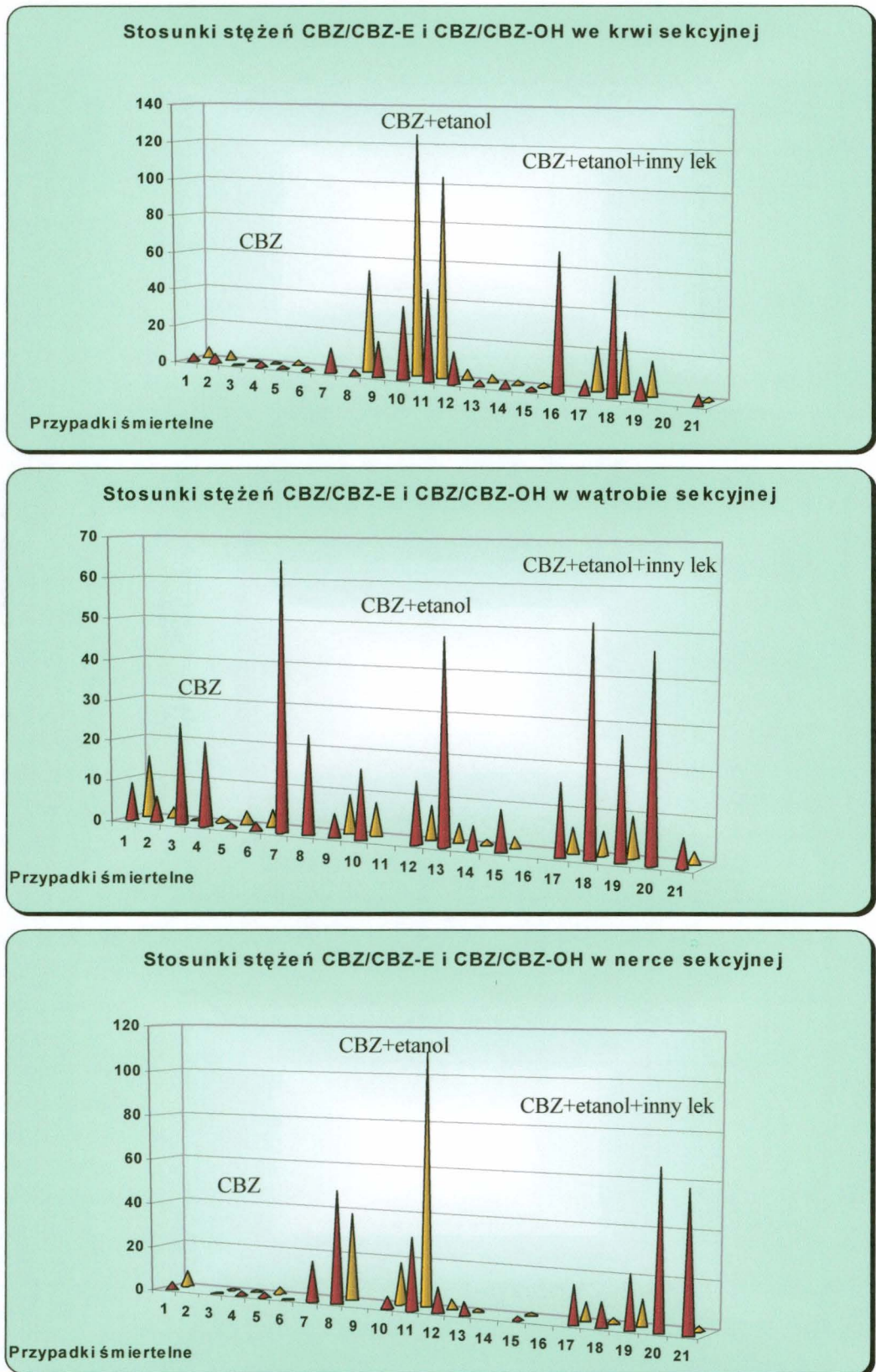
lp.	wiek	płeć	okoliczności	przyczyna	sposób	alkohol (%)	Leki i metabolity	krew		wątroba		nerka	
								mg/kg		mg/kg		mg/kg	
1	42	M	Pacjent leczony psychiatrycznie w szpitalu przez 2 dni, tutaj zmarł	Ostre zatrucie	Samobójstwo	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH	39,40 10,40 6,52	3,8 6,0	56,48 6,26 3,70	9,02 15,3	8,29 2,38 1,25	3,5 6,6
2	50	M	Znaleziony w łazience, uzależniony lekami	Ostre zatrucie	Samobójstwo	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH	16,04 3,06 3,25	5,2 4,9	130,60 20,94 50,80	6,2 2,6	N.A.V N.A.V N.A.V	
3	35	K	Znaleziona martwa w domu, padaczka, pacjentka psychiatryczna	Ostre zatrucie	Samobójstwo	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH	99,45 274,47 199,09	0,4 0,5	218,79 8,85 428,17	24,7 0,51	40,69 85,02 73,902	0,5 0,6
4	39	K	Znaleziona martwa w domu	Ostre zatrucie	Samobójstwo	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH	18,79 6,93 23,74	2,7 0,8	19,51 0,95 12,74	20,5 1,5	4,37 1,99 5,06	2,2 0,9
5	22	K	Śmierć w szpitalu, w 4-m miesiącu ciąży, leczona na padaczkę od dziecka	Nieznana	Zgon naturalny	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH	3,14 1,60 1,21	2,0 2,6	6,35 5,02 2,02	1,3 3,1	16,62 6,87 4,87	2,4 3,4
6	7	M	Leczony z powodu padaczki, zamordowany	Uduszenie	Morderstwo	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH	4,28 2,03 0	2,1 0	6,50 3,18 1,63	2,0 4,0	1,24 3,98 0	0,3 0
7	29	M	Zgon w szpitalu, pacjent psychiatryczny, padaczka, alkoholik	Zawał serca	Naturalny	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH	10,0 0,74 0	13,5 0	21,27 0,33 0	64,5 0	8,51 0,48 0	17,7 0
8	54	K	Znaleziony martwy niedaleko domu, pacjent neurologiczny, alkoholik	Ostre zatrucie	Wypadek	K - 0,5 M - 2,2	CBZ CBZ-E CBZ-OH	32,44 11,10 0,61	2,9 53,1	14,65 0,62 0	23,6 ↑	40,34 0,81 1,05	49,8 38,4
9		M	Brak danych, znaleziony na ulicy	Nieznana	Nieznana	K - 0,2 M - 1,6	CBZ CBZ-E CBZ-OH	6,85 0,37 0	18,5 0	112,71 19,89 12,04	5,7 9,4	N.A.V	
10	32	M	Znaleziony martwy w domu, padaczka	Ostre zatrucie	Samobójstwo	K - brak M - 2,0	CBZ CBZ-E CBZ-OH	50,50 1,35 0,40	37,4 126,3	6,78 0,41 0,87	16,5 7,8	4,67 0,89 0,26	5,2 18,0
11	46	?	Znaleziona martwa w łazience, padaczka, depresja	Ostre zatrucie wielolekowe	Wypadek	K - 2,6 M - 3,2	CBZ CBZ-E CBZ-OH Amitryptylina nortryptylina	20,18 0,43 0,19 1,32 0,08	46,9 106,2	362,48 0 0 59,48 2,01	↑ ↑ 29,6	58,85 1,86 0,54 6,80 0,11	31,6 109 61,8
12	54	M	Zgon w szpitalu, pacjent psychiatryczny	Ostre zatrucie wielolekowe	Nieznana	2,22	CBZ CBZ-E CBZ-OH estazolam	11,53 0,72 3,13 1,52	16 3,7	10,10 0,68 1,21 0,80	14,9 8,3	8,89 0,79 2,03 0,40	11,3 4,4
13	70	M	Zgon w szpitalu po 2 dniach, przedawkowanie leku	Ostre zatrucie wielolekowe	Samobójstwo	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH Estazolam	2,33 0,79 0,59 2,15	2,9 3,9	4,19 0,09 0,94 1,56	46,6 4,5	2,07 0,36 1,45 0,75	5,8 1,4
14	33	M	Nagły zgon w akademiku	Ostre zatrucie wielolekowe	Wypadek	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH Phenobarbital	7,08 1,68 3,14 23,5	4,2 2,3	1,57 0,29 1,27 -	5,4 1,3	N.A.V	
15	26	M	Znaleziony martwy w domu, alkoholik, pacjent psychiatryczny	Prawdopodobnie zatrucie wielolekowe	Wypadek	Brak	CBZ CBZ-E CBZ-OH Diazepam Nordiazepam	3,66 1,82 0,62 0,2 1,1	2,0 5,9 0,2 0,2	14,95 1,51 6,14 0,6 10,9	9,9 2,4 0,5 6,9	6,89 3,84 4,22 0,5 6,9	1,8 1,6 0,1
16		K	Znaleziona martwa w parku, brak danych	Ostre zatrucie wielolekowe	Prawdopodobnie wypadek	K - 2,9 M - 3,5	CBZ CBZ-E CBZ-OH Morfina 6-MAM	3,48 0,05 0 1,13 0	69,6 ↑	5,86 0,03 0,02 2,10 0	195,3 293	8,38 0 0 16,0 0,03	- -

Zatrucia śmiertelne

17	54	M	Leczony na padaczkę	Prawdopodobnie zatrucie lekami	Prawdopodobnie samobójstwo	K - 0,2	CBZ CBZ-E CBZ-OH Perazyna	31,07 3,85 1,37	8,07 22,70	20,80 1,24 3,50	16,79 5,95	2,51 0,15 0,31	16,72 8,22
18		M	Brak danych	Nieznana	Nieznany	K - 2,4 M - 3,5	CBZ CBZ-E CBZ-OH Lewomepromazy Luminal	41,21 0,69 1,34 1,30 2,78	59,72 30,75	4,70 0,09 0,85 8,01 0,92	52,22 5,53	3,74 0,34 1,49 7,01 1,46	11,0 2,51
19	Ok. 40	K	Brak danych	Zadławienie treścią wymiotną	Podejrzanie zabójstwa	Krew 1,6 Mocz 2,3	CBZ CBZ-E CBZ-OH Lorazepam	40,28 3,57 2,32 1,02	11,28 17,36	84,50 3,00 8,90 7,35	28,17 9,49	34,72 1,51 3,15 2,53	22,99 11,02
20	26	K	Znaleziona w łazience, leczona psychiatrycznie, kilkakrotnie podejmowane próby samobójcze przez nadużywanie leków	Powieszenie	Samobójstwo	Galka - 0,6 Mięsień - 0,4	CBZ CBZ-E CBZ-OH Diazepam Nordiazepam Oksazepam Temazepam Lorazepam	N.A.V		18,19 0,39 0,06 0,73 ,093 4,725 1,2	46,64 0,08	1,99 0,03 0,016 0,28 1,59 1,56 0,36	66,33 0,06
21		M	Brak danych	Nieznana	Prawdopodobnie samobójstwo	K - poniżej 0,2 M - poniżej 0,2	CBZ CBZ-E CBZ-OH okskarbamazepina	51,27 9,10 24,79 3,315	5,63 2,07	131,71 19,54 47,44 1,73	6,74 2,78	34,97 0,595 17,345 3,02	58,77 2,02

* - surowica z krwi pobranej przy przyjęciu do szpitala
N.A.V. - tkanka niedostępna





Ryc.20. Stosunki stężeń CBZ/CBZ-E (kolor czerwony) i CBZ/CBZ-OH (kolor żółty) we krwi sekcyjnej, wątrobie i nerce, obliczone w przypadkach zatruc śmiertelnych.

4.3 Karbamazepina w terapii

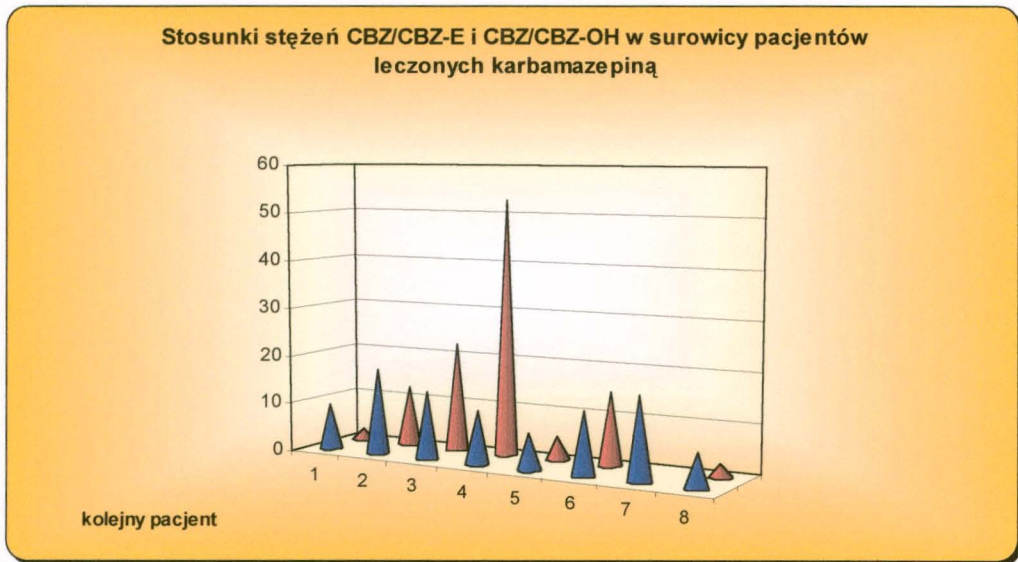
Badanie objęło grupę 8-miu pacjentów leczonych w Klinice Psychiatrii w Krakowie. W surowicy tych osób oznaczano stężenia karbamazepiny, epoksydu i dihydroksydiolu dla potrzeb terapii monitorowanej. Oznaczenia te były wykonywane jedynie w celach orientacyjnych. Wyniki zestawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Zestawienie stężeń karbamazepiny i jej metabolitów w surowicy pacjentów leczonych w Klinice Psychiatrii.

Lp.	Karbamazepina [mg/l]	10,11-epoksykarbamazepina [mg/l]		10,11-dihydroksykarbamazepina [mg/l]	
			CBZ/CBZ-E		CBZ/CBZ-OH
1	3,62	0,39	9,28	1,52	2,38
2	7,66	0,43	17,81	0,61	12,56
3	5,86	0,42	13,95	0,26	22,54
4	8,45	0,78	10,83	0,16	52,81
5	19,20	2,55	7,53	4,02	4,78
6	5,58	0,43	12,98	0,37	15,08
7	1,43	0,085	16,82	ślad	
8	3,90	0,56	6,96	1,48	2,63

Wyniki oznaczenia stężenia karbamazepiny i jej metabolitów w surowicy tych pacjentów mieszczą się w zakresie stężeń terapeutycznych, z wyjątkiem jednego przypadku, w którym stężenie karbamazepiny wynosiło 19,2 mg/l i było zbliżone do poziomu toksycznego. Obliczono również wartości stosunków stężeń CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH dla poszczególnych przypadków. Wartości tych współczynników mieszczą się w zakresie 6,96 – 17,81 dla pierwszego etapu biotransformacji karbamazepiny i 2,38 – 52,81 dla drugiego etapu przemian.

Porównując wartości dla współczynnika CBZ/CBZ-E z przypadkami zatruc ostrych karbamazepiną bez skutku śmiertelnego można zaobserwować, że są one podobne, zwłaszcza gdy odnoszą się do grupy przypadków zatrucia tylko samą karbamazepiną. W przypadkach, w których było to zatrucie wielolekowe bądź towarzyszył mu etanol wartości tego współczynnika mieszczą się w szerszym zakresie tj. od 2,22 – 69,41. Podobnie, porównując te wartości z wartościami obliczonymi dla przypadków zatruc śmiertelnych współczynniki te są zbliżone, jedynie w przypadkach, w których zatruciu towarzyszył etanol lub inny lek wartości te są wyższe i mieszczą się w dużo szerszym zakresie tj. 2,0 - 69,6.



Ryc. 21. Wykres przedstawiający stosunki stężeń CBZ/CBZ-E (kolor niebieski) i CBZ/CBZ-OH (kolor czerwony) obliczone dla pacjentów objętych leczeniem w Klinice Psychiatrii w Krakowie.

Tabela 8. Porównanie zakresów stężeń karbamazepiny i jej metabolitów w badanych tkankach oraz zakresów wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH.

Tkanka	Lek i metabolit	Zatrucia bez skutku śmiertelnego	Zatrucia śmiertelne	Terapia
Zakresy stężeń dla karbamazepiny i jej metabolitów, w mg/l				
Krew sekcyjna / surowica	CBZ	5,37 – 233,08	2,33 – 99,45	1,43 – 19,20
	CBZ-E	0,30 – 33,40	0,05 – 274,47	0,085 – 2,55
	CBZ-OH	0,11 – 22,05	0,00 – 199,09	0,16 – 4,02
Zakresy wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH				
Krew sekcyjna / surowica	CBZ/CBZ-E	2,22 – 69,41	0,4 – 69,6	6,96 – 17,81
	CBZ/CBZ-OH	1,53 – 411,1	0,0 – 126,2	2,38 – 52,81

W tabeli 8 zebrano zakresy stężeń dla karbamazepiny i jej dwóch głównych metabolitów, oraz wartości współczynnika CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH (obliczone zgodnie z regułą Appl'a'e) dla krwi sekcyjnej lub surowicy (w zależności od rodzaju zatrucia). Porównując zakresy uzyskanych stężeń dla badanych związków zaobserwowano, iż w przypadkach zatruc bez skutku śmiertelnego zakres wartości dla CBZ jest bardzo szeroki w odniesieniu do przypadków zatruc śmiertelnych, natomiast dla pozostałych związków tj. epoksydu i diolu, te zakresy są około 10-ciokrotnie mniejsze.

Porównując zakresy wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH w badanych grupach zatruc oraz w terapii zaobserwowano, iż w zatruciach bez skutku śmiertelnego przedziały obliczonych wartości są bardzo szerokie w odniesieniu do zatruc śmiertelnych oraz porównując je z zakresem spotykanym w terapii.

Analizując powyższą tabelę stwierdzono, iż w przypadkach zatruc bez skutku śmiertelnego stężenia karbamazepiny w surowicy przekraczają wartości uznane w literaturze jako toksyczne spotykane w zatruciach śmiertelnych.

W zatruciach bez skutku śmiertelnego wcześniej udzielona pomoc lekarska pozwala na uratowanie życia pacjenta i jednocześnie pozwala uchwycić moment wchłaniania leku i przemiany metaboliczne karbamazepiny już na samym początku, stąd prawdopodobnie wysokie stężenia pierwotnego leku w surowicy pacjentów, przy niskich stężeniach metabolitów.

4.4 Analiza pozostałych materiałów biologicznych pochodzących z zatrucia karbamazepiną

Karbamazepina jest lekiem podlegającym szerokim przemianom metabolicznym, co odzwierciedla się w obecności licznych różnego rodzaju metabolitów. Ze względu na zastosowanie tego leku oraz możliwość analizy materiału pochodzącego z zatruc ostrych bez skutku śmiertelnego oraz materiału sekcyjnego starano się wykazać obecność metabolitów. Dzięki zastosowanej metodzie analizy można było wykryć je w badanych tkankach oraz dokonując ich analizy odpowiedzieć, w których tkankach jest największe nagromadzenie tych związków [10, 62, 83, 89, 101, 118, 125].

Karbamazepina jest lekiem stosowanym przede wszystkim w padaczce oraz chorobach związanych z nadmiernym pobudzeniem komórek nerwowych, co prowadzi do spontanicznej depolaryzacji błony komórkowej i dalszych efektów w postaci skurczów mięśni i wystąpienia objawów choroby. Dane farmakokinetyczne wskazują na tkankę mózgową jako narząd docelowego działania tego leku [6, 58, 60, 63, 76, 88, 93, 105, 106, 121, 128, 135, 147].

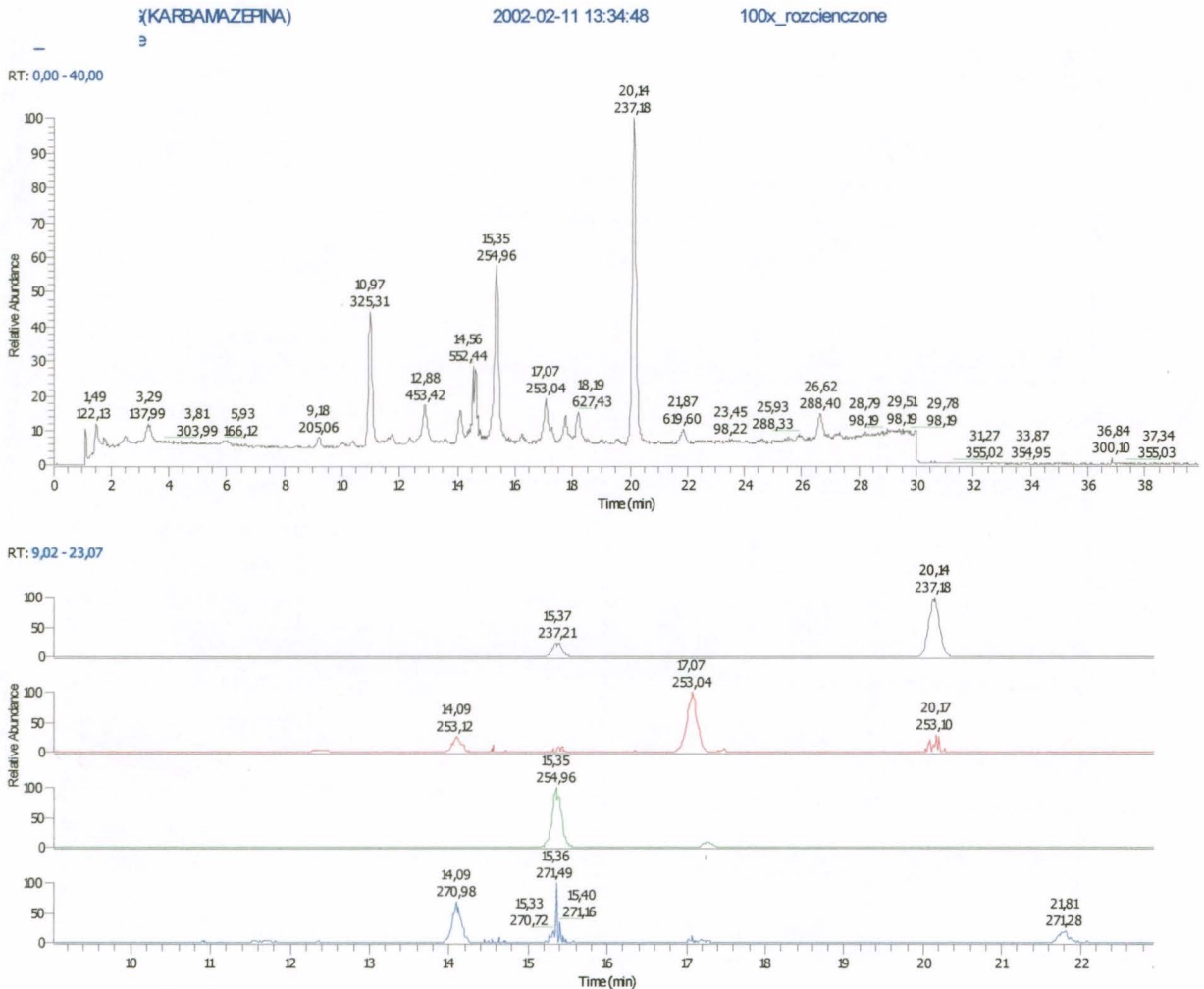
4.4.1 Tkanka mózgową:

W analizie materiału biologicznego była możliwość oceny stężenia CBZ i metabolitów w tkance mózgowej w 8-miu przypadkach. W dwóch przypadkach tkanka mózgową pochodziła od osób zatrutych karbamazepiną i innym lekiem (jeden przypadek z okskarbamazepiną, oraz jeden z diazepamem). U trzech osób stwierdzono zatrucie karbamazepiną, etanolem i w jednym przypadku lorazepamem, w drugim estazolamem, w trzecim luminalem i lewomepromazyną. Pozostałe trzy przypadki dotyczyły zatrucia samą karbamazepiną.

Dane dotyczące stężeń oraz towarzyszących zatruciu innych ksenobiotyków zebrano w tabeli 9.

Badając tkankę mózgową w celu wykazania obecności metabolitów karbamazepiny analizowano widma TIC oraz poszczególne widma masowe dla tej tkanki, uzyskane z powyższych ośmiu przypadków. Na rycinach 22 i 23 przedstawiono chromatogramy uzyskane z dwóch przypadków zatrucia. W jednym przypadku doszło do zatrucia karbamazepiną i okskarbamazepiną, w drugim karbamazepiną, etanolem i lorazepamem.

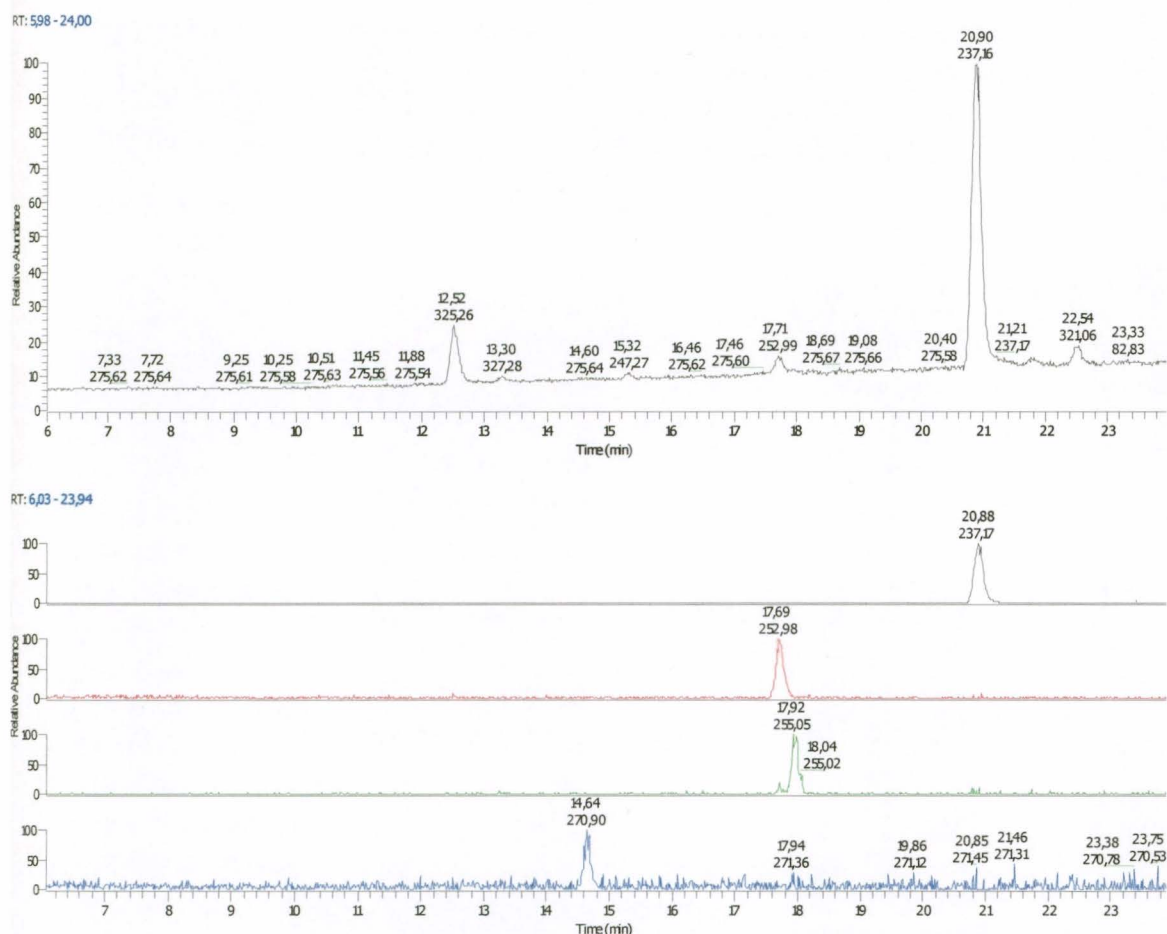
W pierwszym przypadku obok głównych metabolitów widoczne są inne, dodatkowe piki o wartościach $m/z=253$ w widmie masowym. Obecność dodatkowych pików w widmie TIC w tym przypadku jest spowodowane przemianami okskarbamazepiny, które przebiegają podobnie jak metabolizm samej karbamazepiny, ale w wyniku biotransformacji w głównym szlaku nie tworzy się epoksyd. Kończym produktem tego szlaku przemian jest 10-hydroksykarbamazepina [60, 111, 135].



Ryc. 22. Chromatogram TIC oraz widma masowe TIC dla poszczególnych metabolitów karbamazepiny wykazanych w tkance mózgowej, pochodzące z przypadku zatrucia karbamazepiną i okskarbamazepiną.

W drugim przypadku (rycina 23) widmo TIC prezentuje ubogi obraz. Potwierdzeniem znacznego zablokowania przebiegu procesu metabolicznego w tym przypadku są wysokie wartości współczynnika CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH (przypadek 19 - widoczne w tabeli 9).

2001-11-02 18:41:27



Ryc. 23. Chromatogram TIC oraz widma masowe TIC dla poszczególnych metabolitów karbamazepiny wykazanych w tkance mózgowej, pochodzące z przypadku zatrucia karbamazepiną, etanolem i lorazepamem.

Zestawienie stężeń zidentyfikowanych metabolitów w tkance mózgowej przedstawia tabela 9. Stężenia CBZ-E mieszczą się w zakresie od 0,19 – 144,82 mg/kg, dla CBZ-OH od 0,26 – 32,10 mg/kg. Najwyższe wartości stężenia oznaczonych metabolitów CBZ stwierdzono w przypadku 3 (tabela 6), który dotyczył osoby leczonej psychiatrycznie, z powodu padaczki alkoholowej. W tym przypadku stężenia we krwi wynosiły odpowiednio dla CBZ = 99,45 mg/l, CBZ-E = 274,47 mg/l, CBZ-OH = 199,09 mg/l.

W analizowanych przypadkach obliczono wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH. Zakres wartości dla pierwszego współczynnika mieścił się w granicach 0,52 – 15,94. Wartości dla drugiego współczynnika (CBZ/CBZ-OH) wynosiły 2,35-109,73.

Najwyższe wartości uzyskano dla przypadku, gdzie zatruciu karbamazepiną towarzyszył etanol (krew-1,6‰, mocz-2,3‰) oraz lorazepam (lek z grupy benzodiazepiny).

Graficznie stosunki CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH przedstawiono na rycinie 24.

Tabela 9. Zestawienie stężeń karbamazepiny i jej głównych metabolitów w tkance mózgowej, uzyskanej od osób zatrutych tym lekiem.

Nr przypadku z tabeli 6	CBZ [mg/kg]	współczynnik mózg/krew	CBZ-E [mg/kg]		CBZ-OH [mg/kg]		Inny lek lub ksenobiotyk
				CBZ/CBZ-E		CBZ/CBZ-OH	
1	21,08	0,54	3,09	6,82	0,27	78,07	
3	75,56	0,76	144,82	0,52	32,10	2,35	
5	1,85	0,59	1,04	1,78	0,51	3,63	
21	35,13	0,69	4,29	8,19	3,94	8,92	Okskarbamazepina
15	4,36	1,19	1,38	3,16	0,4	10,90	Diazepam
18	1,90	0,05	0,19	10,00	0,26	7,31	Luminal, lewomepromazyna Etanol (k-2,4; m-3,5)
19	37,31	0,93	2,34	15,94	0,34	109,73	Lorazepam, etanol (k-1,6‰, m-2,3‰)
12	14,72	1,28	Ślad		ślad		Estazolam; etanol (2,22‰)

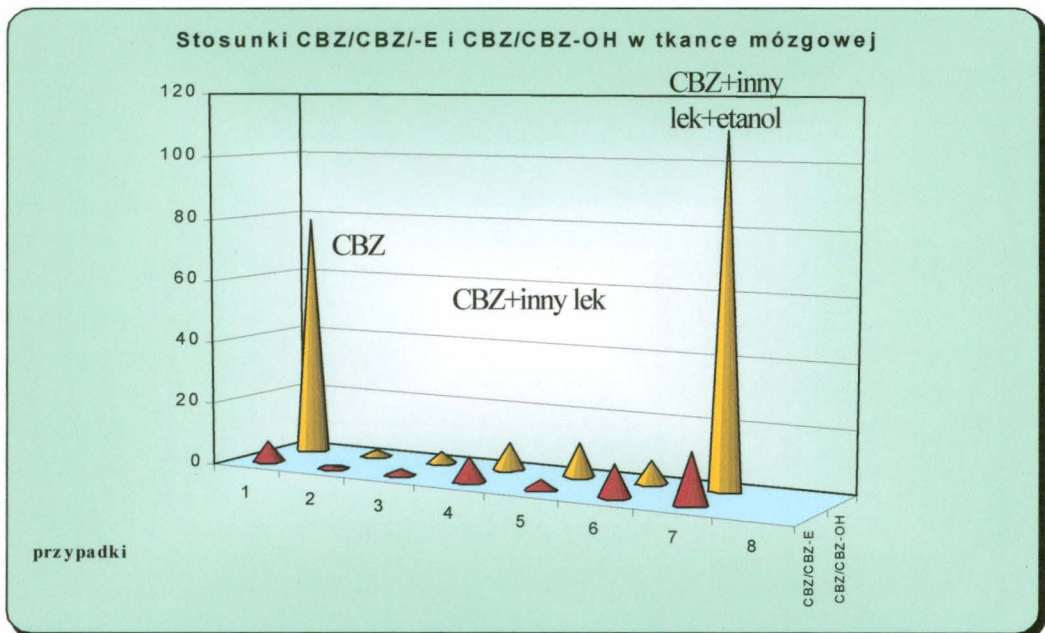
W przypadku zatrucia karbamazepiną, etanolem i estazolamem stężenia metabolitów badanego leku wykryto w stężeniach śladowych.

Dla powyższych przypadków obliczono współczynnik mózg/krew. W pracy zbiorczej pod red. Baselta dla karbamazepiny współczynnik mózg/osocze podano = 1,1.

W powyższych przypadkach zaobserwowano, że współczynnik ten w grupie zatruc samą karbamazepiną mieści się w zakresie 0,54 – 0,76, wykazując wartości zbliżone dla współczynnika krew/osocze=0,59 [10]. W przypadkach zatruc wielolekowych natomiast oznaczane wartości współczynników zamykały się w granicach od 0,93 – 1,28.

W przypadku zatrucia CBZ, luminalem, lewomepromazyną i etanolem współczynnik ten był równy 0,05. Może to wskazywać na zablokowanie dystrybucji CBZ do tkanki mózgowej. Wartość współczynnika mózg /krew może określać sposób rozmieszczenia badanego leku w tkankach. Im większa wartość tego współczynnika, tym większe stężenie w badanej tkance w odniesieniu do krwi. Dostępne źródła literaturowe podają, iż obliczenia tego rodzaju były

wykonywane w odniesieniu do osocza, jednakże w materiale sekcyjnym, ze względu na hemolizę krwinek uzyskanie osocza jest niemożliwe [10].



Ryc. 24. Wykres przedstawiający wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH w tkance mózgowej, w zatruciach śmiertelnych.

Obserwując zatrucia karbamazepiną, którym towarzyszył etanol można zaobserwować znaczne spowolnienie procesów przemian metabolicznych w tkance mózgowej. Świadczą o tym wysokie wartości CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH uzyskane dla tej tkanki. Jednocześnie podwyższona wartość współczynnika mózg/krew sugeruje, że lek łatwiej osiągnął tkankę mózgową niż w przypadkach zatruc samą karbamazepiną.

Analizując pozostałe chromatogramy i widma TIC dla tkanek mózgowych nie stwierdzono obecności innych metabolitów, poza związkami głównego szlaku przemian tj. epoksydem i formą diolową karbamazepiny.

4.4.2 Płyny ustrojowe:

W kilku przypadkach zatruc wśród materiału sekcyjnego pobrano również mocz, żółć, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z gałki ocznej oraz w jednym przypadku ocieklinę płucną. W tych materiałach biologicznych oznaczono stężenia głównych metabolitów karbamazepiny (obok niej samej) oraz starano się przeanalizować dostępne materiały w kierunku obecności innych metabolitów badanego leku.

Tabela 10. Zestawienie stężeń karbamazepiny i jej głównych metabolitów w płynach ustrojowych uzyskanych w trakcie sekcji zwłok osób zatrutych karbamazepiną.

Przypadek z tabeli 6	CBZ [mg/l]	CBZ-E [mg/l]		CBZ-OH [mg/l]		material	Lek i/lub alkohol
			CBZ/CBZ-E		CBZ/CBZ-OH		
11	0,46	0,02	28,94	0,13	3,48	mocz	Amitriptylina, etanol (k-2,6; m-3,2)
15	1,73	6,97	0,25	114,07	0,02	mocz	Diazepam
	1,19	0,81	1,47	0,73	1,63	PMR	
	0,91	0,63	1,44	0,60	1,52	Płyn z gałki ocznej	
18	8,16	0,91	8,97	36,27	0,22	mocz	Lewomepromazyna, luminal; etanol (k-2,4‰, m-3,5‰)
19	5,50	0,77	7,14	3,03	1,81	mocz	Lorazepam, etanol (k-1,6‰, m-2,3‰)
12	0,60	0,29	16,01	2,70	5,41	mocz	Estazolam, etanol (2,22‰)
	1,90	0,12	15,83	0,49	3,88	zółć	
	1,52	0,12	12,67	1,10	1,38	Płyn z gałki ocznej	
8	0,50	0,04	12,5	0,10	5,00	mocz	Etanol (k-0,5‰, m-2,2‰)
21	11,99	5,61	2,14	82,75	0,14	mocz	Okskarbamazepina
	76,56	9,82	7,80	51,45	1,49	zółć	
2	0,57	0,16	3,53	0,95	0,60	mocz	
3	17,42	153,41	0,12	371,58	0,05	mocz	
7	1,18	0,41	2,88	0,11	10,73	zółć	
	0,71	0,06	11,83	-----	-----	PMR	
	2,65	0,08	33,12	0,12	22,08	Ocieklina płucna	
	0,53	0,87	0,61	1,12	0,47	mocz	
1	147,16	17,63	8,35	10,60	13,88	zółć	
	6,98	1,93	3,62	0,57	12,25	Płyn z gałki ocznej	
5	1,77	1,35	1,31	0,72	2,46	Płyn z gałki ocznej	
6	0,19	0,10	1,90	-----	-----	Płyn z gałki ocznej	

Przypadki zatruc karbamazepiną, w których analizie poddano inne dostępne materiały biologiczne zabrano w tabeli 10.

W moczu, w dwóch przypadkach wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH są bardzo niskie (pomimo wysokich stężeń badanych związków), co potwierdza dużą szybkość zachodzących przemian metabolicznych. W przypadku 15 (tabela nr 6), w którym zatruciu towarzyszył diazepam zaobserwowano bardzo niskie stężenia oznaczanych związków w moczu, PMR i płynie z gałki ocznej (stężenie CBZ we krwi = 3,66 mg/l) i jednocześnie obliczone wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH mieściły się w zakresach odpowiednio: I – 0,25 – 1,47 i II – 0,02 – 1,63, co sugeruje prawidłowy przebieg biotransformacji zażytego leku. Drugim ciekawym przypadkiem był przypadek nr 12 (tabela 6). Oznaczone stężenia w moczu, żółci i płynie z gałki ocznej były na bardzo niskim poziomie (CBZ = 0,60 – 1,90 mg/l; CBZ-E = 0,12 – 0,29 mg/l oraz CBZ-OH = 0,49 – 2,70), jednakże obliczone zgodnie z regułą Apple'a współczynniki CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH sugerują zablokowanie przemian metabolicznych na pierwszym etapie biotransformacji tj. tworzenie epoksydu (zakres wartości 12,67 – 16,01). Wartości współczynnika CBZ/CBZ-OH są w zakresie 1,38 – 5,41. W tym przypadku było to zatrucie wielolekowe tj. z estazolamem i etanolem.

W pozostałych przypadkach stężenia karbamazepiny i jej metabolitów w innych analizowanych tkankach, są w proporcjonalnych ilościach do stężeń znalezionych we krwi.

4.5 Analiza metabolitów karbamazepiny

Podjmując próbę identyfikacji innych metabolitów w analizowanych przypadkach zatruc starano się oprzeć o dane literaturowe, które wykorzystywano w analizie i identyfikacji metabolitów opisaną wcześniej metodą LC/MS [41, 56, 62, 89, 90, 99, 111, 120, 135, 138].

Analizując dostępne tkanki pochodzące od osób zatrutych (zarówno w przypadkach zatruc ostrych, bez skutku śmiertelnego jak i śmiertelnych) stwierdzono obecność innych metabolitów, obok epoksydu i formy diolowej. Maggs i wsp. opisali w swojej pracy metabolity karbamazepiny wyizolowane z moczu pacjentów leczonych karbamazepiną, stosując do identyfikacji tych związków metodę LC/MS. Poszukując metabolitów karbamazepiny różni badacze analizowali dostępne materiały, jednakże dotychczasowe badania opierają się głównie na analizie surowicy krwi oraz moczu [90, 111, 120].

Stwierdzono, że do najczęściej izolowanych metabolitów karbamazepiny z moczu i surowicy należą: 10-OH-karbamazepina, 10,11-dihydro-10-hydroksykarbamazepina, 3-OH-karbamazepina, 2-OH-karbamazepina oraz 9-hydroksymethyl-10-karbomyloakrydan [90, 120].

Opierając się na powyższych badaniach starano się wyizolować z dostępnych materiałów inne metabolity karbamazepiny tj. N- i O- glukuroniany karbamazepiny, oraz monooksypochodne. W badaniach uwzględniano wszystkie dostępne płyny i tkanki, jednak obecność niektórych z przedstawionych metabolitów stwierdzono tylko w tkance wątrobowej i nerkowej oraz w moczu i w pojedynczych przypadkach we krwi. Dlatego też analizę tych związków i ich widma starano się prześledzić głównie w moczu, z uwagi na fakt, że mocz praktycznie nie podlega procesom gnilnym, co powoduje występowanie mniejszego tła biologicznego. Innym czynnikiem sprzyjającym jest proces zagęszczania moczu, co powoduje, że stężenia wydalanych metabolitów są tutaj wyższe. Tkanką, w której można było również wyizolować badane metabolity była wątroba, ze względu na jej rolę w organizmie i znaczący udział w metabolizmie karbamazepiny. W szczególny sposób było to zaznaczone w przypadkach zatruc, w których stężenie karbamazepiny było na bardzo wysokim poziomie (przypadek 3, 10, 21 z tabeli 6).

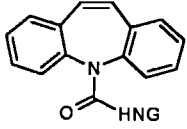
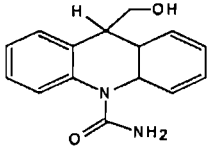
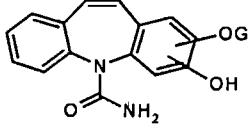
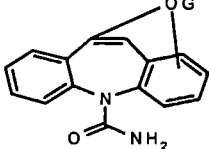
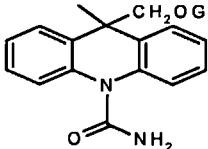
Materiałem poddanym analizie pod kątem obecności innych metabolitów była również surowica pacjentów, pochodząca z przypadków zatruc bez skutku śmiertelnego. W tej grupie przypadków badane metabolity wykryto w większym stężeniu, prawdopodobnie ze względu na bardzo wysokie stężenia karbamazepiny i długi okres przeżycia (leczenie zatrucia). Związkiem najczęściej izolowanym w grupie innych metabolitów spotykanych w surowicy był 9-hydroksymethyl-10-karbomyloakrydan (HMCA). Podobnie obecność tego metabolitu w surowicy krwi stwierdzili w swoich badaniach Mandrioli i wsp. oraz Pienimaki i wsp. [90, 111].

Szczególnym rodzajem materiału biologicznego poddanego analizie w kierunku obecności wymienionych metabolitów była tkanka mózgowa. Analizując chromatogramy nie stwierdzono obecności tych związków, pomimo przypadków zatruc, w których stężenie karbamazepiny i metabolitów głównego szlaku było bardzo wysokie (przypadki 3, 19, 21 z tabeli 6 i 9).

W badanych widmach stwierdzono obecność pików o wartościach m/z odpowiadających głównym metabolitom karbamazepiny, i innych czasach retencji. Po analizie widm masowych tych związków stwierdzono, iż były to N- i O- glukuroniany karbamazepiny, oraz monooksypochodne.

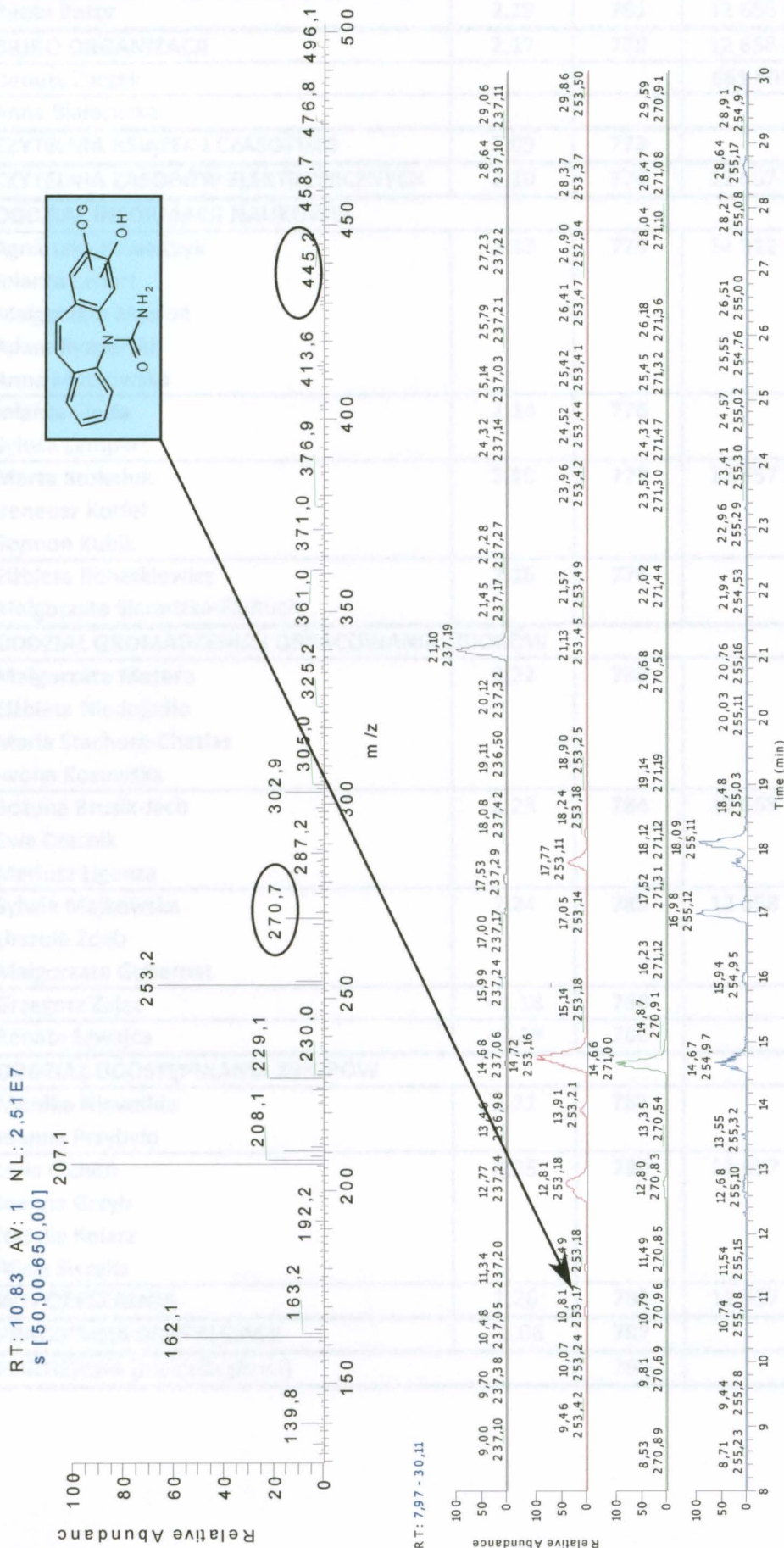
W tabeli 11 przedstawiono struktury chemiczne zidentyfikowanych metabolitów, ich lokalizację oraz charakterystyczne piki występujące w widmach masowych tych związków i będące podstawą identyfikacji. Czas retencji nie był czynnikiem decydującym za względu na brak wzorców odniesienia, jednakże dawał możliwość porównania różnych rodzajów tkanek i materiałów biologicznych zawierających badane związki.

Tabela 11. Zestawienie zidentyfikowanych metabolitów karbamazepiny, obecnych w niektórych przypadkach zatruc śmiertelnych i bez skutku śmiertelnego, innych rodzajach płynów i tkanek.

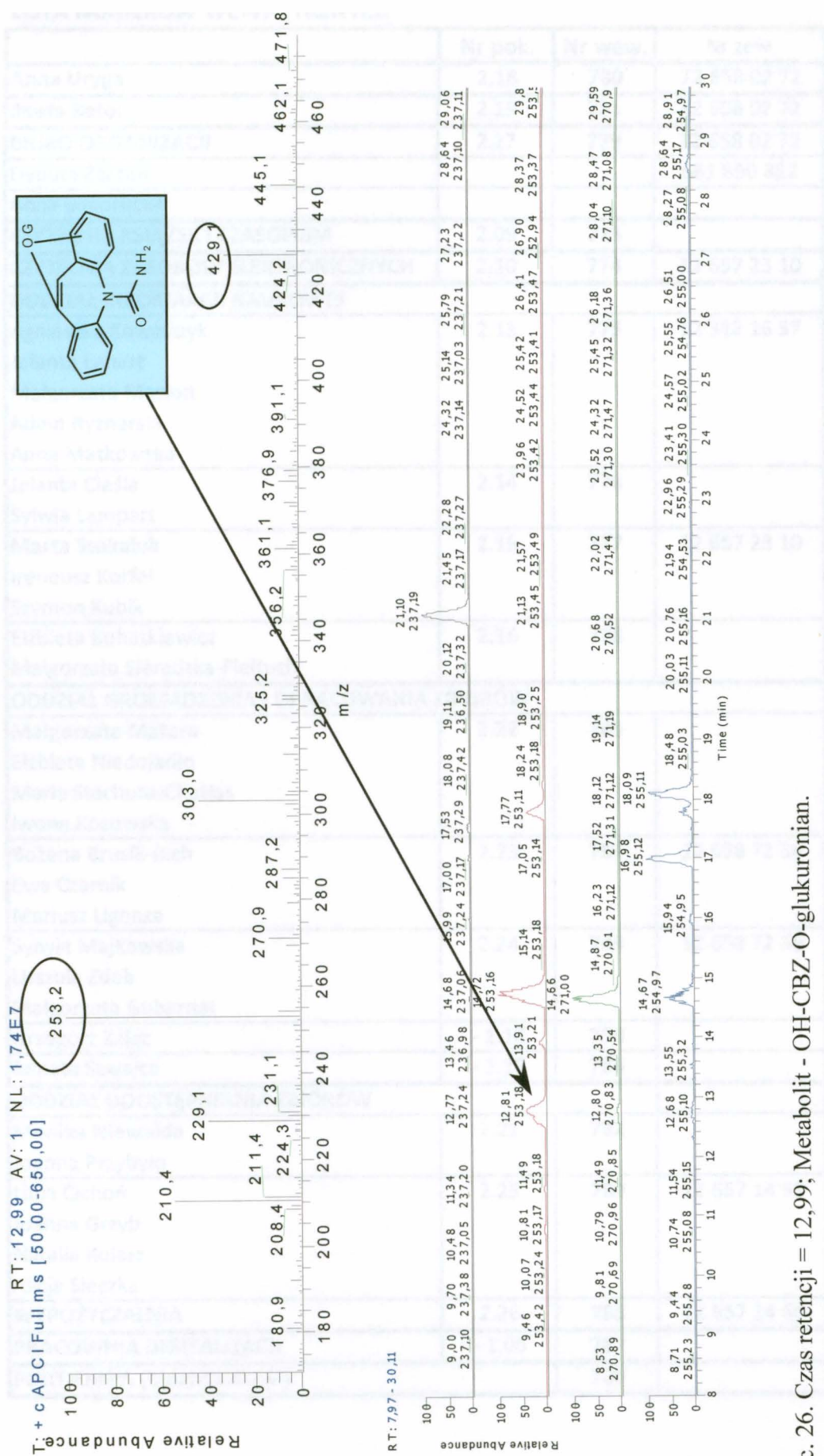
Wartości m/z	Czas retencji [min]	Metabolit	Miejsce lokalizacji
413, 237, 220	17,50	CBZ N-glukuronian 	Mocz Przypadek nr 3, 18 (tab.6)
431, 255	16,98	9-hydroksymethyl-10-karbomyloakrydan (HMCA) 	Mocz, surowica Przypadek nr 3, 21 (tab.6)
445, 237, 253, 255, 271	10,83	(OH)2CBZ-O-glukuronian 	Mocz Przypadek nr 3, 18 (tab.6)
429, 253, 210	12,99	OH-CBZ-O-glukuronian 	Mocz Przypadek nr 3, 18 (tab.6)
447, 253, 220,	14,04	OH-9-HM-10-CA O-glukuronian 	Mocz Przypadek nr 3, 18, 21 (tab.6)

Na rycinach 25, 26, 27, 28, 29 przedstawiono widma TIC oraz widma masowe zidentyfikowanych metabolitów karbamazepiny oraz struktury odpowiadające zidentyfikowanym związkom [89, 90, 99, 111].

Analizując chromatogramy materiałów biologicznych pochodzących z różnego rodzaju zatruc badanymi związkami, oraz w oparciu o dostępne dane literaturowe stwierdzono obecność różnych przemian metabolicznych karbamazepiny [89]. Pomimo, iż największe znaczenie w tym procesie ma główny szlak metaboliczny tj. tworzenie epoksydu i następnie diolu, nie można pominąć innych przemian. Liczba powstających metabolitów świadczy m.in. o długości przeżycia pacjenta zatrutego lub może stanowić podstawę do wnioskowania o przyczynie zgonu denata.



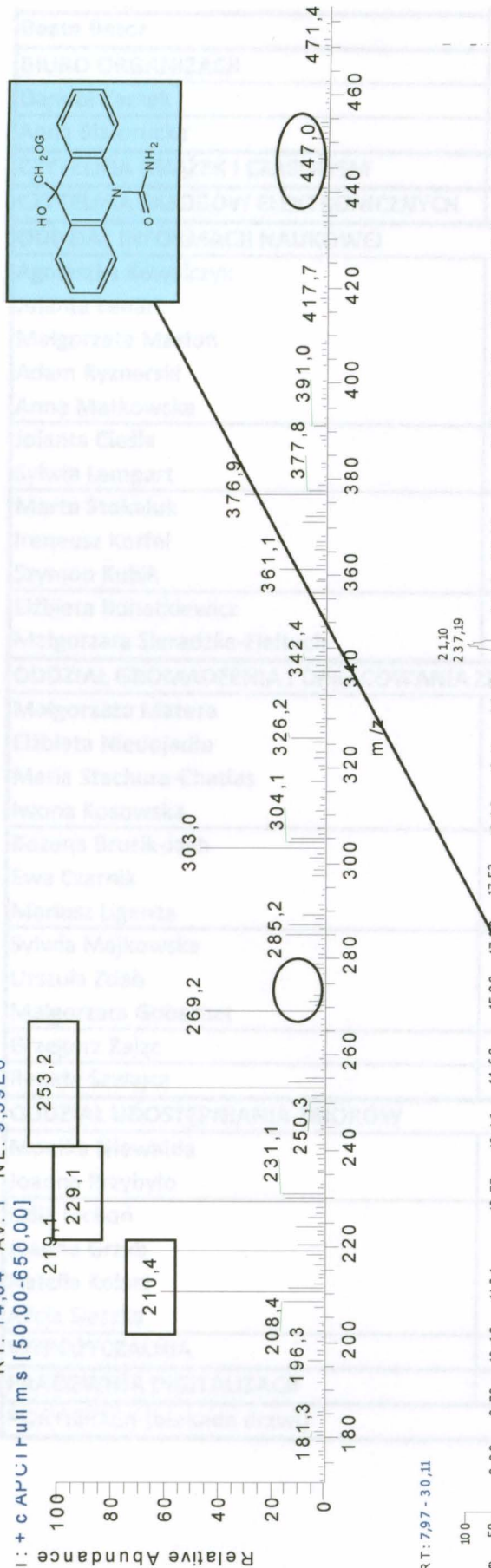
Ryc. 25. Chromatogram TIC przedstawiający widma masowe o $m/z=237, 253, 255, 271$. Górna część przedstawia widmo masowe dla związku o czasie retencji=10,83 i $m/z=253$. Obraz taki odpowiada strukturze (OH)2CBZ-O-glukuronianu.



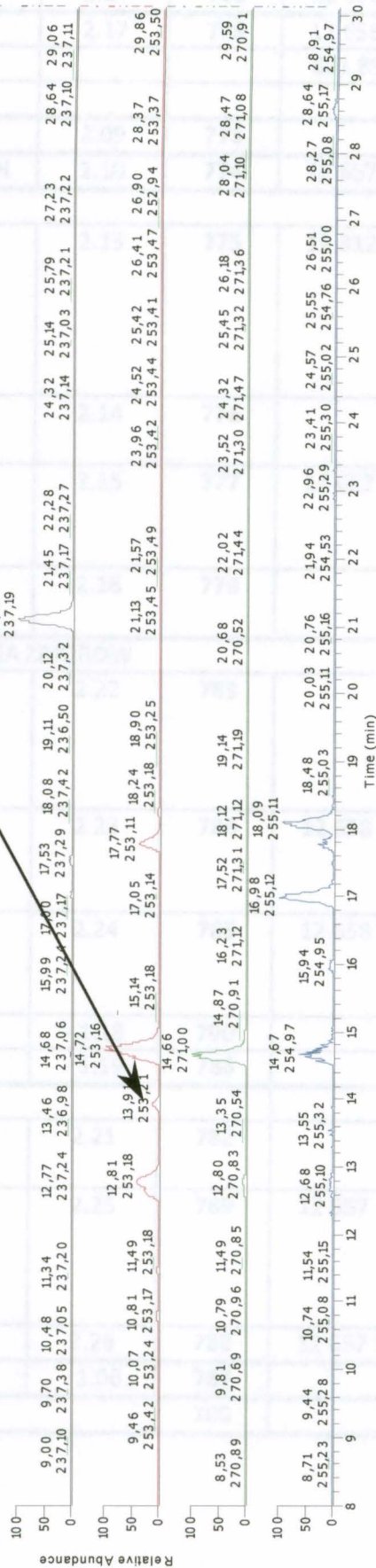
Ryc. 26. Czas retencji = 12,99; Metabolit - OH-CBZ-O-glukuronian.

RT: 14,04 AV: 1 NL: 9,39E6

I: + c APCIFull.ms [50,00-650,00]

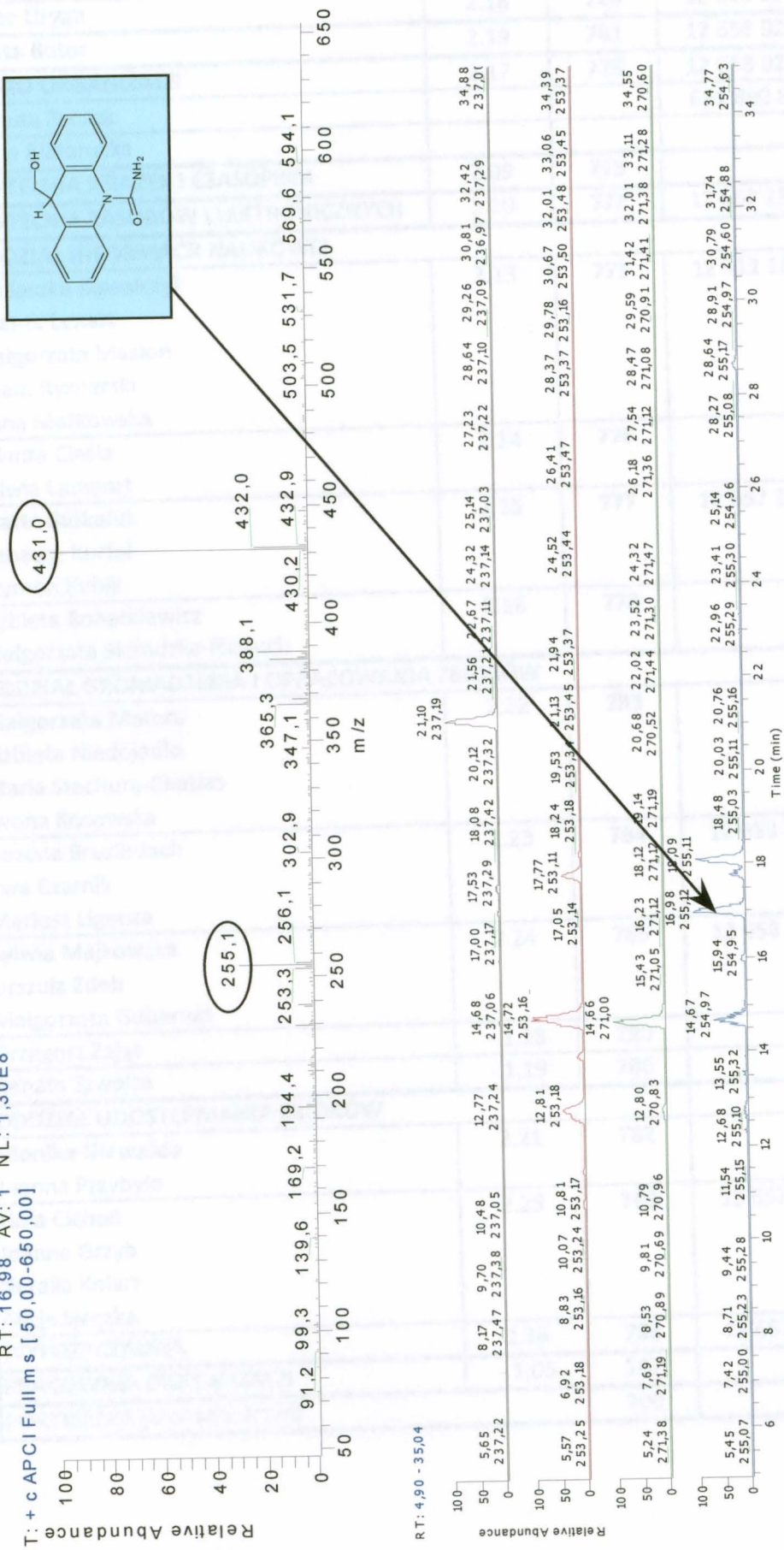


RT: 7,97 - 30,11



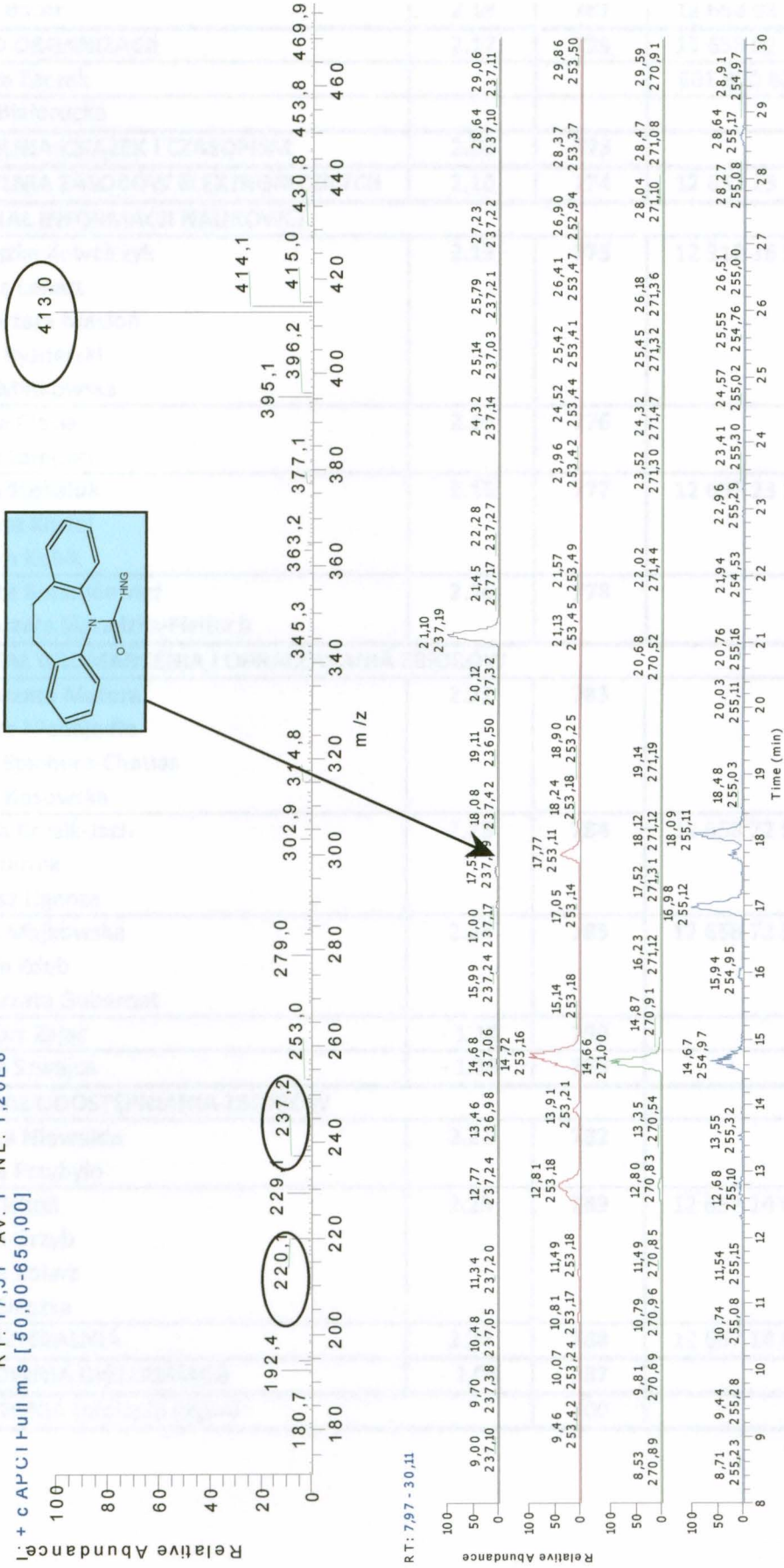
Ryc. 27. Czas retencji = 14,04; Metabolit - OH-9-HM-10-CA O-glukuronian

RT: 16,98 AV: 1 NL: 1,30E8
 T: + cAPCI Full ms [50,00-650,00]



Ryc. 28. Czas retencji = 16,98; Metabolit - HMCA (9-hydroksymetylo-10-karbomyloakrydan); M/z=255

RT: 17,51 AV: 1 NL: 1,20E8
 + c APC: Full ms [50,00-650,00]



Ryc. 29. Czas retencji = 17,50; Metabolit - CBZ-N-glukuronian

5. Omówienie wyników

Wraz z postępowaniem cywilizacji liczba trucizn i związków o działaniu toksycznym stale wzrasta, podobnie jak częstość zatruć. Z upływem czasu zmienia się jedynie rodzaj i przyczyna zatrucia, zatrucia złożone (np. wielolekowe) zastępują zatrucia proste (jednym związkiem) [9, 65, 70, 81, 91, 107].

Zatrucia, ich przebieg oraz konsekwencje w postaci upośledzenia funkcji życiowych do zgonu włącznie, stanowią przedmiot zainteresowań toksykologa zarówno klinicznego jak i sądowego. Różnice wynikają z zadań, którymi zajmuje się toksykolog kliniczny i sądowy. W toksykologii klinicznej prowadzone badania mają pomóc w diagnozowaniu i leczeniu zatrucia, wyniki analiz w takich przypadkach są pomocne w ocenie stanu pacjenta i pozwalają kontrolować proces leczenia [10, 23, 32, 82, 101, 107].

Toksykolog sądowy ma z kolei odpowiedzieć na pytania stawiane przez przedstawicieli prawa, czy doszło do zatrucia, czy związki obecne w materiale analizowanym mogły doprowadzić do efektu w postaci zgonu denata [35, 40, 54, 92, 94, 101].

Dwie różne dziedziny medycyny, które łączą wspólne działania – poznanie przemian badanych związków i określenie markerów, które pozwolą na właściwą diagnozę. Dla klinicysty jest to potwierdzenie zatrucia, poznanie mechanizmów działania i możliwość kontroli leczenia. Dla toksykologa sądowego to potwierdzenie przyczyny zgonu i możliwość wyjaśnienia mechanizmów, dlaczego doszło do takiego skutku [25, 35, 40, 54, 92, 94, 101].

Współczesna toksykologia dzięki rozwojowi nowoczesnych technik i metod analizy materiałów biologicznych uzyskała nowe możliwości. Stanowią one podstawę diagnostyki toksykologicznej w leczeniu zatruć oraz są niezbędne w orzecznictwie sądowno-lekarskim. Analiza toksykologiczna ma wykazać obecność i rodzaj leków oraz powinna pozwolić na dokonanie oceny ilościowej stanowiącej podstawę orzecznictwa toksykologiczno - sądowego. W przypadku zatruć złożonych metodyka musi gwarantować przede wszystkim selektywne oznaczenie każdego składnika w mieszaninie jako podstawy dalszych etapów ekspertyzy, m.in. rozważenia możliwych interakcji zidentyfikowanych leków, co może stanowić podstawę wnioskowania o wystąpieniu efektu toksycznego [14, 20, 40, 54, 66, 69, 72, 73, 92].

Podjmując powyższe badania dotyczące zastosowania metody chromatografii cieczowej z detektorem masowym w analizie metabolizmu leków w zatruciach starano się odpowiedzieć w szczególności na następujące pytania:

1. w jaki sposób można oceniać stopień zatrucia lekiem, opierając się na prześledzeniu zmian stężeń leku i metabolitów?
2. na ile pomocne są oznaczenia stężeń leku i jego metabolitów w tkankach przy wnioskowaniu o przyczynie zgonu w przypadkach śmiertelnych zatruc?
3. czy opracowanie bazy danych odnośnie stężeń badanego leku i jego metabolitów jest przydatne zarówno w klinice zatruc ostrych (leczenie pacjentów zatrutych) do szacowania rokowań przeżycia jak i w orzecznictwie sądowo-lekarskim do wnioskowania o przyczynie zgonu?

Do badań mających odpowiedzieć na powyższe pytania wybrano lek - karbamazepinę, stosowany w różnego rodzaju chorobach, w tym neuralgiach i padaczkach, w których dochodzi do zaburzeń w przewodnictwie neuronowym. Lek ten został wybrany na podstawie danych statystycznych, dotyczących zatruc bez skutku śmiertelnego z Kliniki Toksykologii szpitala im. Rydygiera oraz danych statystycznych dotyczących zatruc śmiertelnych z Zakładu Medycyny Sądowej CMUJ w Krakowie [65, 70, 91].

Karbamazepina jest powoli, lecz prawie całkowicie wchłaniana po przyjęciu doustnym. Jest lekiem o względnie dużej objętości dystrybucji i w zatruciu objętość ta ulega zwiększeniu [16, 32, 85, 107, 116].

Terapeutyczny zakres stężeń karbamazepiny w surowicy mieści się od 4-12 mg/l [7, 10, 23, 32, 85, 116]. Przy górnej granicy stężenia terapeutycznego ryzyko wystąpienia i stopień ciężkości efektów niepożądanych znacznie się zwiększa. Przy przedawkowaniu natomiast, kiedy stężenie w surowicy wzrasta powyżej 20 mg/l wystąpienie objawów zatrucia jest wysoce prawdopodobne przebiegając poprzez stany otępienia aż do śpiączki włącznie [107, 124, 132].

W przebiegu biotransformacji karbamazepiny wykryto i opisano 33 metabolity. Największe znaczenie jednakże ma główny szlak prowadzący do tworzenia 10,11-epoksykarbamazepiny przy udziale wątrobowej monooksygenazy, a następnie tworzenie 10,11-dihydroksykarbamazepiny z udziałem hydrolazy epoksydowej frakcji mikrosomalnej, w końcowym etapie sprzęganie z glukuronianami i wydalanie z moczem [3, 31, 62, 83, 89, 97]. Ten szlak metaboliczny ma największe znaczenie ze względu na aktywność farmakologiczną głównego metabolitu tj. epoksydu, zbliżonej do aktywności samej karbamazepiny. Odzwierciedleniem tego faktu może być przebieg zatrucia, co należy uwzględnić przy ocenie stanu klinicznego [36, 115, 118, 124, 132].

Innym, o dużym znaczeniu szlakiem metabolicznym przemian karbamazepiny jest oksydacja do formy fenolowej i bezpośrednie sprzężanie z glukuronianami, następnie wydalanie w postaci N-glukuronianów. W badaniach nad obecnością innych metabolitów karbamazepiny w materiale biologicznym opierano się na pracy Magss i wsp. [88], w której zostały opisane inne szlaki metaboliczne. Autorzy zastosowali metodę LCMS do identyfikacji metabolitów znalezionych w moczu pacjentów poddanych terapii CBZ. W innych pracach opisano metabolity, których obecność stwierdzono w surowicy krwi pacjentów. Są to 2-hydroksykarmamazepiny (2-OH-CBZ), 3-hydroksykarmamazepiny (3-OH-CBZ), 10-hydroksykarmamazepiny (10-OH-CBZ) oraz 9-hydroksymetylo-10-karbomyloakrydanu (HMCA) [83, 89, 90, 111, 120].

Pienimaki i wsp. [111] opisali tworzenie 10-OH-CBZ w metabolizmie karbamazepiny. Donoszą oni, iż metabolit ten wykazuje aktywność farmakologiczną i jednocześnie jest głównym metabolitem okskarmamazepiny (10-keto analogu karbamazepiny). W przypadkach zatruc CBZ analizowanych w trakcie powyższych badań nie wykazano obecności tego metabolitu, lub był on w śladowych ilościach, poniżej wykrywalności metody.

Problem identyfikacji metabolitów karbamazepiny jest złożony. Wynika to z trudności pozyskiwania wzorców metabolitów. Wiele firm oferuje różne metabolity, z reguły jednak są to główne metabolity leków o najszerszym zastosowaniu. Istnieją także możliwości syntezy metabolitów, zabiegi te jednak są skomplikowane, a tym samym kosztowne.

Metoda chromatografii cieczowej z detektorem masowym jest jedną z najlepszych do identyfikacji nieznanymi związków. Dzięki tandemowej spektrometrii masowej istnieje możliwość identyfikacji metabolitów, pomimo braku ich wzorców. Można tu wykorzystać parametry teoretyczne, oparte na bazie dostępnej literatury i wiedzy chemicznej. Dzięki temu można teoretycznie określić budowę związków, wykorzystując widma masowe ich struktur podstawowych i fragmentowanych. W powyższych badaniach wykorzystano właśnie tę opcję, dzięki której możliwe było potwierdzenie struktury badanych związków [56, 62, 89, 90, 99, 111].

Analizując przemiany metaboliczne karbamazepiny starano się konfrontować rodzaj powstających metabolitów i ich zawartość w dostępnych tkankach i płynach ustrojowych. Do tkanek użytych w badaniach należały te, które można było pozyskać w trakcie sekcji zwłok osoby zatrutej karbamazepiną oraz surowica pacjentów pobrana w momencie przyjęcia na oddział, w stanie zatrucia ostrego CBZ. Nie w każdym przypadku inna tkanka była dostępna. Tam, gdzie było to możliwe zatem zbadano takie materiały jak surowicę krwi, mocz, żółć, nerkę, wątrobę i mózg. Stwierdzono obecność 2-OH-CBZ, 3OH-CBZ i HMCA.

Identyfikację tych metabolitów przeprowadzono na podstawie widm masowych. Uzyskane dane analizowano w odniesieniu do danych z piśmiennictwa [62, 89].

Metabolity tworzące się w głównym szlaku przemian tj. epoksyd i diol, można było identyfikować i oznaczać ilościowo z wymaganą precyzją i dokładnością, dzięki możliwości odniesienia do istniejących (dostępnych na rynkach) wzorców tych związków oraz po przeprowadzeniu procesu walidacji metody LC/MS [62, 83, 117].

Udział pozostałych metabolitów w badanych próbkach zależy jest od ciężkości zatrucia, szybkości przemian metabolicznych oraz procesu eliminacji badanego ksenobiotyku. Pewnego rodzaju problem stanowiła identyfikacja innych metabolitów o mniejszym znaczeniu dla samego przebiegu zatrucia, tj. N- i O- glukuronianów oraz mono- i dihydroksypochodnych karbamazepiny [62, 83, 89, 90, 111].

W badanych materiałach pochodzących od osób zatrutych karbamazepiną obecność metabolitów tworzonych w wyniku zachodzących przemian poza głównym szlakiem metabolicznym była możliwa do wykazania w moczu, surowicy krwi, żółci i w bardzo niewielkich ilościach (ślady) w niektórych tkankach osób zatrutych. Dotyczyło to przypadków, w których stężenie samej karbamazepiny w badanej tkance było bardzo wysokie, co pozwalało na zwiększenie procentowego udziału innych szlaków biotransformacji badanego leku [124, 132]. Analiza ilościowa nie była wykonywana ze względu na brak odniesienia do wzorców.

Pewną trudność stanowi proces ekstrakcji tych substancji. Prawdopodobnie zastosowana w badaniach technika (ekstrakcja typu ciecz-ciecz) nie pozwala na duży procent odzysku i jest obciążona znacznymi stratami. Potwierdzają to badania prowadzone przez van Belle i wsp. oraz dostępne dane literaturowe [56, 90, 135]. Innym problemem jest fakt, iż procentowy udział tych metabolitów w biotransformacji karbamazepiny jest bardzo niewielki, co uwzględniając niski procent odzysku stwarza możliwość utraty szansy ich wykrycia [83, 89, 90, 111].

Dostępne piśmiennictwo zawierające opisy szlaków metabolicznych karbamazepiny jest dość ubogie. Brak również opisu powstających metabolitów i ich znaczenia w procesie zatrucia [3, 11, 13, 50, 83, 89]. W większości zidentyfikowane metabolity stanowią formy połączone z glukuronianami lub sulfonami [111].

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny metabolitów w oparciu o uzyskane wartości jonów pozornych widm masowych poszczególnych jonów oraz danych teoretycznych dostępnych w publikacjach [62, 83, 89, 90, 99, 111, 125, 138]. W tabeli 11 przedstawiono

zidentyfikowane metabolity karbamazepiny, z uwzględnieniem materiału biologicznego, z którego został wyizolowany [62, 89].

Na rycinach od 25 – 29 przedstawiono zestawienia widm masowych i widm TIC dla jonów $[M+H^+]$ o wartościach $m/z=237, 253, 271$ i 255 . W chromatogramie TIC po rozdziale gradientowym zawartości próbki uzyskano szereg pików o wartościach $m/z=253$ (wartość odpowiadająca jonowi $[M+H^+]$ dla formy epoksydowej) i różnych czasach retencji, zawierające w swoich widmach masowych dodatkowe piki o wartościach $m/z=429$ oraz 447 . Obraz widma odpowiada monohydroksykarmamazepinie (z braku wzorców nie można stwierdzić, czy jest to 2-OH-CBZ czy 3-OH-CBZ). W badaniach nad metabolitami karbamazepiny stwierdzono obecność obu tych struktur w większości materiałów biologicznych, pobranych od osób leczonych karbamazepiną [11, 62, 83, 89, 111].

Do metabolitów, których obecność z danych literaturowych potwierdzono należy 9-hydroksymetylo-10-karbomyloakrydanu (HMCA). Ten związek wykazano zarówno we krwi sekcyjnej, surowicy krwi, jak i tkankach takich jak: wątroba czy nerka.

Analizując proces eliminacji badanego leku i jego metabolitów z ustroju pacjenta zatrutego powinno konfrontować się ten fakt z objawami klinicznymi, zwłaszcza w przypadku takiej sytuacji, w której którykolwiek z metabolitów wykazuje aktywność farmakologiczną, zbliżoną do leku macierzystego, co odzwierciedla się w przebiegu zatrucia [9, 10, 23, 32, 36, 85, 107, 117, 124, 132].

Jedną z właściwości karbamazepiny jako leku, którą należy uwzględnić interpretując uzyskane wyniki są właściwości indukcji enzymatycznej tego leku, co prowadzi do konieczności kontroli dawkowania w terapii (aż do ustalenia właściwej dawki, co trwa około trzech, czterech tygodni od momentu rozpoczęcia leczenia). Jest to widoczne w skróceniu biologicznego okresu półtrwania, zwłaszcza w politerapii ($t_{1/2}$ =od 5-13 godzin). Stąd optymalne stężenie karbamazepiny w surowicy pacjentów leczonych tym lekiem powinno uwzględniać również stężenie 10,11-epoksykarmamazepiny oraz stopień wiązania z białkami. Wynika to z faktu, że oba te związki są odpowiedzialne zarówno za efekty terapeutyczne, jak i występowanie efektów niepożądanych i działanie toksyczne [7, 23, 84, 87, 93, 98, 108, 115, 117, 121, 124, 129, 131-133].

Przebadano 33 przypadki zatruc CBZ bez skutku śmiertelnego (zebrane w tabeli 5). Tylko w trzech przypadkach znalezione stężenie karbamazepiny w dniu przyjęcia na oddział mieściło się w zakresie terapeutycznym (przypadek nr 24, 27, 29). Zatruciom tym towarzyszył etanol (odpowiednio 0,94; 1,85; 0,81‰) i pomimo niskich stężeń CBZ

i metabolitów, występowały objawy zatrucia. Obliczone wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH wynosiły odpowiednio: przyp.24 – 5,16 i 3,92; przyp. 27 – 27,89 i 67,77; przyp. 29 – 7,99 i 5,35. W pozostałych przypadkach zatruc stężenia karbamazepiny wielokrotnie przekraczały stężenia spotykane w terapii i uważane za śmiertelne.

Wykrycie wysokich stężeń CBZ i jej metabolitów u pacjentów żyjących wzbudza uzasadnione zainteresowanie, ale wyjaśnienie takich wyników nie jest proste. Wydaje się, że w wielu przypadkach może być wynikiem słabej rozpuszczalności podawanej postaci leku karbamazepiny w środowisku wodnym oraz szybkiej interwencji lekarza u pacjenta, który niedawno przyjął toksyczną dawkę leku [107, 109]. Problem jest bardziej złożony i powinien być rozważany w odniesieniu do indywidualnego pacjenta oraz w przypadkach przewlekłego stosowania leku, pozwalającego na ujawnienie się działania autoindukcyjnego CBZ, co w konsekwencji jest przyczyną zmian w metabolizmie karbamazepiny, zachodzącym w różnych przypadkach [2, 11-13, 23, 30, 87, 112, 124, 129, 130]

W przypadku zatrucia ze skutkiem śmiertelnym oznaczenia leku odnoszą się do momentu, w którym nagle zostaje przerwany metabolizm i ustają wszelkie funkcje organizmu. Przyjmuje się z pewnym przybliżeniem, że wyniki analizy toksykologicznej pośmiertnej odnoszą się do chwili śmierci. Stężenia CBZ i metabolitów oznaczone w materiale sekcyjnym zależą od wielu czynników, a mianowicie od przyjętej dawki leku, czasu zgonu i okoliczności, w których zgon nastąpił, a nawet czasu przeprowadzenia autopsji i badania toksykologicznego po śmierci. W pewnej liczbie przypadków we krwi nie wykrywa się ksenobiotyku, bądź jest on obecny w stężeniach śladowych, na granicy detekcji, zaś w płynach ustrojowych obecny jest w niskich stężeniach (w zakresie stężeń terapeutycznych). Sytuacja taka ma miejsce wówczas, gdy zgon nastąpił w późnej fazie eliminacji, efekt toksyczny zaś może być wywołany sumarycznym działaniem poszczególnych ksenobiotyków. W wielu przypadkach zatem należy zwrócić uwagę na wpływ procesów redystrybucji pośmiertnej [4, 9, 10, 38, 39, 82, 95, 101, 122]

W grupie zatruc śmiertelnych analizę stężeń karbamazepiny i jej metabolitów oraz identyfikację pozostałych metabolitów można było przeprowadzić w szerszej grupie materiałów biologicznych tj. krew sekcyjna, wątroba, nerka, mózg, mocz, żółć, płyn mózgowo-rdzeniowy. W orzecznictwie sądowo-lekarskim o przyczynie zgonu wnioskuje się w pierwszym rzędzie na podstawie oznaczonego stężenia badanego leku we krwi sekcyjnej. Pozostałe stężenia w innych tkankach mają jedynie charakter pomocniczy i są czynnikiem potwierdzającym zatrucie jako przyczynę zgonu. Niemniej analiza tych materiałów

biologicznych stanowi cenny materiał w ocenie przebiegu metabolizmu i oszacowaniu możliwości wystąpienia interakcji. Stąd w badanej grupie analitów obok karbamazepiny i głównych metabolitów starano się wykazać również obecność innych metabolitów, głównie N- i O-glukuronianów [62, 89].

Analizując dane pochodzące z przypadków śmiertelnych zatruc karbamazepiną (tabela 6) wysokie stężenia metabolitów w tkance wątrobowej oraz względnie niskie stężenia karbamazepiny mogą sugerować przebieg procesu metabolicznego. W kilku przypadkach nie można było obliczyć wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH, co wynikało z tego, iż brak było obecności formy diolowej w badanym materiale w danym przypadku, co sugeruje całkowitą blokadę tej przemiany (przypadek nr 8, 11 i 16).

Niskie wartości wskazują na intensywny metabolizm wątrobowy. Podobnie duża wartość współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH wskazuje na wolniejszą biotransformację badanego leku. W nerkach wartości te są zazwyczaj niższe niż w wątrobie, co może sugerować obecność szybszych przemian metabolicznych CBZ zachodzących również w tej tkance oraz jej udział w eliminacji badanego leku [4].

Podobnie prześledzono stężenia karbamazepiny i jej metabolitów w innych dostępnych tkankach, ze szczególnym uwzględnieniem tkanki mózgowej. Wynika to z faktu, iż tkanka mózgowa stanowi w pewnym sensie docelowy organ działania karbamazepiny. W badanej tkance stwierdzono, że w czterech przypadkach zatruc stężenie karbamazepiny w mózgu było wysokie i gdyby dotyczyło krwi byłoby uważane za toksyczne lub śmiertelne (przypadek nr 1, 4, 5, 7). W pozostałych zatruciach uzyskane stężenia mieszczą się w granicach przyjętych za terapeutyczne (również w odniesieniu do stężeń spotykanych we krwi) [10, 23, 32, 85, 116].

W celu prześledzenia dystrybucji badanego leku do tkanki mózgowej obliczono współczynnik mózg/krew. W dostępnej bazie literaturowej [Baselt i wsp.] podano wartości tego współczynnika mózg/osocze dla karbamazepiny wynoszące 1,1. W przypadkach zatruc śmiertelnych było niemożliwe uzyskanie osocza krwi, stąd obliczono wartości współczynnika mózg/krew. Wartości tego parametru zebrano w tabeli 9. Zaobserwowano, iż współczynnik ten obliczony dla przypadków zatruc samą karbamazepiną mieści się w zakresie wartości współczynnika krew/osocze tj. 0,54 – 0,76 (0,59 -parametr obliczony dla stężeń terapeutycznych we krwi). Wartości takie mogą sugerować utrudnienie dystrybucji karbamazepiny do tkanki mózgowej w badanych przypadkach zatruc śmiertelnych. W przypadkach zatruc mieszanych współczynnik ten przyjmuje wyższe wartości tj. 0,93 –

1,28, zbliżone do podanych w literaturze, co wskazuje na dystrybucję do tej tkanki, spotykana w prowadzonych badaniach [10, 87, 105, 106, 121].

Stężenia karbamazepiny i jej metabolitów obliczone dla wszystkich dostępnych tkanek i płynów pochodzących z zatruc śmiertelnych mogą sugerować, że lek ten ulega procesom redystrybucji w minimalnym zakresie (wysokie wartości stężeń we krwi sekcyjnej, wątrobie i nerkach a niskie w płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie z gałki oka oraz tkance mózgowej). Doświadczalne badanie procesu redystrybucji jest niezwykle trudne. Z braku danych odnośnie czasu zgonu oraz niemożności pobrania materiałów do badania z tych samych miejsc w określonych odstępach czasu nie można określić, czy zjawisko to miało miejsce w danym przypadku. Wskaźnik redystrybucji krew z serca/ krew z naczyń obwodowych jest niski i wynosi od 0,4-1,0 a objętość dystrybucji wynosi 0,8 – 2,0 L/kg, co przemawia także za tym faktem [10, 101]. W naszych badaniach redystrybucja karbamazepiny nie była przedmiotem badań. Na podstawie wyników oznaczeń niniejszej pracy jednakże można zauważyć, że zawartości badanego leku w narządach mięsistych były większe niż we krwi.

Dane uzyskane w wyniku powyższych badań mają charakter jedynie orientacyjny. Dane literaturowe zdają się potwierdzać fakt minimalnego procentu redystrybucji [10, 38, 82, 101].

W celach porównawczych przeprowadzono analizę stężeń karbamazepiny i jej głównych metabolitów w surowicy krwi, w grupie 8-miu pacjentów objętych leczeniem w Klinice Psychiatrii w Krakowie. W tabelach 7 i 8 zebrano wartości stężeń karbamazepiny i jej metabolitów oraz stosunków lek macierzysty/metabolit dla badanej grupy pacjentów. Mały rozrzut wartości CBZ/CBZ-E sugeruje podobny przebieg tego etapu biotransformacji karbamazepiny w tej grupie badanych. Porównując wartości uzyskane dla grupy pacjentów objętych leczeniem karbamazepiną i grup zatruc (śmiertelnych i bez skutku śmiertelnego) zaobserwowano znacząco szerszy zakres wartości współczynników CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH w przypadkach zatruc, w odniesieniu do terapii. Powyższy fakt pozwolił stwierdzić, iż biotransformacja karbamazepiny w zatruciach ma charakter bardziej chaotyczny i przypadkowy niż w terapii oraz podlega wielu czynnikom modyfikującym jej przebieg (interakcje z innymi ksenobiotykami).

Stosunek stężeń leku macierzystego do jego metabolitów jest tylko jednym z elementów określających kompleksowy charakter przebiegu zatrucia ostrego [4, 84, 95, 124, 132]. Każde zatrucie objawia się poważnymi skutkami zarówno w fazie toksykokinetycznej jak i toksykodynamicznej [2, 23, 107, 124, 132]. Procesy metaboliczne w zatruciach lekami przebiegają inaczej niż w terapii. Przedawkowanie leku powodować może zmiany kinetyki

przemian, a w konsekwencji zmiany szybkości biotransformacji leku. Spowolnienie procesów detoksykacyjnych powodować może nagromadzenie się ksenobiotyku w tkankach i spotęgowanie jego działania toksycznego [124, 132]. Istotny wpływ na metabolizm leków ma obecność innych ksenobiotyków- zarówno alkoholu jak i innych leków, wpływających z reguły hamująco na przebieg procesów biotransformacji [9, 114, 124, 127, 132]. Na różnice w metabolizmie danego ksenobiotyku w zatruciach śmiertelnych wpływają przede wszystkim zażyta dawka, obecność innych leków i/lub alkoholu oraz długość okresu przeżycia [124, 132]. Obecność w ustroju innych ksenobiotyków może zmieniać szybkość procesów metabolicznych- spowalniać lub przyspieszać. W przypadku dużej ilości zażytego leku, może dojść do nagromadzenia się go w tkankach, i w konsekwencji zahamowania procesów detoksykacji. Dłuższy okres przeżycia natomiast może wpływać na wytworzenie większej liczby pochodnych danego ksenobiotyku [101, 124, 127, 132].

Jedną z ważniejszych interakcji spotykanych w praktyce medycyny klinicznej i sądowej jest zależność lek – etanol. Częstość stosowania etanolu wraz z lekami przepisanyymi przez lekarza wśród pacjentów odzwierciedla się znaczącymi interakcjami spotykanymi w praktyce klinicznej [31, 42, 81, 112, 114, 117].

Oceniając przypadki interakcji karbamazepina - etanol (tabela 5 – przypadki 20-29 i 33; tabela 6 – przypadki 8-12 i 16-19) można zaobserwować, że stężenia 10,11-epoksykarmazepiny są na stosunkowo niskich poziomach. Jest to widoczne również poprzez ocenę stosunków stężeń leku macierzystego do jego metabolitów (w tym przypadku CBZ/CBZ-E) zgodnie z regułą zaproponowaną przez Apple'a. Wartości te wskazują, że w przypadkach zatruc obserwuje się spowolnienie procesów biotransformacji leku. Dane literaturowe potwierdzają możliwość interakcji karbamazepiny z etanolem.

Druid i wsp. [38] podają w swojej pracy zestawienia stężeń karbamazepiny w zależności od rodzaju zatrucia. Z tych danych wynika, iż najszerszy zakres stężeń i zarazem najwyższe wartości uzyskali dla zatruc śmiertelnych samą karbamazepiną. W przypadkach zatruc mieszanych wartości mieszczą się w zakresach terapeutycznych. Podobne zależności uzyskano w naszych badaniach przypadków zatruc karbamazepiną bez skutku śmiertelnego. We wszystkich przypadkach, w których doszło do zatrucia mieszanego z etanolem bądź innym lekiem stężenia karbamazepiny i jej metabolitów mieściły się w zakresach spotykanych w terapii tym lekiem, pomimo to występowały objawy zatrucia. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić fakt występowania interakcji pomiędzy badanym lekiem a innymi związkami towarzyszącymi zatruciu (m.in. etanol). Autorzy prac dotyczących interakcji z etanolem twierdzą (sugerują), że inhibicja metabolizmu może mieć miejsce na

poziomie enzymów wątrobowych (indukcja enzymów) oraz poprzez wypieranie leków z wiązania z białkami surowicy krwi (głównie z frakcją albuminową) [42, 114].

Podobnie przedstawia się problem interakcji w przypadkach, w których zażyto mieszaninę leków. Efektem tego wpływu może być spowolnienie procesów metabolicznych i nasilenie związanych z tym efektów farmakologicznych. Grupa leków psychotropowych ze względu na podobną strukturę chemiczną związku jest metabolizowana poprzez te same układy enzymatyczne lub leki te mają wysokie powinowactwo do tych samych izoenzymów, stąd interakcje farmakokinetyczne zachodzą już na poziomie biotransformacji [12, 23, 30-32, 45, 114, 119, 124, 129, 130, 132, 141]. Karbamazepina i leki psychotropowe z grupy benzodiazepin, fenotiazyn i pochodne tioksantenu mają podobną trójcykliczną budowę chemiczną co może sugerować podobieństwa w wiązaniu z białkami. Interakcje pomiędzy karbamazepiną a innymi lekami o podobnej strukturze mogą mieć bardzo złożony charakter, co może z kolei odzwierciedlać się zmianami adaptacyjnymi w organizmie i działaniem tych leków [6, 12, 22, 30, 31, 46, 58, 84, 112, 115, 126, 131].

Wśród przypadków zatruc bez skutku śmiertelnego (tabela 5) były cztery przypadki zatrucia kompleksowego, w których lekami towarzyszącymi były fenotiazyny i w jednym przypadku benzodiazepiny. W tych przypadkach obserwowano stosunkowo niskie stężenia metabolitów, wskazujące na spowolnienie przemiany metabolicznej CBZ.

Analizując przypadki 11 – 20 z tabeli 6 można dojść do wniosku, że tego rodzaju interakcja miała miejsce. Lekami, które towarzyszyły zatruciu były: amitryptylina (przypadek nr 11), estazolam (przypadki nr 12, 13), fenobarbital (nr 14), diazepam (nr 15 i 20), morfina (nr 16), perazyna (nr 17), lorazepam (nr 19, 20), lewomepromazyna i luminal (nr 18) i okskarbamazepina (nr 21). Oceniając zgodnie z regułą Apple'a wartości CBZ/CBZ-E i CBZ/CBZ-OH można zaobserwować znaczące spowolnienie przemiany metabolicznej w okresie żąyciowym.

W oparciu o dane literaturowe oszacowanie terapeutycznych stężeń karbamazepiny może być trudne, zwłaszcza w przypadku gdy są stosowane inne leki przeciwpadaczkowe, ze względu na ich działanie indukcyjne na metabolizm wątrobowy. Z danych literaturowych wynika, iż niektóre z tych leków mogą przyspieszać przemiany metaboliczne karbamazepiny, inne z kolei blokować go. Procesy te zależą od grup enzymów wątrobowych zaangażowanych w cykl przemian biotransformacyjnych tych związków [13, 22, 30, 39, 84, 108, 126, 129, 131, 133].

Badania nad metabolizmem leków w zatruciach stanowią cenne źródło danych zarówno dla potrzeb lekarza toksykologa, ratującego życie osobom zatrutym, jak i dla toksykologa

sądowego, który na podstawie uzyskanego wyniku analizy chemiczno-toksykologicznej musi wydać orzeczenie, będące podstawą do wydania opinii o przyczynie zgonu. Zakresy stężeń spotykanych w zatruciach karbamazepiną bez skutku śmiertelnego i zatruciach śmiertelnych są zbliżone, co jednak może stanowić pewne wskazówki do interpretacji kolejnych wyników. Na przykładzie karbamazepiny można stwierdzić, że niejednokrotnie stężenie tego leku w zatruciu śmiertelnym wykazano na poziomie terapeutycznym. Wskutek możliwej interakcji z innymi lekami mogło dojść do skumulowanego działania toksycznego na ośrodkowy układ nerwowy, prawdopodobnie w fazie toksykodynamicznej i mogło to być przyczyną zgonu.

Nowe bazy danych uwzględniają problem interakcji przedstawiając zakresy stężeń dla różnego rodzaju zatruc [10, 38]. Dodatkowym czynnikiem, niezwykle przydatnym w pracy toksykologów, jest umieszczanie w bazach danych zakresów stężeń dla głównych metabolitów oraz przebieg biotransformacji ksenobiotyków, będących najczęstszymi przyczynami zatruc zarówno ostrych jak i śmiertelnych. Stąd konieczność wykonywania badań prowadzących do poznania przemian metabolicznych leków, a szczególnie cennym jest poznanie tych procesów w różnych grupach zatruc.

Karbamazepina jest lekiem, na którego temat istnieje wiele doniesień. Analiza zatruc śmiertelnych tym lekiem została przedstawiona jednakże w mniejszej liczbie publikacji.

Niezwykle cenna była możliwość analizy materiału pochodzącego z dwóch różnych grup zatruc oraz możliwość odniesienia uzyskanych wyników do grupy pacjentów poddanych terapii tym lekiem. Dotychczasowe badania metabolizmu karbamazepiny dotyczyły głównie zakresów terapeutycznych, brak danych odnośnie metabolizmu tego leku w zatruciach. W naszych badaniach podjęto próbę oceny przebiegu tych procesów w różnych rodzajach zatruc. Dodatkowym czynnikiem wzbogacającym prowadzone badania była możliwość wykazania i oceny obecności innych metabolitów karbamazepiny, w różnego rodzaju płynach ustrojowych i tkankach. Duże znaczenie miał fakt analizy stężeń drugiego metabolitu karbamazepiny tj. dihydroksydiolu. Metabolit ten nie wykazuje wprawdzie aktywności farmakologicznej w organizmie, tym niemniej może być parametrem określającym stopień zablokowania przemian biotransformacji na etapie epoksydu.

Stosunkowo duży materiał badawczy obejmujący ludzkie tkanki pochodzące z sekcji a nie zwierzęce pozwolił na analizowanie szlaków metabolicznych badanego leku w organizmie człowieka. Obok aspektu praktycznego, pozwalającego na utworzenie bazy danych odnośnie stężeń karbamazepiny i jej głównych metabolitów w tkankach innych niż krew, starano się rozwinąć również aspekt poznawczy. Istotnym elementem było wykazanie stosunkowo małej

ilości metabolitów w tkance mózgowej. Sugestie o gromadzeniu się wysokich stężeń karbamazepiny i jej metabolitów w tej tkance nie znalazły potwierdzenia, jednakże mała liczba przypadków, w których ta tkanka była dostępna może nie pozwala na postawienie ostatecznych wniosków.

Ważnym aspektem pracy była ocena przypadków zatruc, w których doszło do interakcji karbamazepiny z innymi ksenobiotykami lub z etanolem. Pozwoliło to na zaobserwowanie zmian w przebiegu metabolizmu badanego leku. Niewielka grupa jednakże przypadków takich zatruc może skłaniać do braku pewności co do poprawności wysnutych wniosków. Zjawisko interakcji między różnymi ksenobiotykami w organizmie człowieka jest przedmiotem zainteresowań, powyższe badania potwierdzają jedynie znaczenie konieczności prowadzenia tego rodzaju analiz.

Jednym z zadań postawionych na początku tych badań było wykazanie przydatności metody LC/MS do analizy próbek materiału biologicznego pochodzącego z różnych rodzajów zatruc. Przeprowadzony proces walidacji pozwolił na wiarygodne analizowanie dostępnych materiałów biologicznych. Szczególnie cenną opcją zastosowanej w badaniach metodyki była możliwość analizowania struktury związków w oparciu o ich widma masowe. Pozwoliło to na identyfikację metabolitów karbamazepiny przy braku ich wzorców. Opierając się na fragmentach uzyskanych z analizy widma masowego i danych literaturowych zidentyfikowano i wykazano w badanych tkankach obecność innych, o mniejszym znaczeniu dla procesu zatrucia, metabolitów karbamazepiny.

Konfrontując postawione na początku realizacji tematu zadanie otrzymano satysfakcjonujące wyniki. Pewien niedosyt wzbudza niemożność wykonywania analizy na większej liczbie przypadków. Brak wzorców niektórych związków lub trudności związane z ich pozyskaniem powodują konieczność opierania się na danych teoretycznych, bez możliwości potwierdzenia doświadczalnego. Może to stać się powodem błędnej interpretacji uzyskanych wyników, niemniej zastosowanie metody chromatografii cieczowej z detektorem masowym pozwala na eliminowanie takich problemów.

6. Wnioski

1. Metoda zastosowana do badań stężeń CBZ i jej metabolitów w materiale biologicznym jest metodą specyficzną i czułą. Wykorzystanie opcji tandemowej spektrometrii masowej (MS/MS) pozwoliło na wiarygodną identyfikację karbamazepiny i jej metabolitów w materiale biologicznym. Zastosowanie chromatografii ciekowej z detektorem masowym umożliwiło ilościowe oznaczenie zawartości badanych związków w próbkach na bardzo niskich poziomach stężeń oraz pozwoliło na określenie wpływu tła biologicznego na wynik.
2. Proces walidacji uzasadnia przydatność metody LC/MS do identyfikacji znanych i nieznanymi związków (leków i ich metabolitów, produktów degradacji czy związków endogennych itp.).
3. Na podstawie uzyskanych wyników stężeń CBZ i metabolitów stwierdzono różnice w przebiegu metabolizmu leku w zależności od rodzaju zatrucia oraz obecności innych związków (alkohol, inny lek).
4. Zbiór przypadków i zakresy stężeń stanowią bazę danych zarówno dla potrzeb terapii jak i orzecznictwa.
5. Analiza przebiegu metabolizmu poprzez obserwację zmian stężeń metabolitów może mieć znaczenie w określaniu stanu zdrowia pacjenta zatrutego oraz w rokowaniu, również może mieć znaczenie w procesie leczenia.

7. Piśmiennictwo:

1. Abdel-Hamid M.E.: „Comparative LC-MS and HPLC analyses of selected antiepileptics and beta-blocking drugs”; *Il Farmaco*, 2000, 55, 136-145
2. Adamska-Dyniewska H.: „Terapia monitorowana.”; Wyd. TTM, 1994, Łódź
3. Amore B.M., Kalthorn T.F., Skiles G.L., Hunter A.P., Bennet G.D., Finnell R.H., Nelson S.D. and Slattery J.T.: „Characterization of carbamazepine metabolism in a mouse model of carbamazepine teratogenicity” *Drug Metabolism and Disposition*; 1997, Vol.25, No.8, 953-961
4. Apple F.S.: „Postmortem tricyclic concentrations: Assessing cause of death using parent drug to metabolite ratio”; *J. Anal. Toxicol.*; 1989, 13, 197-198
5. Arpino P.J.: „Mass spectrometry combined with other methods”; *Advances in Mass Spectrometry*, vol. 13, 1994, (text of the plenary talk presented at the 13th International Mass Spectrometry Conference, 29 Aug.-2.Sep., 1994, Budapest, Hungary)
6. Baker G.B., Fang J., Sinha S., Coutts R.T.: „Metabolic drug interactions with selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressants”; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1998, vol.22, no.2, 325-333
7. Baker L.A.: „Applied clinical pharmacokinetics”; McGraw-Hill; Medical Publishing Division; 2001
8. Bakhtiar R. and Nelson R.W.: „Electrospray ionisation and matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry. Emerging technologies in biomedical sciences”; *Biochemical Pharmacology*, 2000, vol.59, 891-905
9. Ballantyne B., Marrs T., Syversen T. (editors): *General and applied toxicology*. 2nd Edition, Macmillan Reference Ltd., 1999, London, 97-125
10. Basselt R.C.: *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. 5th edition. Chemical Toxicology Institute, California, 2000
11. Bernus I., Dickinson R.G., Hooper W.D., Eadie M.J.: „Dose-dependent metabolism of carbamazepine in humans”; *Epilepsy Research* 1996, 24, 163-172
12. Bernus I., Dickinson R.G., Hooper W.D., Eadie M.J.: „The mechanism of the carbamazepine-valproate interaction in humans”; *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1997, Vol. 44, No. 1, 21-27
13. Bernus I., Hooper W.D., Dickinson R.G., Eadie M.J.: „Metabolism of carbamazepine and co-administered anticonvulsants during pregnancy”; *Epilepsy Research* 1995, 21, 65-75

14. Bogusz M.J.: „Summa technologiae toxicologiae forensis”; *Problems of Forensic Science*, 2000, vol. XLII, 9-23
15. Bressolle F., Bromet-Petit M., Audran M.: „Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics”, *Journal of Chromatography B*; 1996, 686, 3-10
16. Brodie M.J.: „Monotherapy trials: prerequisite data”; *Epilepsy Research* 2001, 45, 61-64
17. Bruins A.P.: “Atmospheric- pressure- ionisation mass spectrometry. I. Instrumentation and ionisation techniques. Trends in analytical chemistry”; vol. 13, no.1, 1994, 37-43
18. Bruins A.P.: “Atmospheric- pressure- ionisation mass spectrometry. II. Applications in pharmacy, biochemistry and general chemistry”; vol. 13, no.2, 1994, 81-90
19. Burlingame A.L., Baillie T.A., Russell D.H.: „Mass spectrometry”; *Analytical Chemistry*, 1992, vol. 64, no. 12, 467R-502R
20. Cairus T. and Siegmund E.G.: „Review of the development of liquid chromatography/mass spectrometry”; Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Mass Spectrometry Service Center, Los Angeles District Laboratory, 1521; 1990
21. Causon Roger: „Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion”, *Journal of Chromatography B*; 1997, 689, 175-180
22. Cepelak I., Grubisic T.Z., Mandusic A., Rekić B., Lenicek J.: „Valproate carbamazepine comedication changes hepatic enzyme activities in sera of epileptic children”; *Clinica Chimica Acta*, 1998, 276, 121-127
23. Chodera A., Herman Z.: „Farmakologia kliniczna”; Wyd. Lek. PZWL, Warszawa, 1997
24. Chollet D.F.: „Determination of antiepileptic drugs in biological material”; *Journal of Chromatography B*, 2002, 767, 191-233
25. Christophersen A.S., Morland J.: „Drug analysis for control purposes in forensic toxicology. Workplace testing, sports, medicine and related areas.”; *Pharmacology and Toxicology*, 1994, 74, 202-210
26. Clarot I., Dreyfuss M. F., Domelier R., Battu S., Cardot P.J.P.: „Deferred standards, an on-line qualification, validation and system stability probe for chromatographic assay”; *Journal of Chromatography A*; 2002, 958, 79-88
27. Clench M.R.: „A comparison of thermospray, plasmaspay, electrospray and dynamic FAB”; *VG monographs in mass spectrometry*, 1992, no. 3

28. Contin M., Riva R., Albani F., Baruzzi A.: „Simple and rapid liquid chromatographic-turbo ion spray mass spectrometric determination of topiramate in human plasma”; *Journal of Chromatography B*, 2001, 761, 133-137
29. Dadgar D., Burnett P.E., Choc M.G., Gallicano K., Hooper J.W.: „Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting.”; *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 1996, 686, 3-10
30. Daniel W., Janczar L., Danek L., Legrum W., Netter K. J.: „Pharmacokinetic interaction between carbamazepine and neuroleptics after combined prolonged treatment in rats”, *Naunym-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol*; 1992, 345:598-605
31. Daniel W.: „Metabolism of psychotropic drugs: pharmacological and clinical relevance”; *Pol. J. Pharmacol.* 1995, 47, 367-379
32. Danysz A., Kleinrok Z.: „Podstawy farmakologii.”; Wyd. Volumed, Wrocław 1996
33. Davis C.D., Pirmohamed M., Kitteringham N.R., Allott R.L., Smith D. and Park B.K.: „Kinetic parameters of lymphocyte microsomal epoxide hydrolase in carbamazepine hypersensitive patients”; *Biochemical Pharmacology*, 1995, Vol. 50, No. 9, 1361-1366
34. de Hoffman E., Charette J., Stroobant V.: „Spektrometria mas”; *Wydawnictwa Naukowo-Techniczne*, 1998, Warszawa
35. de Zeeuw R.A., Schepers P., Greving J.E., Franke J.P.: „A new approach to the optimization of chromatographic systems and the use of a generally accessible data bank in systematic toxicological analysis.”; *Proceedings of the International Symposium Instrumental Applications in Forensic Drug Chemistry*, May 29-30, 1978, Washington D.C.
36. De Zeeuw R.A., Westenberg : „An unusual case of carbamazepine poisoning with a near-fatal relapse after two days”; *Clin Toxicology*, 1979, 14,263-269
37. de Zeeuw R.A.: „Modern chromatographic procedures in systematic toxicological analysis.”; *J. Chromatogr.*, 1998, 488, 199
38. Druid H., and Holmgren P.: „A Compilation of Fatal and Control Concentrations of Drugs in Postmortem Femoral Blood”, *Journal of Forensic Sci*; 1997, Vol.42, No.1, 79-87.
39. Druid H., Holmgren P., Carlsson B., Ahlner J.: „Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotyping on postmortem blood as a supplementary tool for interpretation of forensic toxicological results”; *Forensic Science International*, 1999, 99, 25-34
40. Drummer O.H.: „Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis”; *Journal of Chromatography B*, 1999, 733, 27-45

41. Eto S., Tanaka N., Noda H., Noda A.: „Chiral separation of 10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxycarbamazepine, a metabolite of carbamazepine with two asymmetric carbons, in human serum”; *Journal of Chromatography B*, 1996, 677, 325-330
42. Fraser A.G.: „Pharmacokinetic interactions between alcohol and other drugs”; *Clinical Pharmacokinetic*, 1997, 33 (2), 79-90
43. Garcia D.M., Huang S.K. and Stanbury W.F.: „Optimization of the atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography mass spectrometry interface”; *American Society for Mass Spectrometry*, 1996, 7, 59-65
44. Garcia J.F., Barcelo D.: „An overview of LC-MS interfacing systems with selected application.”; *Journal of High Resolution Chromatography*, 1993, 16, 633-641
45. Gawrońska-Szkwarz B.: „Klasyfikacja enzymów mikrosomalnych cytochromu P450”; *Problemy Terapii Monitorowanej* 1995, Vol. 6, No. 4, 159
46. Gidal B.E., Rutecki P., Shaw R., Maly M.M., Collins D.M., Pitterle M.E.: „Effect of lamotrigine on carbamazepine epoxide/carbamazepine serum concentration ratios in adult patients with epilepsy”; *Epilepsy Research* 1997, 28, 207-211
47. Glennon B.: „Control system validation in multipurpose biopharmaceutical facilities”; *Journal of Biotechnology*, 1997, 59, 53-61
48. Green V.J., Pirmohamed M., Kitteringham N.R., Gaedigk A., Grant D.M., Boxer M., Burchell B. and Park B.K.: „Genetic analysis of microsomal epoxide hydrolase in patients with carbamazepine hypersensitivity”; *Biochemical Pharmacology*, 1995, vol. 50, No. 9, 1353-1359
49. Gregg C.R.: „Drug interactions and anti-infective therapies”; *The American Journal of Medicine*, 1999, Vol. 106, 227-237
50. Hainzl D., Parada A., Soares-da-Silva P.: „Metabolism of two new antiepileptic drugs and their principal metabolites S(+)- and R(-)-10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine”; *Epilepsy Research* 2001, 44, 197-206
51. Hancock J.R., D’Agostino P.A.: „Mass spectrometric identification of toxins of biological origin”; *Analytica Chimica Acta*, 2002, 457, 71-82
52. Heinig K., Bucheli F.: „Application of column-switching liquid chromatography- tandem mass spectrometry for the determination of pharmaceutical compounds in tissue samples”; *Journal of Chromatography B*, 2002, 769, 9-26
53. Heinig K., Henion J.: „Fast liquid chromatographic-mass spectrometric determination of pharmaceutical compounds”; *Journal of Chromatography B*, 1999, 732, 445-458

54. Hoja H., Marquet P., Vemeuil B., Lofti H., Peicaud B., Lachatre G.: „Application of liquid chromatography – mass spectrometry in analytical toxicology: a review.”; *Journal of Analytical Toxicology*, 1997, 21, 116-126
55. Hubert Ph., Chiap P., Crommen J., Boulanger B., Chapuzet E., Mercier N., Bervoas-Martin S., Chevalier P., Grandjean D., Largoce P., Lallier M., Laparra M.C., Laurentie M., Nivet J.C.: „The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory”; *Analytica Chimica Acta*; 1999, 391, 135-148
56. Izzo G., Raggi M.A., Maichel B., Kenndler E.: „Separation of olanzapine, carbamazepine and their main metabolites by capillary electrophoresis with pseudo-stationary phases”; *Journal of Chromatography B*, 2001, 752, 47-53
57. Jaegermann K.: „Opiniowanie sądowo – lekarskie. Eseje o teorii.”; Wyd. Prawnicze, Warszawa, 1991
58. Jakobsen S.N., Wiborg O.: „Selective effects of long-term lithium and carbamazepine administration on G-protein subunit expression in rat brain”; *Brain Research* 1998, 780, 46-55
59. Jimenez C., Ventura R., Segura J.: „Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories”; *Journal of Chromatography B*, 2002, 767, 341-351
60. Joca S.R.L., Skalisz L.L., Beijamini V., Aparecida M., Vital B. F., Andreatini R.: „The antidepressive-like effect of oxcarbamazepine: possible role of dopaminergic neurotransmission”; *European Neuropsychopharmacology* 2000, 10, 223-228
61. Johnstone R.A.W., Rose M.E.: „Spektrometria mas”; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001, Warszawa
62. Ju C. and Uetrecht J.P.: „Detection of 2-hydroxyiminostilbene in the urine of patients taking carbamazepine and its oxidation to a reactive iminoquinone intermediate”; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999, 288, 51-56
63. Kawata Yuko, Okada Motohiro, Murakami Takuya, Kamata Akihisa, Zhu Gang and Kaneko Sunao: „Pharmacological discrimination between effects of carbamazepine on hippocampal basal, Ca²⁺- and K⁺-evoked serotonin release”; *British Journal of Pharmacology*, 2001, 133, 557-567
64. Kienhuis P.G.M., Geerdink R.B.: „Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of surface and waste water with atmospheric pressure chemical ionisation. II. Applications.”; *Trends in Analytical Chemistry*, 2000, vol.19, no.7, 460-474

65. Kłys M., Baran E.: „Zatrucia śmiertelne w materiale Zakładu Medycyny Sądowej w Krakowie w latach 1946-1995.”; Arch. Med. Sąd. Krym., 1996, 46, 277-287
66. Kłys M., Bujak-Giżycka B.: „Zastosowanie chromatografii cieczowej z detekcją masową w ekspertyzie toksykologicznej”; Arch. Med. Sąd. Krym., 2000, 50, 115-125.
67. Kłys M., Bystrowska B., Bujak-Giżycka B., Nowak G.: „Significance of toxic interactions in medicolegal evidence. Complex fatal poisoning with drugs of abuse in the material of the Chair of Forensic medicine, Collegium Medicum, Jagiellonian University in Kraków.”; Pol. J. Pharmacol., 2001, 53, 653-658
68. Kłys M., Jankowski Z., Bystrowska B., Bujak-Giżycka B., Nowak G.: „Znaczenie interakcji toksycznej w orzecznictwie sądowo-lekarskim. Złożone zatrucie śmiertelne pochodnymi amfetaminy i kokainą („UFO”?).”; Arch. Med. Sąd. Krym., 2001, 51, 133-143
69. Kłys M., Klementowicz W., Bujak-Giżycka B., Kołodziej J., Trela F.: „Opiniowanie sądowo – lekarskie w świetle nowoczesnej analityki toksykologicznej.”; Przegląd Lekarski, 2000, 57, 572-576
70. Kłys M., Rutkiewicz A., Szkolnicka B., Bujak-Giżycka B.: „Fatal and non-fatal poisonings with drug in a medicolegal aspect in the material of the Institute of Forensic Medicine and Toxicological Clinic Collegium Medicum Jagiellonian University in the years 1987-1998”; Acta Poloniae Toxicologica, 2000, Vol. 8, No.1, 101-111
71. Kłys M.: „Z badań nad tłem biologicznym w aspekcie analizy toksykologicznej” Arch. Med. Sąd. I Krym. 1996, XLVI, 21-26
72. Kłys M.: „Rola analizy toksykologicznej w orzecznictwie medyczno-prawnym”; Arch. Med. Sąd. I Krym. 1993, XLIII, 4
73. Kłys M.: „Rola metodyki laboratoryjnej w toksykologii klinicznej i sądowej”; Przegląd lekarski 1999, 56/6
74. Kringle R.O.: „An assessment of the 4-6-20 Rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetics studies” ; Pharm. Res. 1994, Vol.11, No.4, 556-560
75. Krull I.S., Swartz M.: „Analytical method development and validation for the academic researcher.”; Analytical Letters, 1999, 32(6), 1067-1080
76. Kumlien E., Sherif F., Ge L., Orelund L.: „Platelet and brain GABA-transaminase and monoamine oxidase activities in patients with complex partial seizures”; Epilepsy Research 1995, 20, 161-170

77. Kunicki P.K., Sitkiewicz D.: „Wymagania stawiane metodom analitycznym stosowanym w terapii monitorowanej stężeniem leku”; *Problemy Terapii Monitorowanej* 2000, 11, nr 1, 80-87
78. Kuo Chung-Chin, Chen Ren-Shiang, Lu Lu, and Chen Rong-Chi: „Carbamazepine inhibition of neuronal Na⁺ currents: quantitative distinction from phenytoin and possible therapeutic implications”; *Molecular Pharmacology*, 1997, 51, 1077-1083
79. Kuo Chung-Chin: „A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na⁺ channels”; *Molecular Pharmacology*, 1998, 54, 712-721
80. Kupcewicz B.: „Wybór i ocena (walidacja) metody analitycznej. Materiały szkoleniowe „Zasady prawidłowego prowadzenia badań dostępności biologicznej”; Ośrodek informacji naukowej POLFA sp. z o.o., Warszawa, 27-29 września 2000.
81. Lahti R.A., Vuori E.: „Fatal alcohol poisoning: medico-legal practices and mortality statistics”; *Forensic Science International*, 2002, 126, 203-209
82. Langford A.M. and Pounder D.J.: „Possible Markers for Postmortem Drug Redistribution”, *Journal of Forensic Sci*; 1997, Vol.42, No.1, 88-92
83. Lertratanangkoon K. and Horning MG.: „Metabolism of carbamazepine”; *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol.10, Issue 1, 1982, 1-10
84. Levy R.H., Lane E.A., Guyot M., Brachet-Liermain A., Cenraud B. and Loiseau P.: „Analysis of parent drug-metabolite relationship in the presence of an inducer. Application to the carbamazepine-clobazam interaction in normal man”; *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1983, vol.11, Issue 4, 286-292
85. Levy R.H., Wilensky A.J. and Anderson G.D.: „Carbamazepine, Valproic Acid, Phenobarbital and Ethosuximide”; *Applied Pharmacokinetics Principles of Therapeutic Drug Monitoring*, Ed. By W. E. Evans, J. J. Schentag, W. J. Jusko. Inc. Vancouver WA 1992, pp 26-41
86. Linscheid M.: „LC-MS for toxicological and environmental analysis: recent developments.”; *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, vol.49, 1992, 1-4
87. Liu H., Delgado M.R.: „The influence of polytherapy on the relationships between serum carbamazepine and its metabolites in epileptic children”; *Epilepsy Research*, 1994; 17 (3), 257-269
88. Löscher W., Fiedler M.: „The role of technical, biological, and pharmacological factors in the laboratory evaluation on anticonvulsant drugs. VII. Seasonal influences on anticonvulsant drug action in mouse models of generalized seizures”; *Epilepsy Research* 2000, 38, 231-248

89. Maggs J. L., Pirmohamed M., Kitteringham N. R. and Park B. K.: „Characterization of the metabolites of Carbamazepine in patient urine by liquid chromatography/Mass Spectrometry” *Drug Metabolism and Disposition*; 1997, Vol.25, No.3, 275-279
90. Mandrioli R., Albani F., Casamenti G., Sabbioni C., Raggi M.A.: „Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine five of its metabolites in plasma of epileptic patients”; *Journal of Chromatography B*, 2001, 762, 109-116
91. Marek Z., Kłys M.: „Opiniowanie sądowo – lekarskie i toksykologiczne.”; Kraków, Zakamycze, 2001
92. Marquet P., Lachatre G.: „Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology”; *Journal of Chromatography B*, 1999, 733, 93-118
93. Marsh L., Rao V.: „Psychiatric complications in patients with epilepsy: a review”; *Epilepsy Research*, 2002, 49, 11-33
94. Maurer H.H.: „Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology”; *Journal of Chromatography B*, 1998, 713, 3-25
95. May T., Jurgens U., Rambeck B., Schnabel R.: „Comparison between premortem and postmortem serum concentrations of Phenobarbital, phenytoin, carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite in institutionalised patients with epilepsy”; *Epilepsy Research*, 1999, 33, 57-65
96. McDowall R.D.: „The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation”; *Analytica Chimica Acta*; 1999, 391, 149-158
97. Mesdjian E., Seree E., Charvet B., Mirrione A., Bourgarel-Rey V., Desobry A. and Barra Y.: „Metabolism of carbamazepine by CYP3A6: a model for in vitro drug interactions studies”; *Life Science*, 1999, Vol. 64, No. 10, 827-835
98. Meyer U.: „Pharmacogenetics and adverse drug reactions”; *The Lancet*, 2000, vol. 356, 1667-1671
99. Minkova G., Getova D.: „Determination of carbamazepine and its metabolite carbamazepine-10,11-epoxide in serum with gas-chromatography mass spectrometry”; *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2001, 23 (9), 481-485
100. Mizuno K., Okada M., Murakami T., Kamata A., Zhu G., Kawata Y., Wada K., Kaneko S.: „Effects of carbamazepine on acetylcholine release and metabolism”; *Epilepsy Research* 2000, 40, 187-195

101. Moffat A.C., Jackson J.V., Moss M.S., Widdop B., Grinfield E.S.: „Clark's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material”; London, The Pharmaceutical Press, 1986
102. Mutlib A.E., Klein J.T.: „Application of liquid chromatography/mass spectrometry in accelerating the identification of human liver cytochrome P450 isoforms involved in the metabolism of iloperidone”; *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 1998, 286, 1285-1293
103. Niessen W.M.A. and Tjaden U.R. and Van der Greef J.: „Strategies in developing interfaces for coupling liquid chromatography and mass spectrometry”; *Journal of Chromatography*, 1991, 554, 3-26
104. Ohmori S., Nakasa H., Asanome K., Kurose Y., Ishii I., Hosokawa M., Kitada M.: „Differential catalytic properties in metabolism of endogenous and exogenous substrates among CYP3A enzymes expressed in COS-7 cells”; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1380, 297-304
105. Okada M., Hirano T., Mizuno K., Chiba T., Kawata Y., Kiryu K., Wada K., Tasaki H., Kaneko S.: „Biphasic effects of carbamazepine on the dopaminergic system in rat striatum and hippocampus”; *Epilepsy Research* 1997, 28, 143-153
106. Okada M., Hirano T., Mizuno K., Kawata Y., Wada K., Murakami T., Tasaki H., Kaneko S.: „Effects of carbamazepine on hippocampal serotonergic system”; *Epilepsy Research* 1998, 31, 187-198
107. Pach J., Wiernikowski A.: „Klinika ostrych zatruc”; Kraków, 1989
108. Panesar S.K., Bandiera S.M. and Abbott F.S.: „Comparative effects of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide on hepatic cytochromes P450 in the rat”; *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, vol.24, Issue 6, 619-627
109. Pawelczyk E.: „Chemia leków”. PZWL, Warszawa, 1986
110. Pawlaczyk J.: „Walidacja metod analizy chemicznej”; materiały konferencji „Walidacja metod wyników analizy chemicznej”, Poznań, 19 września 1997
111. Pienimäki P., Fuchs S., Isojärvi J., Vähäkangas K.: „Improved detection and determination of carbamazepine and oxcarbamazepine and their metabolites by high-performance liquid chromatography”; *Journal of Chromatography B*, 1995, 673, 97-105
112. Pippenger C.E.: „Clinically significant carbamazepine drug interactions: an overview”; *Epilepsia*, 1987, 28 Suppl 3, 71-76
113. Pirmohamed M., Park B.K.: „Genetic susceptibility to adverse drug reactions”; *Trends in Pharmacological Sciences*, 2001, vol. 22, no.6, 298-305

114. Pirola R.C.: „Drug metabolism and alcohol”; ADIS Press, 1977, Sydney, Australia
115. Pisani F., Caputo M., Fazio A., Oteri G., Russo M., Spina E., Perucca E., Bertilsson L.: „Interaction of carbamazepine-10,11-epoxide, an active metabolite of carbamazepine, with valproate: a pharmacokinetic study”; *Epilepsia* 1990; 31(3):339-342
116. Podlewski J.K., Chwalibogowska- Podlewska A.: „Leki współczesnej terapii”; Wydawnictwa Fundacji Büchnera, 1999
117. Poon G.K.: „Drug metabolism and pharmacokinetics. . Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation, and applications”; Edited Richard B. Cole., 1997, John Wiley & Sons, Inc., NY
118. Potter J.M., Donnelly A.: „Carbamazepine-10,11-epoxide in therapeutic drug monitoring”; *Ther Drug Monit*; 1998; 20 (6), 652-657
119. Prior T.I., Chue P.S., Tibbo P., Baker G.B.: „Drug metabolism and atypical antipsychotics”; *European Neuropsychopharmacology*, 1999, 9, 301-309
120. Raggi M.A., Pucci V., Maurizio A., Muzikar J., Kenndler E.: „Separation of carbamazepine and five metabolites, and analysis in human plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography”; *Journal of Chromatography B*, 2002, 770, 217-225
121. Rivey M. P., Allington D. R., Stone J. D. and Serfoss M. L.: „Alteration of carbamazepine pharmacokinetics in patients with traumatic brain injury”, *Brain Injury*, 1995, Vol. 9, No.1, 41-47
122. Robertson M.D. and Drummer O.H.: „Postmortem Drug Metabolism by Bacteria” *Journal of Forensic Sciences*, 1995,40, 282-286
123. Robertson W.C.: „Carbamazepine toxicity after influenza vaccination”; *Pediatric Neurology*, 2002, 26, 61-63
124. Rosenberg J., Benowitz N.I L. and Pond S.: „Pharmacokinetics of Drug Overdose” *Clin. Pharmacokinetics*; 1981, 6, 161-192,
125. Saris L.A., Brekelmans G.J.F., van der Linden G.J., Rademaker R.V., Edelbroek P.M.: „High performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and metabolites in human hair”; *Journal of Chromatography B*, 1997, 691, 409-415
126. Schlienger R., Kurmann M., Drewe J., Müller-Sphan F., Seifritz E.: „Inhibition of phenprocoumon anticoagulation by carbamazepine”; *European Neuropsychopharmacology*, 2000, 10, 219-221
127. Seńczuk W.: „Toksykologia”; Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wyd. III, 1999, Warszawa

128. Serra M., Littera M., Pisu M.G., Muggironi M., Purdy R.H., Biggio G.: „Steroidogenesis in rat brain induced by short- and long-term administration of carbamazepine”; *Neuropharmacology* 2000, 39, 2448-2456
129. Shen W.W.: „Cytochrome P450 Monooxygenases and Interactions of Psychotropic Drugs: A Five-year Update”; *International Journal of Psychiatry in Medicine*; 1995, Vol. 25, No.3, 277-290,
130. Shen Winston W., Lin Keh-Ming: „Cytochrome P450 Monooxygenases and Interactions of Psychotropic Drugs”; *International Journal of Psychiatry in Medicine*; 1991, Vol. 21, No.1, 47-56,
131. Spina E., Martines C., Fazio A., Trio R., Pisani F., Tomson T.: „Effect of phenobarbital on the pharmacokinetics of carbamazepine-10,11-epoxide, an active metabolite of carbamazepine”; *Ther Drug Monit* 1991, 13 (2), 109-112
132. Sue Young-Jin and Shanon M.: „Pharmacokinetics of Drugs in Overdose”; *Clin. Pharmacokinetics*; 1992, Vol. 23, No.2, 93-105,
133. Tateishi T., Asoh M., Nakura H., Watanabe M., Tanaka M., Kumai T., Kobayashi S.: „Carbamazepine induces multiple cytochrome P450 subfamilies in rats” *Chemico-biological Interactions*, 117(1999) 257-268
134. Tiller P.R., Cunniff J., Land A.P., Schwartz J., Jardine I., Wakefield M., Lopez L., Newton J.F., Burton R.D., Folk B.M., Buhrman D.L., Price P., Wu D.: „Drug quantitation on a benchtop liquid chromatography-tandem mass spectrometry system”; *Journal of Chromatography A*, 1997, 771, 119-125
135. Van Belle K., Sarre S., Ebinger G., Michotte Y.: „Quantitative microdialysis for the in vivo measurement of carbamazepine, oxcarbamazepine and their major metabolites in rat brain and liver tissue and in blood using the internal standard technique”; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1995, 3, 273-280
136. van Breemen R.B., Nikolic D. and Bolton J.L.: „Metabolic screening using on-line ultrafiltration mass spectrometry”; *Drug Metabolism and Disposition*, 1998, vol. 26, No. 2, 85-90
137. van der Voet H., van Rhijn J.A., van de Wiel H.J.: „Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation”; *Analytica Chimica Acta*, 1999, 391, 159-171
138. van Rooyen G.F., Badenhorst D., Swart K.J., Hundt H.K.L., Scanes T., Hundt A.F.: „Determination of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation”; *Journal of Chromatography B*, 2002, 769, 1-7

139. van Zoonen P., Hoogerbrugge R., Gort S.M., van de Weil H.J., van't Klooster H.A.: „Some practical examples of method validation in the analytical laboratory”; *Trends in analytical Chemistry*, 1999, vol. 18, nos.9+10
140. Vekey K.: „Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography”; *Journal of Chromatography A* 2001, 921, 227-236
141. Virani A., Mailis A., Shapiro L.E., Shear N.H.: „Drug interactions in human neuropathic pain pharmacotherapy”; *Pain*, 1997, 73, 3-13
142. von Moltke L.L., Greenblatt D.J., Schmider J., Wright C.E., Harmatz J.S., Shader R.I.: „In vitro approaches to predicting drug interactions in vivo”; *Biochemical Pharmacology*, 1998, vol. 55, 113-122
143. Voyskner R.D.: „Combining liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. Electrospray ionisation mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation, and applications”; Edited Richard B. Cole, 1997, John Wiley & Sons, Inc., NY
144. Winkler S.R., Luer M.S.: „Antiepileptic drug review: Part I”; *Surg. Neurol* 1998, 49, 449-452
145. Wood R.: „How to validate analytical methods”; *Trends in analytical Chemistry*, 1999, vol. 18, nos.9+10
146. Zhong D., Chen X., Gu J., Li X., Guo J.: „Applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in drug and biomedical analyses”; *Clinica Chimica Acta* 2001, 313, 147-150
147. Zhu G., Okada M., Murakami T., Kawata Y., Kamata A., Kaneko S.: „Interaction between carbamazepine, zonisamide and voltage-sensitive Ca^{2+} channel on acetylcholine release in rat frontal cortex”; *Epilepsy Research* 2002, 49, 49-60

8. Streszczenie:

Celem pracy była ocena zawartości karbamazepiny i jej metabolitów w materiale biologicznym, uzyskanym z przypadków zatruc bez skutku śmiertelnego i śmiertelnych oraz prześledzenie zmian w przebiegu metabolizmu tego leku w zatruciach na podstawie wyników uzyskanych metodą chromatografii cieczowej z detektorem masowym (LCMS). Jednym z aspektów pracy było zaprezentowanie możliwości nowoczesnej metodyki analitycznej do identyfikacji związków w materiale biologicznym (opcja tandemowej spektrometrii masowej w połączeniu z chromatografią cieczową).

W części teoretycznej przedstawiono dane statystyczne odnośnie częstości występowania zatruc w Polsce wg danych z Kliniki Toksykologii szpitala im. Rydygiera w Krakowie oraz z danych z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej CMUJ w Krakowie. Dane te dotyczą zatruc zarówno śmiertelnych, jak i bez skutku śmiertelnego mających miejsce w latach od 1998-2001 roku.

Przedstawiono podstawy metodyki analitycznej odnośnie zastosowanej metody. Opisano schematycznie połączenie dwóch technik tj. chromatografii cieczowej z detektorem masowym, ich możliwości i zasadę działania. W opisie uwzględniono dwa rodzaje jonizacji, wykorzystane w analizie materiału biologicznego pochodzącego z zatruc. Poszukując optymalnej metody zaprezentowano metodę elektrospreju (ESI) oraz jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI), i opisano różnice metodyczne oraz wynikające z zastosowania każdej opcji.

W następnej części zebrano i podano informacje dotyczące badanego leku tj. karbamazepiny, jej zastosowanie i dane farmakokinetyczne oraz toksykologię tego leku. Szerokie zastosowanie karbamazepiny jest jedną z przyczyn, dla których zostały podjęte badania nad zatruciami tym lekiem. Metabolizm karbamazepiny został dość dobrze opisany. Główny metabolit w szlaku przemian tj. epoksyd karbamazepiny wykazuje aktywność farmakologiczną zbliżoną do leku macierzystego, co ma duży wpływ na przebieg samego zatrucia i ewentualne skutki. Schematycznie przedstawiono procesy metabolizmu karbamazepiny z wyszczególnieniem głównego szlaku metabolicznego. W opisie procesów metabolicznych zaprezentowano również metabolity tworzone w mniej znaczących dla przebiegu zatrucia bocznych szlakach biotransformacji tego leku. W przypadkach zatruc śmiertelnych może to mieć znaczenie w interpretacji długości przeżycia denata (sytuacja, w której nieznany jest czas zgonu).

W części doświadczalnej przedstawiono opis procedur zastosowanych w analizie materiałów pochodzących z wcześniej opisanych przypadków zatruc. Opisano materiały biologiczne użyte do analizy oraz wzorce związków badanych. Przedstawiono sposób ekstrakcji, metodykę analityczną tj. warunki zastosowane w chromatografii cieczowej do rozdziału badanych związków, jak również warunki pracy chromatografu i detektora masowego. Opisano również sposób zbierania danych analitycznych i ich opracowywanie.

W celu przedstawienia możliwości analitycznych metody LCMS pokazano sposób identyfikacji nieznanymi związków, w tym przypadku metabolitów karbamazepiny. Identyfikację nieznanymi związków oparto na analizie ich widm masowych, i jeśli było to możliwe porównano tak uzyskane dane z informacjami zgromadzonymi w postaci biblioteki widm. Niestety, w przypadku chromatografii cieczowej stosowanej w połączeniu z spektrometrią masową tego rodzaju bazy danych nie są dostępne, są one najczęściej tworzone na podstawie doświadczeń analityka prowadzącego analizy, w oparciu o roztwory wzorcowe związków i dla konkretnego aparatu. Innym sposobem identyfikacji nieznanymi substancji jest analiza krok po kroku widm masowych pochodzących z opcji tandemowej spektrometrii masowej.

Zgodnie z wymogami badań przeprowadzono proces walidacji metody. Wśród ocenianych parametrów walidacyjnych zbadano liniowość w zamierzonym zakresie stężeń, odzysk, dokładność i precyzję oraz powtarzalność. Oszacowano również wpływ obecności tła biologicznego na uzyskany wynik. Stwierdzono, iż w przypadku analizy materiału biologicznego pochodzącego z sekcji tła biologiczne ma wpływ na wynik, jednakże zastosowana metoda pozwala na wiarygodny wynik. Wykazano, że metoda spełnia kryteria walidacji wyznaczone dla metod chromatograficznych.

W dalszym etapie pracy poddano analizie materiały biologiczne tj. materiały sekcyjne - krew sekcyjną, tkankę wątrobową, nerkową, mózgową, mocz, żółć, płyn mózgowo-rdzeniowy (tkanki dostępne tylko w niektórych przypadkach) oraz materiał kliniczny - surowicę krwi pochodzące od osób zatrutych, u których stwierdzono obecność karbamazepiny i w celach porównawczych surowicę pacjentów z Kliniki Psychiatrii poddanych terapii karbamazepiną. Badania przeprowadzono w trzech grupach zatruc tj. zatrucia bez skutku śmiertelnego, zatrucia śmiertelne, oraz, dla celów porównawczych, w grupie pacjentów poddanych terapii tym lekiem. W sumie przeanalizowano 33 przypadki zatruc bez skutku śmiertelnego, 21 przypadków zatruc śmiertelnych oraz 8 przypadków pacjentów poddanych leczeniu karbamazepiną.

W analizie materiałów biologicznych uwzględniono informacje, czy były to zatrucia wielolekowe oraz czy zatruciu towarzyszył etanol. Główną grupę materiałów biologicznych poddanych analizie stanowiły surowica krwi (przypadki zatruc bez skutku śmiertelnego), krew sekcyjna, nerka i wątroba (zatrucia śmiertelne). W niektórych przypadkach zatruc śmiertelnych, gdzie dostępne były inne tkanki przeanalizowano stężenia karbamazepiny i jej metabolitów, w celu ustalenia miejsca gromadzenia się leku (jego działania). Następnie poddano analizie uzyskane wyniki, korzystając z reguły opisanej przez Apple'a starano się prześledzić przebieg metabolizmu badanego leku we wcześniej opisanych przypadkach. W kilku próbach, w grupie zatruc ostrych bez skutku śmiertelnego, gdzie była możliwość pobrania krwi w kilkudniowych odstępach, starano się prześledzić kinetykę (tylko niektóre jej elementy) eliminacji karbamazepiny, również odnosząc się do faktu jakiego rodzaju było to zatrucie (zwłaszcza czy był obecny etanol).

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie tabel i grafów. Zaprezentowano również chromatogramy TIC analizowanych materiałów, przedstawiające sposób identyfikacji nieznanymi metabolitów karbamazepiny, następnie odniesiono ich obecność do danych literaturowych. Dzięki zastosowaniu detektora masowego uzyskano możliwość wykazania obecności innych metabolitów karbamazepiny, tj. 2-hydroksykarmamazepiny (2-OH-CBZ), 3-hydroksykarmamazepiny (3-OH-CBZ), 10-hydroksykarmamazepiny (10-OH-CBZ) oraz 9-hydroksymetylo-10-karbomyloakrydanu (HMCA).

Uzyskane wyniki mogą stanowić toksykologiczną bazę danych dla zatruc karbamazepiną celem wykorzystania przede wszystkim w ekspertyzie chemiczno-toksykologicznej. Niektóre wnioski, wypływające z prześledzenia zmian stężeń metabolitów karbamazepiny w interakcjach, mogą mieć znaczenie nie tylko w leczeniu zatruc ale także w terapii psychiatrycznej.

