

# Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Serum Lityum ve Total Valproik Asit Düzeylerinin Ölçüm Sonuçlarına Etkisi

## *Effects of Storage Temperature and Time on Stability of Serum Lithium and Total Valproic Acid Levels*

İbrahim Kaplan

Rahile Arslan

Hatice Yüksel

Osman Evliyaoğlu

Gülten Toprak

Leyla Çolpan

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Diyarbakır, Türkiye

**Başvuru Tarihi:** 19 Ekim 2014

**Kabul Tarihi:** 09 Aralık 2014

### ÖZET

**Amaç:** Lityum ve valproik asit psikiyatrik ve nörolojik hastalıklarda kullanılan ilaçlardandır. Tedavi aralığının darlığı ve oldukça geniş yan etkisinden dolayı bu ilaçların serum düzeylerinin doğru ölçümleri önemlidir. Laboratuvarı veya laboratuvara numuneleri teslim sürecinde teknik sorunlar nedeniyle numunelerin analizi gecikebilmektedir. Sorun aynı gün çözülemiyorsa, buzdolabında bekleme süresi uzayabilir. Numunelerin uzun süreli ve uygunsuz sıcaklıkta depolanmasının yanlış sonuçlara neden olabileceği bilinmektedir. Bu çalışmada, depolama sıcaklığı ve süresinin lityum ve total valproik asit düzeylerinin, stabilitesine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma için lityum ve valproik asit kullanan 15'er hastadan alınan numuneler üçe ayrıldı. Birinci numuneler, hemen çalışıldıktan sonra oda sıcaklığında (24°C -26°C) 24 saat bekletilip tekrar çalışıldı. Hemen çalışılan örnekler bazal değer olarak kabul edildi. İkinci numuneler, +4°C'de saklandı 24 ve 48 saat sonra çalışıldı. Üçüncü numuneler ise -20°C'de 1 ay bekletildikten sonra çalışıldı. Çalışma enzimle birleştirilmiş immunoassay tekniği (EMIT) ile çalışıldı. Sonuçlar Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Lityum düzeylerinde hemen çalışılan ve -20°C'de 1 ay bekletildikten sonra çalışılan örnekler arasında ( $p=0.003$ ) (değişim değeri %14.28); hemen çalışılan ve oda sıcaklığında (24°C -26°C) 24 saat bekletilip çalışılan örnekler arasında ( $p=0.001$ ) (değişim değeri %47.14) istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diğer sonuçlarda ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Valproik asit düzeylerinde de aynı şekilde; hemen çalışılan ve -20°C'de 1 ay bekletildikten sonra çalışılan örnekler arasında ( $p=0.015$ ) (değişim değeri %15.78) istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diğer sonuçlarda anlamlı bir farklılık yok idi.

**Sonuç:** Lityum içeren serum örnekleri hemen çalışılmayacağı zaman +4°C'de 2 güne kadar saklanabilir. Ancak örnekler oda sıcaklığında bekletilmemeli veya dondurulmamalıdır. Valproik asit örnekleri ise oda sıcaklığında 1 gün bekletilebilir veya +4°C'de 2 güne kadar saklanabilir, ancak örnekler dondurulmamalıdır.

**Anahtar sözcükler:** Lityum; valproik asit; stabilize

**ABSTRACT**

**Objective:** Lithium and valproic acid are drugs used in psychiatric and neurological disorders. Accurately measurements of serum levels of these drugs are important due to the narrowness of therapeutic range and rather wide side effect of these drugs. Analyze of samples may be delayed due to technical problems in the laboratory or in the process of samples delivery to the laboratory. If the problem can not be resolved in the same day, refrigerator waiting period may extend. It is known that prolonged storage time and inappropriate temperature may cause incorrect results for many analyses. In our study, we aimed to investigate the effects of storage temperature and time on the stability of lithium and total valproic acid levels.

**Materials and Methods:** Blood samples were collected from patients who are taking lithium (n=15) and valproic acid (n=15). Serum samples were separated into 3 parts. The first part was analyzed immediately and stored 24 hours at room temperature (24°C -26°C) and then reanalyzed. The second part was stored at +4°C and were analyzed at 24th and 48th hours. The third part of samples was analyzed after stored at -20°C in a freezer for 1 month.

**Results:** The difference of lithium levels between the measurements at baseline and stored at -20°C for 1 month (p=0.003) ( percent change %14.28) and stored at room temperature for 1 day (p=0.001) ( percent change %47.14), were statistically significant. Valproic acid results between the measurements at baseline and stored at -20°C for 1 month were statistically significant (p=0.015) (percent change %15.78). There was not any significant difference between the other results.

**Conclusions:** Serum samples for lithium measurement should be analyzed immediately or can be stored at +4°C for two days. But the samples should not be stored at -20°C, or at room temperature. However the serum samples for valproic acid measurement can be stored at room temperature for 1 day or at +4°C for two days. But they should not be stored at -20°C.

**Key words:** Lithium; valproic acid; stability

**GİRİŞ**

Klinik biyokimya laboratuvarlarında, sonuçların doğruluğunu sağlamak için, onları etkileyebilecek faktörlerin önceden bilinmesi ve mümkünse giderilmesi sonuçların doğruluğu açısından son derece önemlidir (1). Toplam test süreci preanalitik, analitik ve postanalitik evrelere ayrılıp incelenmektedir (2).

Yapılan araştırmalarda hataların daha sıklıkla preanalitik ve postanalitik evrelerde olduğu görülmüştür. Preanalitik evre hataları, toplam hataların %46-68,2'ini, postanalitik hatalar ise %18,5-47'sini oluşturmaktadır (2). Preanalitik evrede etkili faktörler arasında özellikle örneklerin bulunduğu ortam ısı ve örneğin bekleme süresi önemlidir.

Lityum ve valproik asit (VPA) bipolar bozukluğun tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardandır. Bu maddeler, yıllarca kullanılmasına rağmen, farmakolojik ve toksikolojik mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (3). Lityum ve VPA'nın, davranışsal ve bilişsel performansı artırdığı, nörodejenerasyon ve nöroinflamasyonu baskıladığı, nörogenez ve anjiogenezini artırdığı ve hücre yaşamını artırdığı gösterilmiştir (4). Lityum

önemli bir eser elementtir. Lityum biyolojik etkilerini birçok enzimler, hormonlar ve vitaminler ile etkileşerek göstermektedir. Hayvan çalışmaları lityumun pluripotent kök hücrelerinin progenitör hücrelere olgunlaşmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Lityum eksikliği düşük diyetle alım ve bazı hastalıklarda (örn. böbrek hastalığı) görülmesine rağmen eksikliği sonucunda davranış bozukluğu haricinde herhangi bir hastalık gözlenmemiştir (5).

Lityum yaygın olarak manik depresyonun tedavisinde kullanılmaktadır ve çoğu hastanın semptomlarında azalma görülmektedir. Terapötik dozlarda lityumun nöroprotektif/nörotrofik etkisi vardır (5). VPA çeşitli nöbet tiplerinin tedavisinde (3) daha az olmak üzere de şizofrenide kullanılan bir maddedir. Klinik etkisine aracılık eden mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, GABA transaminazı inhibe ederek glutamat ve dopaminin nörotransmisyonunu azaltırken GABA'nın nörotransmisyon etkisini artırır. Bununla beraber intrasellüler sinyal yollarını etkileyerek, nöronal uyarılabilirliğin azaltılması ve histon deasetilazın inhibisyonunda rol oynayabilir. Son yıllardaki çalışmalar

VPA'nın hayvan nörodejeneratif hastalık (stroke) modelinde nöroprotektif etkileri olduğunu göstermiştir (6,7).

Lityum ve VPA düzeylerinin bakılması istenilen hastalarda gerek alınan kanların laboratuvara ulaştırılması esnasında, gerekse laboratuvar içerisinde teknik aksaklıklar nedeniyle serumların çalışılması gecikebilmektedir. Örneğin cihazın arızalanması ya da elektrik arızası gibi durumlarda test için gönderilen kanlar, serumları ayrılarak +4°C'de bekletilebilmektedir. Arızanın aynı gün giderilemediği durumlarda buzdolabında bekletme süresi de uzayabilmektedir. Biz de çalışmamızda farklı koşullarda saklanan serumlarda lityum ve Total VPA düzeylerinin stabilitelelerini incelemeyi amaçladık.

### GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için öncelikle Dicle Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi psikiyatri polikliniğine başvuran ve lityum kullanan 15, valproik asit kullanan 15 gönüllü hastadan kan örnekleri alındı. Kan örneklerinin 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmesi ile elde edilen serum örneklerinden 3 numune ayrılarak aşağıdaki prosedürler uygulandı.

1. Birinci numuneler, hemen çalışıldıktan sonra, oda sıcaklığında (24 °C -26 °C) 24 saat bekletilip tekrar çalışıldı.
2. İkinci numuneler, +4°C' de saklandı; 24 ve 48 saat sonra çalışıldı.
3. Üçüncü numuneler ise -20°C'de 1 ay bekletildikten sonra çalışıldı.

Birinci numuneden ilk çalışılan örnek, bazal değer olarak kabul edildi.

Lityum ve total VPA düzeyleri Siemens Dimension RXL (Siemens Healthcare Diagnostic, IL,2004) otoanalizöründe Enzimle birleştirilmiş immunoassay tekniği (EMIT) ile çalışıldı.

### İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Farklı koşullarda saklanan serumların lityum ve VPA sonuçları SPSS15.0 programı kullanılarak Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Serum Lityum ve VPA sonuçları Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Lityum düzeylerinde bazal örneklerle, -20°C'de 1 ay bekletildikten sonra çalışılan örnekler arasında ( $P=0.003$ ) (değişim değeri %14.28); bazal örneklerle ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilip çalışılan örnekler arasında ( $P=0.001$ ) (değişim değeri %47.14) istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diğer sonuçlarda ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Tablo I).

VPA düzeylerinde de aynı şekilde bazal örnekler ile -20°C saklanan örneklerde anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p=0.015$ ) (değişim değeri %15.78). Diğer sonuçlarda anlamlı bir farklılık yok idi. (Tablo I). Üretici firma tarafından bildirilen toplam tekrarlanabilirlik değerleri (%CV) sırasıyla; Lityum 0.68 mmol/L için 3.4; VPA 76 µg /L için 1.7 idi.

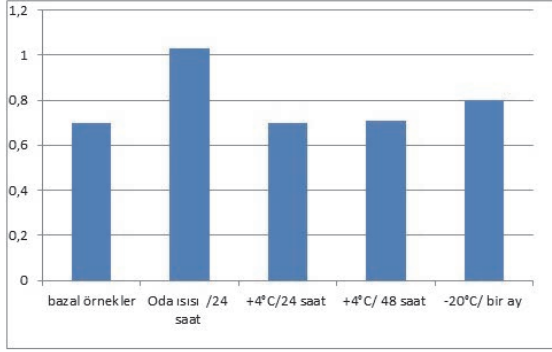
**Tablo I.** Farklı saklama koşullarında serum lityum ve total valproik asit düzeylerinin değişimi  
**Table I.** The change in total valproic acid and serum lithium levels in different storage conditions.

Örnekler	Lityum (mmol/L) (ortalama ± SD)	Değişim değeri (%)	Valproik asit (µg/mL) (ortalama± SD)	Değişim değeri (%)
Bazal ölçüm değeri	0.70 ± 0.23		66.02 ± 29.53	
Oda ısısı /24 saat	<b>1.03 ± 0.30<sup>a</sup></b>	<b>+47.14</b>	62.75 ± 26.77	-4.95
+4°C/24 saat	0.70 ± 0.22	0	70.20 ± 35.70	+6.33
+4°C/ 48 saat	0.71 ± 0.23	+1.4	73.03 ± 38.26	+10.61
-20°C/ bir ay	<b>0.80 ± 0.25<sup>b</sup></b>	<b>+14.28</b>	<b>55.60 ± 25.15<sup>c</sup></b>	<b>-15.78</b>

<sup>a</sup> , bazal ölçüm değeri ile karşılaştırıldığında  $p=0.001$

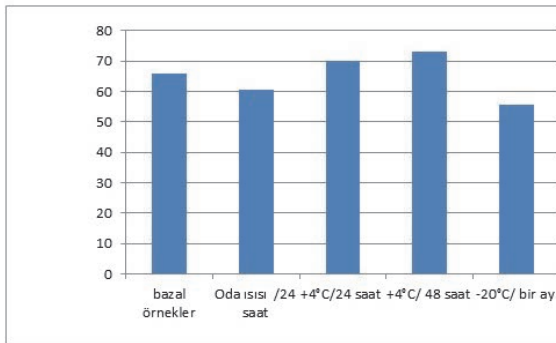
<sup>b</sup> , bazal ölçüm değeri ile karşılaştırıldığında  $p=0.003$

<sup>c</sup> bazal ölçüm değeri ile karşılaştırıldığında  $p=0.015$



**Şekil I.** Farklı saklama koşullarında serum lityum düzeylerinin değişimi

**Figure I.** The change in serum lithium levels in different storage conditions



**Şekil II.** Farklı saklama koşullarında total valproik asit düzeylerinin değişimi

**Figure II.** The change in total valproic acid levels in different storage conditions

## TARTIŞMA

Çalışmamızda, lityum ve VPA içeren serum örneklerinin, buzdolabında iki gün stabil kalabileceğini, ayrıca serum total VPA düzeylerinin oda sıcaklığında da 1 gün stabil kalabileceğini saptadık. Terapötik ilaç monitörizasyonu, uygulanan ilacın hassas ve doğru ölçümü ile başarılı bir tanı aracı olabilir. Bu nedenle örneklerin optimizasyonu, özellikle preanalitik süreçte çalışma zamanı ve saklama koşulları, ölçümün doğruluğu için önemlidir.

Lityum gastrointestinal sistemin üst kısmından hızlıca emilir ve hemen hemen tamamıyla biyotransformasyona uğramadan böbreklerden elimine edilir. Glomerüllerden serbest iyon şeklinde filtre edilir ve %80'i proksimal tübüllerden reabsorbe edilir. Lityum terapötik indeksi (0.6 - 1.2 mEq/L) dar olan bir ilaçtır (8). Yüksek oranda proteine bağlı olan

VPA farmakolojik aktivitesi nedeniyle serbest veya bağlanmamış halde kan-beyin bariyerini geçer. Kompleks bir metabolizması vardır çünkü mitokondrial beta-oksidasyon, CYP2C19, CYP2A6, ve glukuronizasyon gibi birçok değişik metabolik süreçten geçer. Dolayısıyla bu yolları etkileyen herhangi bir mekanizma VPA metabolizmasını etkileyecektir (8). VPA steroid hormonların metabolizmalarını, serum konsantrasyonlarını ve bu hormonların regülasyonundan sorumlu hipotalamus-hipofiz ekseninin fonksiyonunu doğrudan etkileyebileceği için (9) serum düzeyi dikkatle takip edilmelidir.

Stabilite ile ilgili çalışmalar daha önce de birçok araştırmacı tarafından farklı parametreler üzerine yapılmıştır. Shih ve ark. kolesterol, HDL ve trigliserid ile yaptıkları çalışmada; numuneleri uzun süre -70°C bekleterek sonuç değişimini gözlemlemişlerdir (10). Taylor ve ark. ise 27 biyokimyasal analitin farklı koşullarda bekletilerek yaptığı çalışmada bazı parametrelerin sonuçlarının anlamlı olarak değiştiğini rapor etmişlerdir (11).

İlaç stabilitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda da farklı bulgular elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada +4°C'de, oda sıcaklığında ve 32°C'de iki güne kadar bekletilen numunelerde amikasin, gentamisin, tobramisin, vankomisin, digoksin, teofilin, fenobarbital, salisilat, asetaminofen ve etanol ile beraber VPA düzeylerinin de değişmediği rapor edilmiştir (12). Chetty ve ark. ise antikonvulzan ilaçların stabilitesi ile ilgili yaptığı çalışmada VPA düzeylerinin 48 saat boyunca 25°C ve 37°C stabil olduğunu bildirmişlerdir (13). Tarasidis ve ark. ise VPA düzeylerinin buzdolabında veya dondurmakla 7 güne kadar stabilitesinde bir değişiklik olmadığını gözlemlemişler. Oda ısısında ise 96 saat bekletilmesi ile total VPA düzeylerinde değişiklik gözlenmezken serbest fraksiyonunda artma gözlemlenmiş (14).

Bizim çalışmamızda da total VPA düzeylerinde +4°C'de 24 ve 48 saat bekletildiğinde stabilitesinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Bununla beraber oda sıcaklığında 24 saat bekletildiğinde de anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Bu da diğer çalışmalarla uyumlu idi.- 20°C'de 1 ay bekletildiğinde

anlamli bir farklılık gözlemlendi ( $p=0.015$ ). Bizim sonuçlarımızın diğ er ç alışmalarla uyumsuzluk göstermesi depolama süresinin uzunluğ undan ve yöntem farklılığ ından kaynaklanabilir. Tarasidis ve ark. (14) ölçüm yöntemi olarak gaz kromatografisi kullanmış lardı. Biz ise ç alışmamızda EMIT yöntemi kullandık.

Bailey ve ark. ise yaptıkları ç alışmada buzdolabında saklanan lityumun 1 hafta süresince stabil kaldığını gözlemlemiş ler (15). Biz de ç alışmamızda lityum düzeylerinin  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ve 48 saat bekletildiğ inde stabilitelelerinde istatikselsel olarak anlamlı bir değ iş iklik saptanmadığını gözlemledik. Bununla beraber oda sıcaklığ ında 24 saat ( $p=0.001$ ) ve  $-20^{\circ}\text{C}$  1 ay ( $p=0.003$ ) bekletildiğ inde anlamlı bir değ iş iklik saptandı.

Sonuç olarak ç alışmamızda, laboratuvara gelen lityum ve VPA iç eren serum örnekleri herhangi bir aksaklık durumunda hemen ç alışılmayacağ ı zaman buzdolabında saklanabileceğ ini ve iki gün stabil kalabileceğ i sonucuna vardık. Ancak lityum iç eren serum örnekleri oda sıcaklığ ında bekletilmemeli veya dondurulmamalıdır. VPA iç eren serum örnekleri ise oda sıcaklığ ında 1 güne kadar bekletilebilir, ancak örnekler dondurulmamalıdır. Ayrıca bu bulgular; lityum ve VPA ile yapılacak klinik ve epidemiyolojik ç alışmalar için, serum örneklerinin hangi koş ullarda saklanması gerektiğ i hakkında fikir verebilir.

#### KAYNAKLAR

1. Türkmen Y. H., Serdar M. A., Hař imi A., Cihan M., Kurt İ., Akman ř., Erbil M. K. Hemoliz ve lipeminin biyokimyasal testlere etkisi ve lipemik etkinin uzaklaş tırılmasında kullanılan yöntemlerin karş ılaş tırılması. Gülhane Tıp Dergisi 2007; 49: 5-10.
2. Dađ ıoğ lu G., İnal T., Aksoy K. Altı Sigma Nedir?. Arř ıv 2009; 18: 132
3. Hill E. J., Nagel D. A., O'Neil J. D., Torr E., Woehrling E. K., Devitt A., Coleman M. D. Effects of lithium and valproic acid on gene expression and phenotypic markers in an NT2 neurosphere model of neural development. PloS one, 2013, 8.3: e58822.
4. Chiu C.T., Wang Z., Hunsberger J. G., Chuang D. M.. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. Pharmacological reviews, 2013, 65.1: 105-42.
5. Mlyniec K., Davies C. L., de Agüero Sánchez I. G., Pytka K., Budziszewska B., Nowak G.. Essential elements in depression and anxiety. Part I. Pharmacological Reports, 2014.
6. Tsai Li-K., Leng Y., Wang Z., Leeds P., Chuang D. M.. The mood stabilizers valproic acid and lithium enhance mesenchymal stem cell migration via distinct mechanisms. Neuropsychopharmacology. 2010, 35.11: 2225-37.
7. Douma T.N., Millan M.J., Verdouw P.M., Oosting R.S., Olivier B., Groenink L. Valproate improves prepulse inhibition deficits induced by corticotropin-releasing factor independent of GABA (A) and GABA (B) receptor activation. Neuropharmacology, 2014, 79: 66-74.
8. Deligiannidis K. M., Byatt N., Freeman M. P. Pharmacotherapy for mood disorders in pregnancy: a review of pharmacokinetic changes and clinical recommendations for therapeutic drug monitoring. Journal of clinical psychopharmacology, 2014, 34.2: 244-55.
9. Güven F., Zorlu Y., Yensel N., Valproik asit ve Karbamazepin kullanan epilepsili kadın hastalarda polikistik over sendromu, insülin düzeyi ve obezite. Epilepsi, 2003; 9(1), 21-6.
10. Shih W. J., Bachorik P. S., Haga J. A., Myers G. L., Stein E. A. Estimating the long-term effects of storage at  $-70^{\circ}\text{C}$  on cholesterol, triglyceride, and HDL-cholesterol measurements in stored sera. Clinical Chemistry, 2000; 46(3), 351-64.
11. Taylor E. C., Sethi B. Stability of 27 biochemistry analytes in storage at a range of temperatures after centrifugation. British journal of biomedical science, 2010, 68. 3: 147-57.
12. Bush V., Blennerhasset J., Wells A., Dasgupta A. Stability of therapeutic drugs in serum collected in vacutainer serum separator tubes containing a new gel (SST II). Therapeutic drug monitoring. 23.3 (2001): 259-62.
13. Chetty M. The stability of anticonvulsant drugs in whole blood. Therapeutic drug monitoring. 16.5 (1994): 491-4.
14. Tarasidis C.G., Garnett W.R., Kline B.J., Pellock J.M. Influence of tube type, storage time and temperature on the total and free concentration of valproic acid. Ther Drug Monit 1986; 8: 373-6.
15. Bailey D. N., Joseph J. C., John R. B. Stability of drug concentrations in plasma stored in serum separator blood collection tubes. Therapeutic drug monitoring 10.3 (1988): 352-4.

---

#### Yazıř ma adresi:

İbrahim Kaplan  
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya,  
Diyarbakır, Türkiye  
e-posta: dibrabrimkaplan@hotmail.com

---