

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE RAKAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE RAKAR

**PROUČEVANJE VPLIVA ZDRAVLJENJA S PROTIEPILEPTIČNIMI
UČINKOVINAMI NA OBSEG OKSIDATIVNEGA STRESA PRI BOLNIKIHZ
EPILEPSIJO**

**EVALUATION OF THE INFLUENCE OF ANTIEPILEPTIC DRUG THERAPY
ON OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH EPILEPSY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorjuizr. prof. dr. Tomažu Vovku, mag. farm. za strokovno pomoč, usmerjanje in spodbudo pri izdelavi magistrske naloge.

Najlepša hvala tudi dr. Boštjanu Martincu, mag. farm. ter ostalim sodelavcem s Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi med izdelavo magistrske naloge pomagali s svojim znanjem in izkušnjami.

Prav tako se iskreno zahvaljujem svojim staršem, ki so mi omogočili študij in me podpirali v času študija. Hvala tudi sestri in prijateljem za podporo in spodbudo tekom študija ter pri izdelavi magistrske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvomizr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.

Jure Rakar

Predsednik izpitne komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm.

Član izpitne komisije:izr. prof. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 EPILEPSIJA	1
1.1.1 DEFINICIJA EPILEPSIJE	1
1.1.2 KLASIFIKACIJA EPILEPSIJE	2
1.1.3 RAZVOJNE FAZE EPILEPSIJE	3
1.2 PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE	4
1.2.1 PEU STAREJŠE (PRVE) GENERACIJE	4
1.2.1.1 Karbamazepin	4
1.2.1.2 Valprojska kislina	5
1.2.2 PEU NOVEJŠE (DRUGE) GENERACIJE	6
1.2.2.1 Levetiracetam	7
1.2.2.2 Pregabalin	8
1.2.2.3 Topiramata	8
1.2.3 PEU TRETJE GENERACIJE	9
1.3 EPILEPSIJA IN OKSIDATIVNI STRES	10
1.3.1 OKSIDATIVNI STRES IN NJEGOVA VLOGA V EPILEPTOGENEZI	10
1.3.2 OKSIDATIVNI STRES PRI NEZDRAVLJENIH BOLNIKIHZ EPILEPSIJO	12
1.3.3 OKSIDATIVNI STRES PRI BOLNIKIHZ EPILEPSIJO, ZDRAVLJENIMI Z RAZLIČNIMI PROTIEPILEPTIČNIMI UČINKOVINAMI	13
2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.2 BOLNIKI IN KONTROLNA SKUPINA	18
3.3 METODE	19
3.3.1 DOLOČANJE AKTIVNOSTI ENDOGENIH ENCIMSKIH ANTIOKSIDANTOV	19
3.3.1.1 Katalaza	19
3.3.1.2 Superoksid dismutaza	20
3.3.1.3 Glutation reduktaza	22
3.3.1.4 Glutation peroksidaza	23
3.3.2 DOLOČANJE PLAZEMSKÉ KONCENTRACIJE PROTIEPILEPTIČNIHZ UČINKOVIN	24
3.3.2.1 Karbamazepin	24
3.3.2.2 Valprojska kislina	25
3.3.2.3 Levetiracetam	26

3.3.2.4	Pregabalin	27
3.3.2.5	Topiramat	28
3.3.3	OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA	29
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1	DEMOGRAFSKI IN KLINIČNI DEJAVNIKI	31
4.1.1	Demografska primerljivost bolnikov z epilepsijo in kontrolne skupine	31
4.1.2	Primerjava demografskih in kliničnih dejavnikov med skupinami bolnikov	32
4.2	ENDOGENI ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI	33
4.2.1	Demografski in klinični podatki ter aktivnosti encimskih antioksidantov	33
4.2.2	Povezava epilepsije z aktivnostmi encimskih antioksidantov	35
4.2.3	Usklajenost v delovanju encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo	37
4.2.4	Aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo v primerjavi s kontrolno skupino	37
4.2.5	Primerjava aktivnosti encimskih antioksidantov med posameznimi skupinami bolnikov in kontrolno skupino	39
4.2.6	Primerjava aktivnosti encimskih antioksidantov med skupinami bolnikov	39
4.3	ZDRAVLJENJE S PROTIEPILEPTIČNIMI UČINKOVINAMI	42
4.3.1	Odmerki in plazemske koncentracije PEU pri bolnikih z epilepsijo	42
4.3.2	Plazemske koncentracije PEU in referenčno območje	43
4.3.3	Primerjava zdravljenja s CBZ, VPA in LEV med skupinami bolnikov	44
4.3.4	Povezava med zdravljenjem (odmerki, plazemske koncentracije) s CBZ, VPA in LEV in aktivnostjo encimskih antioksidantov	45
5	SKLEPI	47
6	VIRI IN LITERATURA	49

POVZETEK

Pri številnih nevroloških boleznih, vključno z epilepsijo, je pogosto prisoten povečan oksidativni stres. Ni še povsem jasno, ali je ta vzrok ali posledica nevrološke bolezni, najverjetneje pa gre za preplet obojega. Pri epilepsiji pa naj bi povečan obseg oksidativnega stresa povzročale tudi nekatere protiepileptične učinkovine (PEU).

Da bi to trditev potrdili, smo v naši magistrski nalogi proučevali vpliv zdravljenja s PEU starejše in novejšje generacije na aktivnosti encimskih antioksidantov (katalaze (CAT), superoksid dismutaze (SOD), glutation reduktaze (GR) in glutation peroksidaze (GPx)) pri 49 bolnikih z idiopatsko epilepsijo ter dobljene vrednosti primerjali z rezultati 14 zdravih prostovoljcev. Skupina bolnikov je zajemala tiste, ki so se zdravili s PEU starejše generacije (karbamazepin, valprojska kislina), PEU novejšje generacije (levetiracetam, topiramata ali pregabalin) ter politerapijo (kombinacija PEU starejšje ter novejšje generacije).

Ugotovili smo statistično značilne razlike v aktivnostih encimskih antioksidantov med bolniki z epilepsijo in kontrolno skupino zdravih prostovoljcev. Aktivnosti CAT in SOD so bile pri bolnikih, v primerjavi z zdravimi prostovoljci, statistično značilno povečane ($p < 0.0001$), medtem, ko so bile aktivnosti GR ($p < 0.0001$) in GPx ($p = 0.003$) statistično značilno zmanjšane. Podobno kot pri primerjavi s kontrolo, so bile aktivnosti SOD in CAT značilno večje, aktivnosti GR in GPx pa značilno manjše pri bolnikih, zdravljenih s starejšjo generacijo, v primerjavi z novejšjo generacijo PEU. Aktivnosti encimov pri skupini bolnikov, ki se je zdravila s politerapijo, so se nahajale med vrednostmi, ki smo jih določili pri skupinah bolnikov, zdravljenih s starejšjo in novejšjo generacijo PEU. Iz rezultatov lahko sklepamo, da se encimska sistema SOD in CAT očitno lahko prilagodita na povečan oksidativni stres pri bolnikih z epilepsijo, medtem ko se encimska antioksidantska glutationskega sistema ne uspeta prilagoditi. Bolnikom z epilepsijo smo določili tudi plazemske koncentracije PEU (ter njihovih presnovkov), katere so se večinoma nahajale znotraj referenčnih območij. Pri ugotavljanju povezave med zdravljenjem s PEU ter aktivnostjo encimskih antioksidantov pa smo prišli do zaključka, da odmerek in plazemska koncentracija PEU pri terapevtskih koncentracijah bistveno ne vplivata na aktivnost encimskih antioksidantov. Za dokončno potrditev teh rezultatov pa bi bilo potrebno izvesti nadaljnje študije na večjem številu vzorcev.

Ključne besede: *epilepsija, protiepileptične učinkovine, starejšja generacija PEU, novejšja generacija PEU, politerapija, oksidativni stres, aktivnosti encimskih antioksidantov*

ABSTRACT

In many neurological diseases, including epilepsy, increased oxidative stress is often present. It is not yet entirely clear whether this is a cause or a consequence of neurological disease, but most likely it is a combination of both. Additionally, treatment with antiepileptic drugs (AEDs) probably influence on the increased extent of oxidative stress.

To confirm this theory, we evaluated the influence of therapy with antiepileptic drugs of older and newer generation on antioxidant enzyme activity (of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx)) in 49 patients with idiopathic epilepsy and compared the obtained values with the results of 14 healthy volunteers. The group of patients covered those who were treated with older generation AEDs (carbamazepine, valproic acid), newer generation AEDs (levetiracetam, topiramate, or pregabalin) and polytherapy (combination of older and newer generation AEDs).

Statistically significant differences in antioxidant enzyme activities between patients with epilepsy and control group of healthy volunteers were observed. CAT and SOD activities in patients were significantly increased compared to healthy volunteers ($p < 0.0001$), while the activities of GR ($p < 0.0001$) and GPx ($p = 0.003$) were significantly reduced. Similarly, SOD and CAT activities were significantly higher, while GR and GPX activities were significantly lower in patients treated with the older generation, compared to the newer generation AEDs. Antioxidant enzyme activities in the group of patients, who were treated with polytherapy, were located between values of patients treated with older and newer generation AEDs, respectively. Based on the results, we can conclude that the enzyme systems SOD and CAT can obviously adapt to the increased oxidative stress in patients with epilepsy, while the antioxidant enzymes of the glutathione system fail to adapt.

Plasma concentrations of AED (and their metabolites) in patients with epilepsy were also measured and most were within the reference range. No correlation between dose or concentration of AED and antioxidant enzyme activity was found. However, to confirm these results, it is necessary to conduct further studies on a larger number of patients.

Keywords: *epilepsy, antiepileptic drugs, older generation AEDs, newer generation AEDs, polytherapy, oxidative stress, antioxidant enzyme activities*

SEZNAM OKRAJŠAV

4-en VPA	2-propil-4-pentenojska kislina
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksigvanozin
CAT	katalaza
CBZ	karbamazepin
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EpoCBZ	karbamazepin-10-11-epoksid
GABA	γ -aminobutirna kislina
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation (reducirana oblika)
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Pressure Liquid Chromatography)
I.N.T.	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid
ITM	indeks telesne mase (kg/m ²)
LEV	levetiracetam
LTG	lamotrigin
MDA	malonaldehid
NADP ⁺	oksidirana oblika nikotinamidadenindinukleotidfosfata
NADPH	reducirana oblika nikotinamidadenindinukleotidfosfata
OXC	okskarbazepin
PEU	protiepileptična učinkovina
PGB	pregabalin
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (ang. Reactive Nitrogen Species)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species)
SD	standardni odklon
SOD	superoksid dismutaza
TPM	topiramet
UV	ultravijolična svetloba
VPA	valprojska kislina

1 UVOD

1.1 EPILEPSIJA

Epilepsija je ena najpogostejših resnih nevroloških bolezni, ki prizadene približno 65 milijonov prebivalstva po vsem svetu. Pojavi se pri 1 % ljudi do 20. leta starosti, in pri 3 % ljudi do 75. leta starosti. Pogostejša je pri moških kot pri ženskah, čeprav je skupna razlika majhna. Večina obolelih (80 %) je v državah v razvoju (1).

1.1.1 DEFINICIJA EPILEPSIJE

Leta 2005 sta Mednarodni urad za epilepsijo (International Bureau for Epilepsy, IBE) in Mednarodna liga proti epilepsiji (International League Against Epilepsy, ILAE) definirala **epilepsijo** kot motnjo možganov, za katero je značilna trajna nagnjenost k epileptičnim napadom z vsemi nevrobiološkimi, kognitivnimi, psihološkimi in socialnimi posledicami tega stanja. To v praksi pomeni vsaj dva neizzvana epileptična napada, med katerima poteče več kot 24 ur, pri čemer je **epileptični napad** definiran s pomočjo začasnih znakov in simptomov, do katerih pride zaradi nenormalne električne dejavnosti v možganih (2).

Po praktični klinični definiciji ILAE iz leta 2014, pa je epilepsija bolezen možganov, ki je definirana z enim od naslednjih stanj:

1. Vsaj dva neizzvana (spontana) epileptična napada v razmahu večjem od 24 ur.
2. En neizzvan (spontan) epileptični napad in verjetnost pojava nadaljnjih epileptičnih napadov, podobna splošnemu tveganju ponovitve (vsaj 60 %) po dveh neizzvanih epileptičnih napadih, v naslednjih 10 letih.
3. Diagnoza epileptičnega sindroma.

Po novejši definiciji, je torej epilepsija opredeljena kot bolezen in ne več kot motnja, druga točka te definicije pa omogoča, da se stanje po enem epileptičnem napadu lahko smatra za epilepsijo, če obstaja visoko tveganje za pojav še enega epileptičnega napada. Velika potencialna korist nove definicije je tudi ta, da se epilepsija smatra za odpravljeno, če oseba prerase leta, ki so značilna za epileptični sindrom (med 16. in 21. letom starosti) ali če oseba zadnjih 10 let ni doživela nobenega epileptičnega napada in zadnjih 5 let ni prejela protiepileptičnih zdravil. To sicer še ne zagotavlja, da se epilepsija ne bo ponovila, vendar so možnosti za pojav majhne in oseba ima pravico smatrati, da nima več epilepsije, to pa ima lahko velik pozitiven vpliv na njeno psihično počutje in socialno stanje v družbi. (3).

1.1.2 KLASIFIKACIJA EPILEPSIJE

Glavni namen vsake klasifikacijske sheme je zagotoviti okvir za diagnostični proces v klinični praksi, zato klasifikacija epilepsije obsega dve stopnji: klasifikacijo tipa napada/sindroma in določitev vzroka. Klinična razvrstitev epilepsije se je do nedavnega pretežno osredotočala na določitev tipa epileptičnih napadov, vendar je tudi **etiologija epilepsije** pomemben dejavnik kliničnega poteka in prognoze bolezni. Zato je leta 2011 ILAE predlagala etiološko razvrstitev epilepsije, po kateri je epilepsijo razdelila v 4 kategorije: idiopatsko, simptomatsko, izzvano in kriptogeno.

Idiopatska epilepsija je opredeljena kot epilepsija pretežno genetskega ali domnevno genetskega izvora in pri kateri ni večjih nevroanatomskih ali nevropatoloških nepravilnosti (npr. epilepsije, ki so domnevno posledica multigeneskega ali kompleksnega dedovanja, mitohondrijske motnje, motnje v delovanju ionskih kanalčkov...).

Simptomatska epilepsija je opredeljena kot epilepsija pridobljenega (tumor, možganska kap, poškodba glave, epilepsija po operacijah, virusni ali bakterijski meningitis...) ali genetskega vzroka (West sindrom, Lennox-Gastaut sindrom, Wilsonova bolezen, Dawnov sindrom...) povezana z večjimi anatomskimi ali patološkimi nepravilnostmi in/ali kliničnimi znaki, ki kažejo na osnovno bolezen ali stanje.

Izzvana epilepsija je opredeljena kot epilepsija, pri kateri je prevladujoč vzrok epileptičnih napadov določen sistemski (vročina, porušen metabolizem, dnevno-nočni cikel, menstrualni cikel...) ali okoljski dejavnik (npr. fotosenzitivna epilepsija, epilepsija izzvana z določeno hrano, zvokom, alkoholom, drogo, strupom, branjem, toplo vodo...) in pri kateri ni večjih povzročenih nevroanatomskih ali nevropatoloških sprememb. Nekatere izzvane epilepsije bodo imele genetsko osnovo in nekatere pridobljeno osnovo, vendar pri mnogih ni mogoče opredeliti jasnega vzroka.

Kriptogena epilepsija je opredeljena kot epilepsija domnevno simptomatske narave, pri kateri vzrok ni bil ugotovljen (4).

Določitev vzroka epilepsije je precej otežena, saj je epilepsija v večini primerov posledica več dejavnikov (tako genetike kot pridobljenih vzrokov), zato je določitev etiologije v takih primerih do neke mere arbitrarna.

Epileptične napade delimo na dve glavni skupini: generalizirane in žariščne napade. Ob nastanku **generaliziranega napada** ta zajame obe možganski polobli in običajno pride do motnje oz. izgube zavesti. Pri **žariščnem napadu** se ta začne v določenem predelu ene možganske poloble in tudi ostane lokaliziran. Če se napad razširi na retikularno formacijo (sekundarno generaliziran napad), ravno tako pride do motnje zavesti (5).

Najpomembnejši skupini generaliziranih napadov so **absenčni napadi** (»**petit mal**«) in **tonično-klonični napadi** (»**grand mal**«). Absence se pojavijo pri otrocih, za njih je značilna nekajsekundna izguba zavesti in strmenje v prazno, motorične motnje so redke, pojavijo se krči očesnih zrkel, vek in čela, po napadu si bolniki opomorejo brez kasnejših posledic. Tonično-klonični napadi se začnejo s tonično fazo (močno krčenje celotnega telesa, otrdelost mišic iztegovalk, prenehanje dihanja), ki traja približno minuto, sledi klonična faza (hudi in sinhroni trzajoči gibi celega telesa), ki izzveni po 2-4 minutah. Ostale vrste so **mioklonični napadi** (sunkoviti krči kjerkoli po telesu, ki ne trajajo več kot sekundo), **klonični napadi** (ponavljajoči ritmični krči po udih ali celem telesu, ki običajno trajajo do 2 minuti), **tonični napadi** (telo za nekaj sekund otrpne, dihanje se ustavi, pojavi se penjenje iz ust) in **atonični napadi** (mišični tonus popusti za nekaj sekund, prisotna je izguba zavesti) (5, 6).

Delne napade delimo na **lažje/enostavne** (ne pride do izgube zavesti, oseba zazna nenavaden občutek: okus, strah, mravljinici...) in **zapletene/kompleksne napade** (pride do izgube zavesti, oseba počne nesmiselne stvari: cmokanje, nenormalni odzivi na dražljaje iz okolice...) (5).

1.1.3 RAZVOJNE FAZE EPILEPSIJE

Na splošno velja, da se razvojne faze pri pridobljeni obliki epilepsije pojavijo v treh glavnih fazah: **akutna faza – poškodba** (epileptogeneza se pri pridobljeni epilepsiji lahko sproži kot posledica številnih vrst možganskih poškodb in ti vzroki se lahko s starostjo spreminjajo. Obolenja v obliki tumorjev, infekcij, epileptičnega statusa, otroških vročinskih napadov, kapi, hipoksije in nevrodegenerativnih bolezni povečajo pogostost pridobljene epilepsije), **latentna faza – epileptogeneza** (proces, pri katerem začetna okvara centralnega živčnega sistema (CŽS) vodi k nastopu epileptičnega stanja kot tudi k širjenju dogodkov, ki se pojavijo po uveljavitvi epilepsije in lahko traja leta ali celo desetletja) in **faza spontanih ponavljajočih se napadov – kronična epilepsija** (7).

1.2 PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE

Osnovni način zdravljenja epilepsije, ki je primeren za približno 70 % bolnikov z epilepsijo, predstavlja farmakološko zdravljenje. Širok izbor različnih protiepileptičnih učinkovin (PEU), ki so na voljo na trgu, v splošnem delimo na tri generacije, glede na datum uvedbe v klinično rabo (8).

1.2.1 PEU STAREJŠE (PRVE) GENERACIJE

Med predstavnike starejše generacije PEU spadajo diazepam, etosuksimid, fenobarbital, fenitoin, kalijev bromid, karbamazepin, klobazam, klonazepam, primidon in valprojska kislina (9). Prvi uporabljen predstavnik je bil kalijev bromid leta 1857, najstarejša protiepileptična učinkovina, ki se predpisuje še danes, pa je fenobarbital, ki je bil prvič uporabljen leta 1912 zaradi njegovega sedativnega in protiepileptičnega učinka (10).

Natančnega mehanizma delovanja posameznih PEU še vedno ne poznamo povsem. Večina jih deluje na več tarč in pogosto ne vemo, katera je odgovorna za protiepileptični učinek. Nekatere starejše PEU delujejo v glavnem preko inhibicije nastanka in širjenja akcijskega potenciala tako, da blokirajo napetostno odvisne natrijeve kanalčke (fenitoin, karbamazepin, valprojska kislina) ali T-tip kalcijevih kanalčkov (etosuksimid), druge pa delujejo preko povečanja inhibitornega učinka GABA_A (benzodiazepini, fenobarbital, valprojska kislina). V primerjavi s PEU novejše generacije, se starejši antiepileptiki v večji meri vežejo na plazemske proteine in imajo daljši razpolovni čas (11).

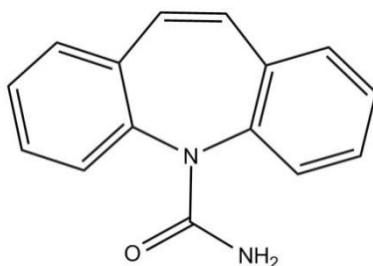
Glavna slabost PEU starejše generacije so predvsem številni neželeni učinki, kar za bolnike predstavlja precejšnjo težavo, saj morajo PEU jemati večinoma celo življenje. Najpogostejši neželeni učinki so preobčutljivostne reakcije, vrtoglavica, utrujenost, ataksija (neusklajenost gibov), hepatotoksičnost, številne protiepileptične učinkovine so tudi teratogene. Problem starejših PEU je tudi njihova farmakokinetika, saj se večinoma presnavljajo v jetrih in inducirajo jetrne encime ter posledično pospešujejo razgradnjo mnogih drugih zdravil. Nasprotno pa valprojska kislina zavira presnovne procese v jetrih in tako zviša plazemske koncentracije nekaterih drugih zdravil (5).

1.2.1.1 Karbamazepin

Karbamazepin (CBZ; **Slika 1**) je v uporabi že od 60-ih let prejšnjega stoletja in je še vedno zdravilo prvega izbora za zdravljenje žariščnih epileptičnih napadov s sekundarno generalizacijo ali brez nje. Uporablja pa se tudi za zdravljenje bipolarni motnje in

nevropatske bolečine. Njegov glavni mehanizem delovanja je preprečitev širjenja nenormalnih električnih impulzov v nevronih preko vezave na napetostno odvisne natrijeve kanalčke. Poleg tega inhibira še kalcijeve kanalčke in aktivira kalijeve kanalčke, kar dodatno pripomore pri preprečitvi epileptičnih napadov. Najpogostejši neželeni učinki so omotica, zaspanost, kognitivne motnje, hiponatriemija, depresija, možne so tudi preobčutljivostne dermatološke reakcije, agranulocitoza, nevtropenija in teratogenost (12).

CBZ se po peroralni aplikaciji absorbira počasi, njegova biološka uporabnost pa znaša 75-80 %. V plazmi se ga 70-80 % veže na proteine, večinoma albumin in v manjši meri α_1 -kislil glikoprotein. Večina peroralno zaužitega odmerka CBZ je podvržena precejšnjemu metabolizmu in le manj kot 2 % se ga izloči nespremenjenega z urinom. Ker se presnavlja z enakimi jetrnimi encimi kot nekatera ostala zdravila, je pri kombinaciji s temi potrebna posebna previdnost. Najpogostejša presnovna pot je oksidacija do aktivnega presnovka karbamazepin-10-11-epoksida (EpoCBZ), ki je odgovoren za učinek in tudi toksičnost CBZ. Njegov razpolovni čas je odvisen od starosti bolnika (pri odraslih: $t_{1/2} = 18-55h$), ker pa je CBZ tudi močan induktor P450 jetrnih encimov, se pri rednem jemanju razpolovni čas skrajša tudi za več kot polovico (odrasli: $t_{1/2} = 8-20h$) (13).



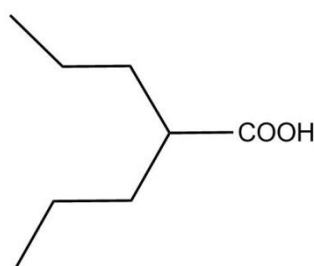
Slika 1. Karbamazepin

1.2.1.2 Valprojska kislina

Protiepileptični učinek valprojske kisline (VPA; **Slika 2**) je leta 1962 naključno odkril Pierre Eymard, ki je v svoji raziskavi valprojsko kislino uporabil kot topilo za derivate, za katere je preučeval protiepileptično delovanje na glodalcih. VPA je širokospektralna protiepileptična učinkovina, ki se uporablja za zdravljenje generaliziranih (absence, mioklonični, tonično-klonični napadi), sekundarno generaliziranih in delnih epileptičnih napadov ter intravensko pri epileptičnem statusu, poleg tega pa je učinkovita tudi pri zdravljenju specifičnih sindromov (Lennox-Gastaut, West sindrom), bipolarni motnje, preprečevanju nevropatske bolečine, migrenskih glavobolov in vročinskih krčev. Zaradi

njene strukture, ki se precej razlikuje od ostalih PEU, pripisujejo valprojski kislini več mehanizmov delovanja. Povečala naj bi sintezo GABA preko aktivacije glutamat-dekarboksilaze (GAD) ter inhibirala katabolizem GABA preko inhibicije GABA transaminaze (GABA-T) in sukcin semialdehid dehidrogenaze. Poleg tega naj bi inaktivirala napetostno odvisne Na⁺ kanalčke in T-tip Ca²⁺ kanalčkov. Neželeni učinki vključujejo izgubo las, gastrointestinalne (slabost, bruhanje, anoreksija, povečanje telesne mase) in nevrološke težave (tremor, zaspanost, letargije) ter redkeje teratogenost in hepatotoksičnost, možna je celo odpoved jeter (14, 15).

Biološka uporabnost valprojske kisline je skoraj 100 % za vse farmacevtske oblike (peroralne, intravenske, rektalne). V 90 % se veže na plazemske proteine, s čimer lahko vpliva na ostala zdravila, ki se ravno tako vežejo na proteine in poveča njihovo prosto frakcijo, prav tako pa se z večanjem plazemske koncentracije VPA povečuje tudi delež njene proste frakcije v plazmi. Njen razpolovni čas v serumu je precej variabilen (11-20h), v primeru kombinacije z drugimi PEU pa se ta še precej skrajša. VPA se hitro in skoraj v celoti presnavlja preko jeter po kinetiki 1. reda, le v majhnem deležu pa se izloči z urinom v nespremenjeni obliki. Presnova poteka po več poteh, večinoma preko β in ω – oksidacije in konjugacije z glukuronsko kislino. Farmakološko najbolj aktivna presnovka sta 2-en in 4-en valprojska kislina. Zaradi precejšnjih razlik v presnovi VPA med posamezniki, je povezava med odmerkom in plazemsko koncentracijo VPA slaba, zato je terapevtsko spremljanje valprojske kisline pri bolnikih, še posebej tistih, ki hkrati prejemajo še induktorje encimov, nujno (16, 17).



Slika 2. Valprojska kislina

1.2.2 PEU NOVEJŠE (DRUGE) GENERACIJE

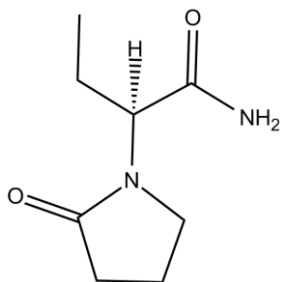
Med predstavnike novejšje generacije PEU spadajo felbamat, gabapentin, lamotrigin, levetiracetam, okskarbazepin, pregabalin, tiagabin, topiramam, vigabatrin in zonisamid (18). Imajo podoben mehanizem delovanja kot PEU starejše generacije, torej zmanjšanje vzdraženosti membran preko blokade napetostno odvisnih Na⁺ kanalčkov (lamotrigin,

topiramata, zonisamida) oziroma inhibicije T-tipa Ca^{2+} kanalčkov (gabapentin, levetiracetam, pregabalin, zonisamid) ter ojačanje inhibitornega učinka GABA (tiagabin, vigabatrin), poleg tega pa delujejo tudi na glutamatni sistem, in sicer preko blokade receptorjev za glutamat (felbamat in verjetno tudi topiramata) ali pa inhibicije sproščanja glutamata (lamotrigin in verjetno tudi levetiracetam). Bolniki jih lažje prenašajo, saj imajo manj neželenih učinkov, manjši vpliv na presnovo drugih zdravil, se v manjši meri vežejo na plazemske proteine ter v večji meri izločajo skozi ledvice kot predstavniki starejše generacije, hkrati pa naj bi bila njihova učinkovitost primerljiva s starejšimi PEU (19,20).

1.2.2.1 *Levetiracetam*

Levetiracetam (LEV; **Slika 3**) se zaradi ugodne kinetike precej uporablja v politerapiji in je učinkovit pri zdravljenju trdovratnih žariščnih in generaliziranih napadov, vključno s preprečevanjem miokloničnih napadov in absenc (19). Njegov mehanizem delovanja še vedno ni povsem razjasnjen, vendar se predvideva, da je drugačen kot pri ostalih PEU. Z vezavo na sinaptični vezikularni glikoprotein SV2A naj bi motil obnavljanje sinaptičnih veziklov in sproščanje ekscitatornega živčnega prenašalca glutamata ter tako preprečeval začetek epileptičnih napadov (5, 21). Deloval pa naj bi tudi preko blokade N-tipa Ca^{2+} kanalčkov in modulacije GABA_A receptorja. Neželeni učinki so redki, najpogosteje se pojavita zaspanost in omotica, možne so tudi motnje razpoloženja, glavobol in hujšanje (19, 22).

LEV se po peroralni aplikaciji hitro in skoraj 100 % absorbira iz prebavnega trakta. Na plazemske beljakovine se veže v majhni meri (manj kot 10 %), tudi presnova je minimalna, zato ne vstopa v interakcije na metaboličnem nivoju z ostalimi učinkovinami. Je zelo dobro topen v vodi in izkazuje linearni farmakokinetični profil, zato je koncentracijo LEV v plazmi mogoče predvideti na podlagi zaužitega odmerka. Glavna presnovna pot je encimska hidroliza do neaktivnih presnovkov (27 % odmerka), ki se skupaj z nespremenjeno obliko (66 %) izločajo z urinom (12, 13).

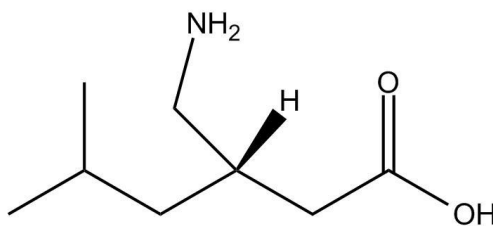


Slika 3. Levetiracetam

1.2.2.2 Pregabalin

Pregabalin (PGB; **Slika 4**) se uporablja predvsem kot dodatno zdravilo pri žariščnih epileptičnih napadih, posebej kadar so ostale kombinacije neučinkovite. Učinkovit pa je tudi pri nevropatski bolečini in kot anksiolitik. Kljub temu, da je analog GABA, nima vpliva na njene receptorje in na prevzem ali razgradnjo GABA, pač pa preprečuje epileptične napade preko vezave na $\alpha 2\delta$ podenoto napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalčkov in tako zmanjša sproščanje živčnih prenašalcev in aktivnost nevronov. Neželeni učinki so redki, vključujejo pa omotico, utrujenost, zmedenost, zamegljen vid, motnje koordinacije, ataksijo, povečanje telesne mase, edeme, erektilno disfunkcijo... (19, 23, 24).

PGB se hitro in v veliki meri (~ 90 %) absorbira iz gastrointestinalnega trakta. Ima linearni farmakokinetični profil in se ne veže na plazemske proteine. Presnavlja se ga manj kot 2 %, zato na osnovi metabolizma ne vstopa v interakcije z drugimi učinkovinami. V 98 % se izloči v nepremenjeni obliki skozi ledvice (13, 25).

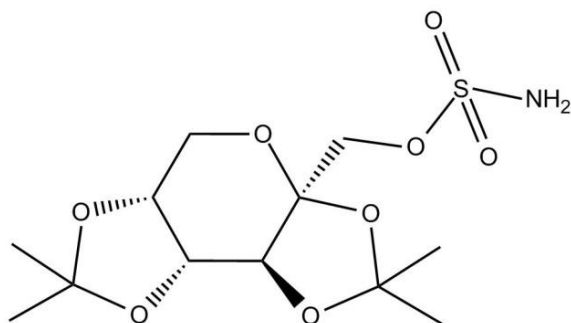


Slika 4. Pregabalin

1.2.2.3 Topiramát

Topiramát (TPM; **Slika 5**) spada med širokospektralne protiepileptične učinkovine, učinkovit je pri preprečevanju žariščnih napadov, generaliziranih tonično-kloničnih in miokloničnih napadov. Uporablja se tudi kot začetno zdravilo pri novo odkriti epilepsiji ter pri zdravljenju rezistentnih oblik epilepsije. Poleg tega pa je uporaben pri napadih, povezanih z Lennox-Gastautovim sindromom in pri preprečevanju migrenskih glavobolov (19). Njegov mehanizem delovanja ni še dokončno raziskan, vendar se predvideva, da deluje na več tarč, in sicer kot inhibitor Na^+ in L-tipa Ca^{2+} kanalčkov, povečeval pa naj tudi delovanje GABA ter blokiral AMPA receptorje in tako oviral ekscitatorni učinek glutamata. Poleg tega je šibak inhibitor encima karboanhidraza (9, 5). Neželeni učinki TPM vključujejo zaspanost, omotico, upočasnjeno psihomotoriko, ataksijo, glavkom, kognitivne spremembe, upad telesne mase, povečano tveganje za nastanek ledvičnih kamnov, poleg tega pa je tudi teratogen (19).

TPM se hitro absorbira iz prebavnega trakta, njegova biološka uporabnost pa je visoka (81-90 %). Na plazemske proteine se veže v manjši meri (cca 15 % odmerka) in izkazuje linearni farmakokinetični profil. Večina se ga izloči skozi ledvice v nespremenjeni obliki (70-80 %), v prisotnosti induktorjev encimov pa se metabolizem TPM v jetrih poveča (do 50 %), nobeden od presnovkov pa nima protiepileptičnega delovanja. (5, 13).



Slika 5. Topiramat

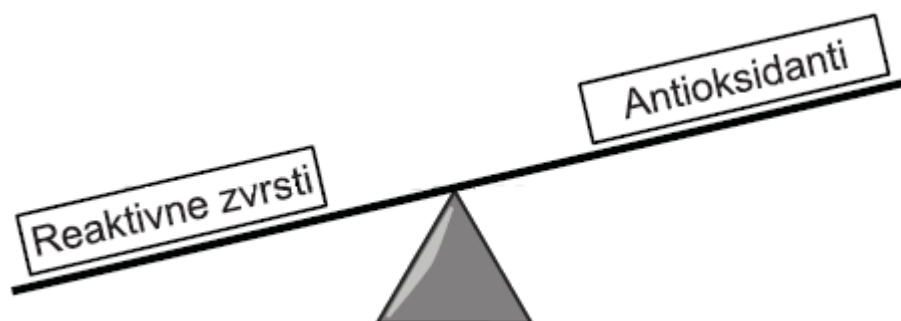
1.2.3 PEU TRETJE GENERACIJE

Kljub znanstvenemu napredku pri razumevanju patofizioloških procesov, povezanih s sprožitvijo in širjenjem epileptičnih napadov v možganih ter kljub velikemu številu PEU prve in druge generacije, ki so na voljo na trgu, se še vedno približno 30 % bolnikov z epilepsijo ne odziva na zdravljenje s trenutno dostopnimi PEU. Za te bolnike je trenutno naustreznejša terapevtska možnost kombinacija dveh ali več PEU, operativno zdravljenje, ketogena dieta, uživanje vitamina B₆ ali pa uvedba protiepileptičnih učinkovin tretje generacije (26, 27). Tako so v zadnjih letih farmacevtske družbe s pomočjo strukturne modifikacije obstoječih PEU in rešetanjem številnih drugih kemičnih substanc razvile približno 20 novih PEU, med katere spadajo: brivaracetam, eslikarbazepin, fluorofelbamat, fosfenitoin, ganaxolon, karabersat, karisbamat, lakozamid, losigamon, remacemid, retigabin, rufinamid, safinamid, seletracetam, soretolid, stiripentol, talampanel, valroceamid in DP-valprojska kislina. Njihov namen je bil izdelati učinkovitejša zdravila z manj neželenimi učinki in manj interakcij z drugimi zdravili, ki bi delovala tudi na samo epileptogenezu in ne samo na nastanek epileptičnih napadov. Nekatera izmed njih so že na trgu, tudi v Sloveniji, medtem ko jih je precej še v fazi kliničnih raziskav (23).

1.3 EPILEPSIJA IN OKSIDATIVNI STRES

1.3.1 OKSIDATIVNI STRES IN NJEGOVA VLOGA V EPILEPTOGENEZI

Oksidativni stres je vsako stanje v celici ali tkivu, kjer začnejo prevladovati oksidativni procesi, predvsem nenadzorovane eno elektronske oksidacije, s čimer se poruši prvotno in z antioksidanti nadzorovano ravnotežje med oksidacijami in redukcijami (**Slika 6**). Lahko je posledica povečane količine reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (ROS/RNS), ki preseže količino endogenih antioksidantov in njihovo sposobnost popravljanja oksidativnih obremenitev ali pa posledica zmanjšane količine endogenih antioksidantov, ki zaradi tega ne zmore onesposobiti normalne količine ROS/RNS v celici (28).



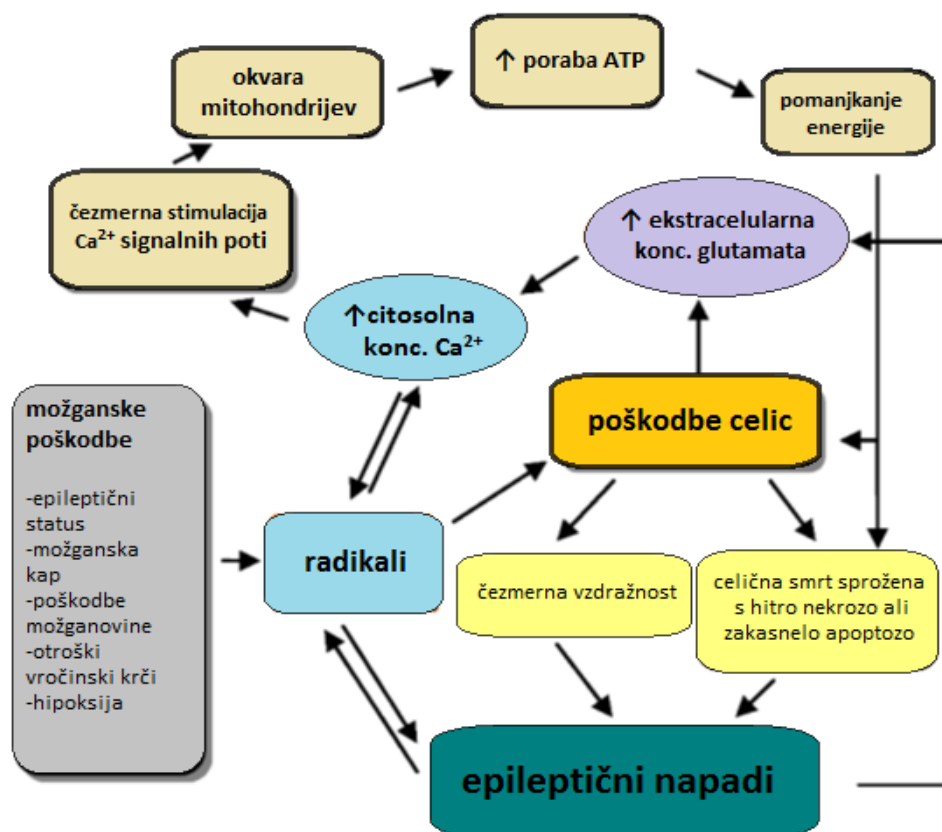
Slika 6. Oksidativni stres je porušeno dinamično ravnotežje med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno zaščito. Precejšen porast spontanah oksidacij vodi v oksidativne poškodbe celic (29).

Eden izmed ključnih dejavnikov, ki sodelujejo pri nastanku oksidativnega stresa v CZS, naj bi bil glutamat, ki deluje kot glavni ekscitatorni živčni prenašalec v centralnem živčnem sistemu in bi lahko, zlasti v višjih koncentracijah, deloval ekscitotoksično (30). Kot posledica povečane tvorbe ROS se pojavi povišana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , ki se nato kaže v nevropastičnih spremembah, kot tudi v smrti živčnih celic, ki je inducirana z epileptičnimi napadi, bodisi preko nekroze ali apoptoze (31). Povišana koncentracija znotrajceličnega Ca^{2+} , ki je prisotna tudi v kronični fazi epilepsije in je zato ključnega pomena za ponovitve epileptičnih napadov, lahko vpliva na obnovitev GABA_A receptorja in s tem na spremenjeno vzdraženost nevronov (32). Poleg tega povišana količina znotrajceličnega Ca^{2+} vpliva na spremenjeno gensko transkripcijo, izražanje proteinov, nevrogenezo in druge fiziološke celične funkcije (33).

Epileptogeneza je opredeljena kot proces, pri katerem začetna okvara centralnega živčnega sistema vodi k nastopu epileptičnega stanja kot tudi k širjenju dogodkov, ki se pojavijo po uveljavitvi epilepsije in lahko traja leta ali celo desetletja (34). Ta definicija podpira teorijo,

da je zaporedje sprememb, ki sledijo začetni okvari, bistvenega pomena za razvoj epileptičnega stanja (35). Čeprav postopek epileptogeneze še ni dokončno pojasnjen, je predhodno omenjena celična smrt nevronov eden najpomembnejših dejavnikov, ki bi lahko privedli do razvoja epilepsije (36).

Slika 7 prikazuje predlagan mehanizem poškodbe celic in pojava epileptičnih napadov v primeru simptomatske oziroma pridobljene epilepsije.



Slika 7. Shematski prikaz predlaganega mehanizma poškodbe celic in pojava epileptičnih napadov v primeru simptomatske oziroma pridobljene epilepsije (32).

Oksidativni stres je poznan kot temeljni citotoksični mehanizem vpleten v patogenezo številnih bolezni centralnega živčnega sistema. Njegova vloga v nevroloških boleznih je še posebej pomembna, saj so nevroni (celice centralnega živčnega sistema) še posebej občutljivi na oksidativne poškodbe (37). Možgani namreč za svoje delovanje potrebujejo sorazmerno veliko količino kisika, njihov obrambni sistem antioksidantov je relativno slab, hkrati pa vsebujejo še veliko količino nenasičenih maščobnih kislin, ki se lahko oksidirajo. Poleg tega so bogati z železom, ki je sposoben katalizirati radikalne reakcije (38). Radikali,

ki so posledica endogenega redoks neravnovesja, imajo pomembno vlogo pri povzročitvi oksidativnega stresa, celične smrti in posledično poškodbe tkiv. Glavni vir ROS je dihalna veriga, ki poteka v celičnih mitohondrijih (39). ROS lahko povzročijo škodljive učinke na celice preko vpliva na delovanje signalnih poti ali preko povzročitve nespecifičnih oksidativnih poškodb bioloških makromolekul, in sicer lipidov, nukleinskih kislin, proteinov in ogljikovih hidratov, kar končno vodi do celične smrti in upada kognitivnih funkcij (40). V normalnih, fizioloških pogojih endogeni obrambni sistem antioksidantov, ki vključuje encimske (katalaza (CAT), supeksid dizmutaza (SOD), glutation reduktaza (GR) in glutation peroksidaza (GPx) ter neencimske antioksidante (glutation (GSH), vitamin E, vitamin A, vitamin C in β -karoten) uspešno nadzoruje breme reaktivnih snovi in tako ščiti biološke makromolekule pred morebitnimi oksidativnimi poškodbami. Encimski antioksidanti delujejo usklajeno in na različnih mestih presnovne poti reaktivnih snovi preprečijo začetek radikalskih verižnih reakcij, medtem ko neencimski antioksidanti neposredno reagirajo z reaktivnimi snovmi in tako preprečijo širjenje verižnih reakcij (41). Zato lahko vse spremembe v ravnotežju med oksidacijami in redukcijami v korist prooksidantov privedejo do pojava ali ponovitve že vzpostavljenih epileptičnih napadov, preko omenjenih mehanizmov, ki povzročajo nevronske celične smrti.

Da bi potrdili to teorijo, so bile izvedene številne obsežne raziskave na temo vpliva oksidativnega stresa na epilepsijo pri nezdravljenih bolnikih v primerjavi z zdravimi prostovoljci (42-61) ter pri bolnikih, zdravljenimi z različnimi protiepileptičnimi učinkovinami v primerjavi z nezdravljenimi bolniki oziroma zdravimi prostovoljci (62-82).

1.3.2 OKSIDATIVNI STRES PRI NEZDRAVLJENIH BOLNIKI Z EPILEPSIJO

Klinične študije, ki so bile izvedene na nezdravljenih bolnikih z epilepsijo, so pokazale, da sama epilepsija lahko vpliva na endogeno ravnotežje med reaktivnimi zvrstmi in antioksidanti. Večina objavljenih študij je potrdila povišan obseg oksidativnega stresa pri nezdravljenih bolnikih v primerjavi z zdravimi kontrolami, zlasti z določitvijo povišanih vrednosti kazalnikov oksidativnih poškodb bioloških makromolekul. Študije so pokazale povišane vrednosti kazalnikov lipidne peroksidacije (malondialdehid – MDA) (42-47), kazalnikov oksidativnih poškodb proteinov (karbolonilne skupine – PC) (48, 49) ter kazalnikov poškodb nukleinskih kislin (8-hidroksi-2-deoksigvanozin – 8-OHdG) (50). Na drugi strani pa obstaja tudi nekaj študij, ki kažejo na nespremenjene (51-55) ali pa celo znižane vrednosti kazalnikov lipidne peroksidacije (56). Zato so *Martinc et al* leta 2014

izvedli meta analizo zgoraj omenjenih kliničnih študij, ki so proučevale oksidativni stres pri nezdravljenih bolnikih z epilepsijo in tako potrdili pozitivno korelacijo med epilepsijo in kazalniki lipidne peroksidacije (57). Kriterij za vključitev študije v meta analizo je bila primerjava MDA vrednosti pri nezdravljenih bolnikih z epilepsijo in kontrolno skupino zdravih prostovoljcev. Vključitveni kriterij je izpolnjevalo 11 kliničnih študij, katerih povprečna razlika v vrednosti MDA je znašala 0,90 µg/mL (95 % CI 0,35 do 1,46), kar nakazuje na povišano lipidno peroksidacijo pri bolnikih z epilepsijo.

Kljub temu, da obstaja očitna povezava med epilepsijo in označevalci oksidativnih poškodb bioloških makromolekul, pa bi to težko trdili za ostale kazalnike oksidativnega stresa (aktivnosti encimskih antioksidantov (CAT, SOD, GR, GPx), nivo dušikovega oksida (NO), koncentracijo glutationa (GSH)), saj so rezultati iz več objavljenih kliničnih študij v neskladju (58-61).

1.3.3 OKSIDATIVNI STRES PRI BOLNIKI Z EPILEPSIJO, ZDRAVLJENIMI Z RAZLIČNIMI PROTIEPILEPTIČNIMI UČINKOVINAMI

Nadalje se je izkazalo, da lahko tudi dolgotrajno zdravljenje s protiepileptičnimi učinkovinami povzroči povišano količino reaktivnih snovi v živčnih celicah in s tem oksidativne poškodbe, ki vodijo v nevrodegeneracijo (62). Poleg tega se veliko predstavnikov starejše generacije PEU v telesu presnavlja do reaktivnih presnovkov, ki lahko tvorijo kovalentne vezi z biološkimi makromolekulami (63). PEU torej lahko, poleg svojega glavnega učinka, tj. zmanjševanja pojavnosti epileptičnih napadov, povzročijo sistemsko toksičnost, bodisi posredno preko tvorbe ROS ali neposredno z vezavo na biološke makromolekule (52, 64-66). Zato so ugotovitve, ki nam pojasnjujejo v kolikšni meri PEU vplivajo na oksidativni stres, izrednega pomena. Številne klinične študije poročajo o povišani vrednosti MDA pri bolnikih, ki so se zdravili z valprojsko kislino (42, 45, 54, 55, 56, 67, 68), medtem ko se pri bolnikih, ki so se zdravili s karbamazepinom, vrednosti MDA med seboj precej razlikujejo (42, 44, 45, 67, 69, 70). Zato so tudi v tem primeru *Martinc et al* izvedli meta analizo, ki potrjuje rezultate kliničnih študij in sicer je analiza pokazala statistično signifikantno povišane vrednosti kazalnikov lipidne peroksidacije v primeru bolnikov, ki so se zdravili z VPA v primerjavi s kontrolno skupino nezdravljenih bolnikov z epilepsijo (povprečna razlika vrednosti MDA je znašala 1,07 µg/mL (95 % CI 0,51 do 1,63)), medtem ko ni bilo opažene statistično pomembne spremembe v primeru zdravljenja s CBZ (povprečna razlika vrednosti MDA je znašala 0,13 µg/mL (95 % CI -0,35 do 0,61)). Izbirni

kriterij za vključitev študije je bila prisotnost skupine bolnikov z epilepsijo, ki se je zdravila z VPA oziroma CBZ ter kontrolne skupine nezdravljenih bolnikov z epilepsijo. V primeru VPA je pogojem ustrezalo 6 študij, v primeru CBZ pa 7 študij (57).

Poleg VPA in CBZ, so povečano lipidno peroksidacijo študije potrdile tudi v primeru jemanja nekaterih drugih aromatskih protiepileptičnih učinkovin, na primer fenobarbitala (52) in fenitoina (70, 71), kateri oksidativni stres izzovejo bodisi sami ali preko presnovkov. Predpostavlja se, da naj bi bila povečana produkcija reaktivnih snovi lahko vzrok tudi za številne neželene učinke PEU (predvsem predstavnikov starejše generacije) in celo morebiten neuspešen nadzor nad epileptičnimi napadi.

Velika pomanjkljivost omenjenih študij pa je v tem, da je večina objavljenih kliničnih študij, ki je preučevala vpliv različnih protiepileptičnih učinkovin na oksidativni stres, vključevala le predstavnike starejše generacije PEU. Kljub temu, da je o učinku novejših PEU na voljo malo podatkov, obstoječe klinične študije v splošnem nakazujejo, da naj bi predstavniki novejše generacije PEU kazali boljši oksidativni profil ter povzročali manj neželenih učinkov. Študije na okskarbazepinu (54, 72), topiramatu (68) in lamotriginu (71) so pokazale zmanjšano lipidno peroksidacijo v primerjavi z nezdravljenimi bolniki z epilepsijo oziroma zdravimi kontrolami. Po drugi strani pa so študije, izvedene na bolnikih, ki so se zdravili z levetiracetamom, pokazale povišano vrednost kazalnikov lipidne peroksidacije (73) ter povišano koncentracijo 8-OHdG (74) v primerjavi z nezdravljenimi bolniki. Poleg kliničnih študij na bolnikih z epilepsijo, so tudi raziskave na eksperimentalnih modelih, na katerih so preučevali novejše predstavnike PEU, pokazale značilno povečano aktivnost encimskih antioksidantov in nivo GSH ter znižano lipidno peroksidacijo v primeru zdravljenja z levetiracetamom (75, 76), pregabalinom (77) in topiramatom (78-81). Nekatere izmed njih, recimo TPM, naj bi izkazovale celo neposredne antioksidativne lastnosti, na podlagi katerih bi lahko pojasnili njihove nevroprotektivne učinke (81,82).

2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen magistrske naloge je proučevanje vpliva zdravljenja s protiepileptičnimi učinkovinami prve in druge generacije na obseg oksidativnega stresa pri bolnikih z epilepsijo in primerjava z zdravimi prostovoljci.

Zaradi izjemno visoke reaktivnosti radikalov, določanje dejanskega stanja oksidativnega stresa v organizmu ni enostavno, hkrati pa obstaja kar precej metod za določevanje parametrov, ki opredeljujejo oksidativno stanje v telesu. Zato se bomo v magistrski nalogi osredotočili na označevalce sposobnosti obrambe organizma pred oksidativnimi poškodbami in sicer bomo spektrofotometrično določali aktivnosti encimskih antioksidantov: CAT, SOD, GR in GPx.

Skupina bolnikov bo zajemala tiste, ki so se zdravili s PEU starejše generacije (karbamazepin, valprojska kislina), PEU novejše generacije (levetiracetam, topiramata ali pregabalin) ter politerapijo (predvsem kombinacija PEU starejše ter novejše generacije). Takšen načrt raziskave bo omogočal proučevanje morebitnih razlik v vplivu na aktivnosti encimskih antioksidantov med predstavniki starejše in novejše generacije protiepileptičnih učinkovin.

S pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) bomo pomerili tudi koncentracije omenjenih protiepileptičnih učinkovin in njihovih presnovkov v plazmi bolnikov ter preverili, če obstaja povezava med plazemsko koncentracijo PEU in presnovkov z aktivnostjo encimskih antioksidantov.

Hipoteze:

- Zdravljenje s protiepileptičnimi učinkovinami pri bolnikih z epilepsijo povzroča višje aktivnosti encimskih antioksidantov v primerjavi s kontrolno skupino.
- Zdravljenje s predstavniki starejše generacije PEU povzroča višje aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih kot zdravljenje s predstavniki novejše generacije PEU.
- Zdravljenje s kombinacijo PEU starejše in novejše generacije povzroča višje aktivnosti encimskih antioksidantov kot zdravljenje s predstavniki novejše generacije.
- Delovanje endogenih encimskih antioksidantov je medsebojno usklajeno.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Preglednica I. Uporabljen biološki material.

BIOLOŠKI MATERIAL
Humana plazma (antikoagulant EDTA) , pridobljena na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana.

Preglednica II. Uporabljeni standardi.

STANDARD	PROIZVAJALEC
7-kloro-4-nitrobenzofurazan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Adenozin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Bendroflumetiazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Karbamazepin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Karbamazepin-10-11-epoksid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Kloramfenikol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Levetiracetam	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
Natrijev valproat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
p-fluoro-DL-fenilalanin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Pentanojska kislina	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Pregabalin	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
Topiramet	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
4-en valprojska kislina	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Nemčija

Preglednica III. Uporabljeni reagenti in topila.

REAGENTI, TOPILA	PROIZVAJALEC
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)	Apollo Scientific, Stockport, Anglija
2 M amonijak NH₃ (v metanolu)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
30 % vodikov peroksid H₂O₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
4-(aminometil)-7-metoksi-kumarin	sintetiziran na Fakulteti za farmacijo
70 % etanol C₂H₅OH	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Acetonitril C₂H₃N	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Borna kislina H₃BO₃	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Diklorometan CH₂Cl₂	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija

Fosforna kislina H₃PO₄	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Hidroksibenzotriazol (HOBt)	Acros, Geel, Belgija
Kalijev dihidrogen fosfat KH₂PO₄	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Klorovodikova kislina HCl - Titrisol	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Komercialna metoda Glutathione Reductase	RANDOX Laboratories Ltd, Crumlin, Združeno kraljestvo
Komercialna metoda Ransel	RANDOX Laboratories Ltd, Crumlin, Združeno kraljestvo
Komercialna metoda Ransod	RANDOX Laboratories Ltd, Crumlin, Združeno kraljestvo
Metanol CH₃OH	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Mravljična kislina HCOOH	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Na₂HPO₄·2H₂O	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Natrijev hidroksid NaOH - Titrisol	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Prečiščena voda	pridobljena na Fakulteti za farmacijo
Puferske raztopine pH=2, pH=3, pH=4, pH=5 in pH=6	Kefolab, Ljubljana, Slovenija
Ultračista voda, pridobljena z aparatom Milli Q – Advantage A10	Millipore Corp., Billerica, MA

Preglednica IV. Uporabljena laboratorijska oprema.

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Centrifuga 5415 R	Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija
Centrifugirke	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Grelnik in stresalnik VORTEMP 56 EVC	Tehtnica; Železniki, Slovenija
Hladilnik (+5°C)	LTH; Škofja Loka, Slovenija
HPLC sistem Agilent Series 1100 z UV in FLD detektorjem	Agilent technologies, Santa Carla, Kalifornija, Združene države Amerike
HPLC kolona: Luna Phenyl-Hexyl 150 × 4,6 mm 5 μm	Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike
HPLC kolona: Synergi Hydro RP 250 x 4,6 mm 4 μm	Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike
HPLC kolona: Synergi Eclipse plus C18 150 x 4,6 mm 5 μm	Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike
HPLC predkolona: Security Guard C18 4x3 mm	Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike
HPLC predkolona: Gemini C18 5 μm	Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA
Inserti za viale	Machrey-Nagel; Düren, Nemčija
Magnetno mešalo HI 190M	Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska

Mešalnik Vibromix 114EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrotitrne ploščice	TPP; Trasadingen, Švica
Mikrotitrski čitalec UV-VIS	Tecan, Genios; Zürich, Švica
Multikanalna pipeta (300 µL)	Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija
pH meter	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Pipetni nastavki	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Plastične epruvete (1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Polavtomatske pipete (2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija
Sistem za filtriranje mobilne faze: vodna črpalka, erlenmajerica, stekleni lij, gumijast zamašek, prižema, filter mrežica, filter papir (celulozno acetatni filter, pore 0,45 µm; Sartorius)	
SPE aparatura	Machery -Nagel, Düren, Nemčija
SPE kolona: Strata-X-C 33u Polymeric Strong Cation 60 mg/3mL	Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike
Steklovina: čaše, čolnički za tehtanje, epruvete, merilne bučke, merilni valji, viala...	
Škatle za zamrzovanje vzorcev	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Tehtnica AG 245	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Tehtnica H 54 AR	Mettler, Greifensee, Švica
TurboVap® LV	Caliper, Hopkinton-MA, ZDA
Ultrazvočna kadička: Sonis 4	Iskra; Kranj, Slovenija
Vodna kopel	Memmert; Schwabach, Nemčija
Zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje; Velenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80°C)	Forma Scientific; Midland, ON, Kanada Sanyo Electric Co., Ltd.; Japonska

3.2 BOLNIKI IN KONTROLNA SKUPINA

V raziskavo je bilo vključenih 49 bolnikov z idiopatsko epilepsijo s Kliničnega oddelka za bolezni živčevja (KOBŽ), Nevrološke klinike, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, ki so se zdravili z eno od protiepileptičnih učinkovin starejše (karbamazepin, valprojska kislina) ali novejše generacije (levetiracetam, pregabalin in topiramat). Za kontrolno skupino je služilo 14 zdravih odraslih demografsko primerljivih prostovoljcev. Klinično raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (štev. 152/06/10). Osnovni demografski in klinični podatki bolnikov z epilepsijo in kontrolne skupine so prikazani v **preglednici V**.

Preglednica V. Demografski in klinični podatki bolnikov z epilepsijo in kontrolne skupine

Demografski in klinični dejavniki		Vsi bolniki (n = 49)	Monoterapija (n = 21)		Politerapija (n = 28)	Kontrolna skupina (n = 14)
			Starejše PEU (n = 9)	Novejše PEU (n = 12)		
Starost (leta)		40,7 (± 13,4)	42,8 (± 12,9)	42,8 (± 15,3)	38,6 (± 12,3)	41,1 (± 12,7)
Spol	Moški (n, %)	29 (59 %)	5 (56 %)	7 (58 %)	17 (61 %)	7 (50 %)
	Ženske (n, %)	20 (41 %)	4 (44 %)	5 (42 %)	11 (39 %)	7 (50 %)
Telesna masa (kg)		71,6 (± 17,0)	73,8 (± 13,3)	68,7 (± 14,7)	72,4 (± 19,5)	72,1 (± 11,3)
ITM (kg/m ²)		24,4 (± 4,4)	25,4 (± 3,6)	23,2 (± 3,4)	24,6 (± 5,1)	24,5 (± 2,9)
Trajanje bolezni (leta)		19,7 (± 12,3)	25,0 (± 14,3)	11,9 (± 6,7)	21,3 (± 12,0)	/
Pogostost napadov (št. napadov/mesec)		6,5 (0-120)	0,6 (0-5)	3,4 (0-30)	9,8 (0-120)	/

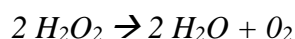
Po seznanitvi z raziskavo in podpisu informiranega pristanka so bili bolnikom odvzeti vzorci krvi (20 mL) za določanje plazemskih koncentracij protiepileptičnih učinkovin in klinično-biokemijske preiskave. Za določanje aktivnosti encimskih antioksidantov smo vzeli kri s heparinom in sicer smo aktivnosti GPx določali v polni krvi, aktivnosti CAT, SOD in GR pa v krvnih celicah. Za pripravo eritrocitov smo najprej kri centrifugirali 10 minut na 3000 obrt/min in odstranili plazmo. Za določanje CAT in SOD smo nato eritrocite štirikrat spirali z 0,9 % raztopino NaCl in ponovno centrifugirali 10 minut na 3000 obrt/min po vsakem spiranju, za določanje GR pa smo eritrocite spirali trikrat. Postopek je skladen z navodili proizvajalca kitov, ki smo jih uporabili za merjenje aktivnosti encimov. Vzorce polne krvi in eritrocitov smo nato shranili na -80°C do meritev.

Za določanje plazemskih koncentracij protiepileptičnih učinkovin smo kri z EDTA centrifugirali 10 minut na 3000 obrt/min in plazmo shranili na -80°C do meritev.

3.3 METODE

3.3.1 DOLOČANJE AKTIVNOSTI ENDOGENIH ENCIMSKIH ANTIOKSIDANTOV

3.3.1.1 Katalaza



Metoda po Aebiju temelji na določanju encimske aktivnosti katalaze, ki razgrajuje vodikov peroksid (83). V eritrocitih se nahaja različna vsebnost CAT, vsem vzorcem pa dodamo standardni dodatek H₂O₂. Pri valovni dolžini 240 nm kinetično spremljamo padec absorbance H₂O₂ s časom. Absorbanco pomerimo vsakih 30 sekund 7-krat zaporedoma. Iz

naklona krivulje absorbance pri 240 nm kot funkcije časa izračunamo aktivnost CAT v vzorcu. Rezultat podamo kot aktivnost CAT na mL vzorca [U/mL], kjer je U enota za encimsko aktivnost, ki ustreza razgradnji 1 μmol substrata na minuto.

PRIPRAVA REAGENTOV

50 mM fosfatni pufer: V 250 mL vode smo raztopili 1,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 681 mg KH_2PO_4 , nato uravnali pH na 7,0.

15 mM H_2O_2 : 170 μL 30 % H_2O_2 smo raztopili v 100 mL 0,05 M fosfatnega pufera.

PRIPRAVA VZORCEV

Po odtalitvi vzorcev smo lizat eritrocitov pripravili tako, da smo 10 μL vzorca eritrocitov resuspendirali v hladni ultračisti vodi do 2,0 mL.

MERITEV

5 μL lizata eritrocitov smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščico in dodali 300 μL H_2O_2 . Padec absorbance H_2O_2 smo kinetično merili pri valovni dolžini 240 nm.

IZRAČUN

Aktivnost glutation peroksidaze izračunamo iz naslednje enačbe:

Enačba 1. Izračun aktivnosti katalaze.

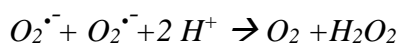
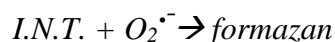
$$\text{Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) * 1000 * V_{\text{celokupni}} (ml)}{43,6 * V_{\text{lizata}} (ml)} * 200$$

ΔA_{vz} : sprememba absorbance H_2O_2 na minuto v vzorcu; ΔA_{sl} : sprememba absorbance H_2O_2 na minuto v slepem vzorcu.

Rezultat podamo kot aktivnost CAT na mL vzorca [U/mL] (84).

3.3.1.2 Superoksid dismutaza

Vloga SOD je pretvorba superoksidnega radikala $\text{O}_2^{\cdot-}$ v vodikov peroksid in molekularni kisik. Pri uporabljeni metodi smo za tvorbo $\text{O}_2^{\cdot-}$ uporabili ksantin in ksantinsko oksidazo, nastali $\text{O}_2^{\cdot-}$ pa je nato reagiral z I.N.T. (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid) do vijolčnega barvila formazan. Aktivnost SOD se nato meri kot odstotek inhibicije te reakcije. Ena enota aktivnosti SOD namreč povzroči 50 % inhibicijo hitrosti redukcije I.N.T. pri reakcijskih pogojih.



PRIPRAVA REAGENTOV IN STANDARDOV

Reagente in standarde smo pripravili po navodilih kita Randox Ransod (85). Vialo s substratom R1a (ksantin in I.N.T.) smo dopolnili z 20 mL pufru R1b. Ksantin oksidazo smo raztopili v 10 mL vode. Standard smo rekonstituirali z 10 mL vode (koncentracija 5,24 U/mL), nato pa ga redčili po navodilih proizvajalca z redčitvenim topilom (**preglednica VI**):

Preglednica VI. Priprava standardov SOD

standard	volumen dodanega standarda	volumen redčitvenega reagenta	koncentracija standarda (U/mL)
S6	neredčen standard	-	5,24
S5	50 μ L S6	50 μ L	2,62
S4	50 μ L S5	50 μ L	1,31
S3	50 μ L S4	50 μ L	0,655
S2	30 μ L S3	60 μ L	0,218
S1	redčitveni reagent (slepa)	-	0

PRIPRAVA VZORCEV

Po odtalitvi vzorcev smo lizat eritrocitov pripravili tako, da smo 250 μ L vzorca eritrocitov resuspendirali v hladni ultračisti vodi do 2,0 mL in pustili na ledu 15 minut. Lizat smo nato 25-krat redčili z 0,01 mol/L fosfatnim pufrom (pH 7,0).

MERITEV

Na mikrotitrsko ploščico smo pipetirali 5 μ L razredčenega standarda ali vzorca in mu nato dodali 170 μ L substrata. Tik pred pričetkom meritve smo dodali še 25 μ L ksantin oksidaze in kinetično merili padec absorbance formazana pri 505 nm vsakih 30 sekund 7-krat zapored. Rezultat podamo kot aktivnost SOD na mL vzorca [U/mL].

IZRAČUN

Najprej podamo spremembo absorbance v prvih treh minutah merjenja preko enačbe 2 za vzorce, standarde in slepo:

Enačba 2. Sprememba absorbance formazana v prvih treh minutah merjenja.

$$\Delta A = \frac{A2 - A1}{3}$$

ΔA : sprememba absorbance formazana na minuto; $A2$: absorbanca formazana po treh minutah merjenja; $A1$: absorbanca formazana ob začetku merjenja.

Zatem izračunamo odstotek inhibicije, ki ga k tvorbi formazana prispeva SOD (izračunamo za standarde in vzorce):

Enačba 3. Določanje % inhibicije nastajanja formazana.

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - \frac{\Delta A * 100}{\Delta A \text{ slepa}}$$

ΔA: sprememba absorbance formazana na minuto v vzorcu ali standardu; ΔA slepa: sprememba absorbance formazana na minuto v slepem vzorcu.

Iz logaritmskih vrednosti koncentracij standardov in vrednosti odstotkov inhibicije izračunamo umeritveno krivuljo s pomočjo linearne regresije, iz katere nato določimo aktivnost SOD v vzorcih.

3.3.1.3 Glutation reduktaza

Glutation reduktaza katalizira redukcijo oksidirane oblike glutationa (GSSG) v prisotnosti NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfat), ki se oksidira do NADP⁺. Ob tem merimo padec absorbance NADPH s časom pri valovni dolžini 340 nm.



GSH: reducirana oblika glutationa; NADPH: reducirana oblika; NADP⁺: oksidirana oblika NADP

PRIPRAVA REAGENTOV

Reagente smo pripravili po navodilih kita Randox Glutathione Reductase (86). Vsebino vial s substratom (GSSG) smo dopolnili s 5 mL pufru (kalijev fosfat in EDTA). Vsebino vial z NADPH smo dopolnili s 3 mL ultračiste vode.

PRIPRAVA VZORCEV

Po odtalitvi vzorcev smo lizat eritrocitov pripravili tako, da smo 250 μL vzorca eritrocitov resuspendirali v hladni ultračisti vodi do 0,5 mL in pustili na ledu 10 minut. Sledilo je centrifugiranje 5 minut na 2000 obrt/min. 100 μL supernatanta smo nato razredčili z 1,9 mL 0,9 % raztopino NaCl.

MERITEV

Na mikrotitrsko ploščico smo pipetirali 8 μL vzorca in mu nato dodali 200 μL substrata. Tik pred pričetkom meritve smo dodali še 40 μL NADPH in kinetično merili padec absorbance NADPH pri 340 nm vsakih 30 sekund 10-krat zapored.

IZRAČUN

Aktivnost glutacion reduktaze izračunamo iz naslednje enačbe:

Enačba 4. Izračun aktivnosti glutacion reduktaze.

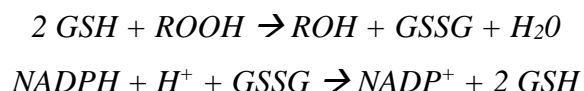
$$U/L = 4983 \times \Delta A \text{ 340 nm/min} \times 20 \text{ (faktor redčenja)}$$

ΔA: padec absorbance NADPH

Rezultat podamo kot aktivnost GR na liter vzorca [U/L].

3.3.1.4 *Glutation peroksidaza*

Pri uporabljeni metodi glutacione peroksidaze (GPx) katalizira oksidacijo glutationa (GSH) v prisotnosti kumen hidroperoksida (ROOH). V prisotnosti glutacione reduktaze (GR) in NADPH se oksidirana oblika glutaciona (GSSG) takoj pretvori nazaj v reducirano obliko ob sočasni oksidaciji NADPH v NADP⁺. Ob tem merimo padec absorbance NADPH s časom pri valovni dolžini 340 nm.



PRIPRAVA REAGENTOV

Reagente smo pripravili po navodilih kita Randox Ransel (87). Vialo z reagentom R1a (glutaciona in glutaciona reduktaza) smo dopolnili z 10 mL pufru R1b (fosfatni pufer in EDTA). 10 µL kumen hidroperoksida smo raztopili v 10 mL 0,9 % raztopine NaCl in močno premešali, saj je kumen slabo topen. Vsebinsko vialo z redčitvenim reagentom smo rekonstituirali z 200 mL ultračiste vode. Hemoglobinski reagent smo razredčili z ultračisto vodo v razmerju 1:4.

PRIPRAVA VZORCEV

Po odtalitvi vzorcev smo 10 µL polne heparinske krvi razredčili z 200 µL redčitvenega reagenta in inkubirali 5 minut. Nato smo dodali še 200 µL hemoglobinskega reagenta in premešali na vorteksu.

MERITEV

Na mikrotitrsko ploščico smo pipetirali 5 µL razredčenega vzorca in mu nato dodali 250 µL reagenta R1. Tik pred pričetkom meritve smo dodali še 10 µL kumen hidroperoksida in kinetično merili padec absorbance NADPH pri 340 nm vsakih 30 sekund 7-krat zapored.

IZRAČUN

Aktivnost glutacione peroksidaze izračunamo iz naslednje enačbe:

Enačba 5. Izračun aktivnosti glutacione peroksidaze.

$$U/L \text{ hemolizata} = 8412 \times \Delta A_{340 \text{ nm}/\text{min}} \times 41 \text{ (faktor redčenja)}$$

ΔA: padec absorbance NADPH.

Rezultat podamo kot aktivnost GPx na liter vzorca [U/L].

3.3.2 DOLOČANJE PLAZEMSKÉ KONCENTRACIJE PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN

3.3.2.1 Karbamazepin

PRIPRAVA RAZTOPIN ZA UMERITVENO KRIVULJO

V plastičnih epruveh (2ml) smo pripravili osnovne raztopine standardov CBZ-ja in EpoCBZ-ja za umeritveno krivuljo v koncentraciji 5 mg/mL. Osnovna raztopina internega standarda (IS) kloramfenikola je bila 1 mg/mL. Vse standarde smo raztopili v metanolu. Iz osnovnih raztopin smo z redčenjem pripravili deset raztopin za umeritveno krivuljo s koncentracijami analitov v končnih vzorcih v razponu 0,075 – 40 µg/mL za CBZ in 0,05 – 20 µg/mL za EpoCBZ. Koncentracija kloramfenikola v končnih vzorcih je bila 0,125 mg/mL. Za redčenje smo uporabili mešanico metanola in vode v razmerju 1:1.

PRIPRAVA VZORCEV

Standardne vzorce z znano koncentracijo analitov smo pripravili tako, da smo 250 µL plazme dodali 25 µL razredčene osnovne raztopine učinkovine (zmes CBZ in EpoCBZ) in 25 µL razredčene osnovne raztopine internega standarda. Realne plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo 275 µL bolnikove plazme dodali 25 µL razredčene osnovne raztopine IS. Nato smo vzorce vorteksirali 30 sekund. Iz zamrzovalnika smo dodali 600 µL acetonitrila in vzorce ponovno vorteksirali 30 sekund. Nato smo jih centrifugirali 10 minut pri 4°C in 13100 obrt/min. Odvzeli smo 125 µL supernatanta in ga sušili v centrifugi pod vakuumom približno 90 minut.. Ko so se vzorci posušili, smo ponovno odvzeli 125 µL supernatanta, ki smo ga zopet sušili 90 minut. Posušene vzorce smo rekonstituirali v 40 µL raztopine MeOH:pufer = 80:20 (v/v). Vzorce smo vorteksirali še 1 minuto in analizirali s HPLC. Koncentracijo CBZ in Epo-CBZ v vzorcih smo merili z metodo HPLC pri pogojih, ki so prikazani v preglednici VII (88).

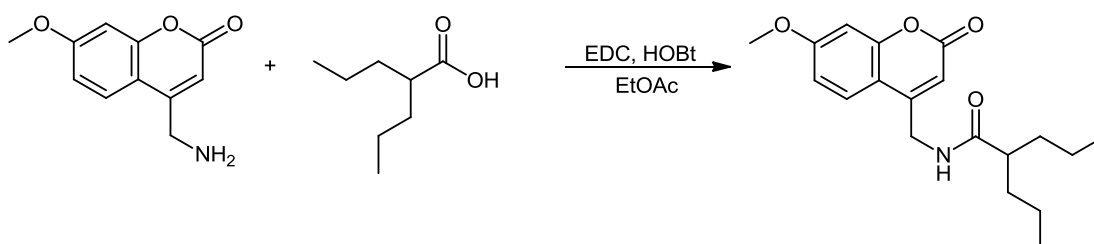
Preglednica VII: HPLC pogoji

	HPLC pogoji
Kolona	Luna 5u Phenyl-Hexyl (150 x 4,6 mm)
Mobilna faza	MeOH:pufer = 50:50
Pufer	25 mM kalijev fosfatni pufer, pH = 3
Temperatura	50°C
Pretok	1 mL/min
Volumen injiciranja	5 µL
Valovna dolžina	215 nm

3.3.2.2 Valprojska kislina

Slika 8 prikazuje derivatizacijo VAL s kumarinom ob prisotnosti reagentov 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC) in hidroksibenzotriazola (HOBt) pri čemer nastane *N*-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)-2-propilpentanamid.

EDC je aktivator valprojske kisline, HOBt pa je pomožni nukleofil.



Slika 8. Reakcijska shema derivatizacije valprojske kisline s kumarinom.

PRIPRAVA RAZTOPIN ZA UMERITVENO KRIVULJO

Natehtali smo približno 8 mg Na-VPA in pripravili vodno raztopino s koncentracijo 4,6 mg/mL, kar ustreza koncentraciji 4,0 mg/mL VAL. Iz osnovne raztopine smo nato pripravili deset raztopin za umeritveno krivuljo s koncentracijami VAL v končnih vzorcih v razponu 2,5 – 200 µg/mL.

1 mg 4-en VPA smo najprej raztopili v mešanici vode in metanola (40/60 v/v) in pripravili osnovno raztopino s koncentracijo 1 mg/mL. Iz te smo nato pripravili osem vodnih raztopin s koncentracijami 4-en VAL v končnih vzorcih v razponu 0,5 – 30 µg/mL.

Za interni standard smo uporabili vodno raztopino pentanojske kisline s koncentracijo 2,3 mmol/L, ki smo jo redčili 2000 krat.

PRIPRAVA VZORCEV

Standardne vzorce z znano koncentracijo analitov smo pripravili tako, da smo v 170 µL plazme dodali 10 µL VAL, 10 µL 4-en VPA in 10 µL IS, pripravljenih po redčitvi osnovnih raztopin. Realne plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo k 190 µL bolnikove plazme dodali 10 µL IS. Sledila je ekstrakcija, kjer smo od predhodno pripravljenih vzorcev odvzeli 50 µL, dodali 200 µL etilacetata in 100 µL 10 mM HCl. Vzorce smo najprej 10 sekund vorteksirali, nakar smo jih prestavili v stresalnik za 5 minut (25°C; 70 obrt/min). Sledilo je ponovno 10 s vorteksiranje in 5 min centrifugiranje na 16000 g pri sobni temperaturi. Kasneje je sledila derivatizacija, kjer smo odvzeli 100 µL organske faze in ji dodali 25 µL kumarin-amina, 25 µL HOBt-a, 100 µL EDC-ja ter 40 µL fosfatnega pufru (pH 7,0) (**Slika 8**). Vzorce smo ponovno vorteksirali 10 s in jih prestavili v stresalnik za 5 min (25°C; 70

obrt/min). Sledilo je ponovno vorteksiranje za 10 s in centrifugiranje za 5 min na 16.000 g pri sobni temperaturi. Sledilo je sušenje, kjer smo odvzeli 25 μL organske faze in jo posušili (40 °C, preprihovanje z dušikom). Posušene vzorce smo rekonstituirali v 150 μL 60 % acetonitrila v vodi (v/v).

KROMATOGRAFSKI POGOJI

Analit smo merili z metodo HPLC in za detekcijo uporabili fluorescenčni detektor. Mobilna faza je bila sestavljena iz 1,5 % raztopine očetne kisline v vodi (faza A) in acetonitrila (faza B) v razmerju faza A/B 55/45 (v/v). Stacionarno fazo je predstavljala kolona Luna C18 150 \times 4,6 mm z delci 5 μm velikosti proizvajalca Phenomenex (ZDA). Pretok mobilne faze je bil 1 mL/min, temperatura kolone pa 55°C. Injicirali smo 5 μL vzorca in ga detektirali pri 330 nm ekscitacijske in 400 nm emisijske valovne dolžine (89).

3.3.2.3 Levetiracetam

PRIPRAVA RAZTOPIN ZA UMERITVENO KRIVULJO

Iz osnovne raztopine LEV (2 mg/mL) smo najprej pripravili standardne vodne raztopine, te pa smo uporabili za pripravo osmih standardnih plazemskih vzorcev levetiracetama v koncentracijskem območju 2 – 134 $\mu\text{g/mL}$. Le-te smo pripravili tako, da smo v 2 mL plastično epruveto odpipetirali 450 μL plazme zdravega preiskovanca (prazna plazma) ter dodali 50 μL ustreznega vodnega standarda levetiracetama in 30 mešali na vorteksu.

PRIPRAVA VZORCEV

Plazemske vzorce smo pred analizo s HPLC analizatorjem pripravili z enostavnim obarjanjem plazemskih proteinov z uporabo ledeno hladnega metanola (-20°C), pri čemer je pomembno zaporedje dodajanja ledeno hladnega MeOH in internega standarda. V 2 mL plastično epruveto smo najprej dodali 500 μL bolnikove plazme in 1450 μL ledeno hladnega MeOH ter 30 s mešali na vorteksu. Nato smo dodali 50 μL IS in ponovno vorteksirali 30 s. Sledilo je centrifugiranje za 20 min na 16000 g pri 4°C. 90 μL supernatanta smo nato prenesli v insert, katerega smo vložili v vialo za HPLC.

KROMATOGRAFSKI POGOJI

Kromatografsko ločbo smo izvajali na koloni Synergi Hydro RP, 250 x 4,6 mm 4 μm (Phenomenex, ZDA), ki je bila termostatirana na 30°C. Na kolono smo injicirali 10 μL vzorcev. Kromatografski spekter smo snemali z UV-detektorjem pri valovni dolžini 205 nm. Mobilna faza je bila sestavljena iz 92 % 50 mM K_2HPO_4 pH 4,5 in 8 % acetonitrila, na kolono smo jo črpali izokratsko s pretokom 1,0 mL/min (90).

3.3.2.4 Pregabalin

PRIPRAVA RAZTOPIN ZA UMERITVENO KRIVULJO

Iz osnovne vodne raztopine pregabalina (5 mg/mL) smo z ustrežno redčitvijo pripravili devet standardnih raztopin za umeritveno krivuljo v koncentracijskem območju 0,375 – 30 µg/mL.

PRIPRAVA VZORCEV

Standardne plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo 500 µL slepe plazme odpipetirali v 2 mL plastično epruveto in dodali 20 µL ustrezne standardne raztopine pregabalina ter 30 µL internega standarda (p-fluoro-DL-fenilalanin) s koncentracijo 0,2 mg/mL. Realne plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo 500 µL bolnikove plazme dodali 20 µL vode ter 30 µL raztopine IS s koncentracijo 0,2 mg/mL. Vzorce smo nato vorteksirali 15 sekund, dodali 1 mL 0,1 M raztopine HCl in ponovno vorteksirali 15 sekund. Plazemske vzorce smo nato ekstrahirali na trdnih nosilcih (SPE) z namenom očiščenja pregabalina od nečistot oziroma komponent, ki so prisotne v plazmi. Potem, ko smo izbrali ustrezno kolono (Strata-X-C 33u Polymeric Strong Cation 60 mg/3mL), je bil SPE postopek sestavljen iz petih korakov:

- **Kondicioniranje trdnega nosilca:** dvakrat po 2 mL metanola (MeOH)
- **Ekvilibracija trdnega nosilca:** dvakrat po 2 mL vode
- **Dodajanje vzorca:** 1,5 mL predhodno pripravljenega plazemskega vzorca
- **Spiranje:** dvakrat po 1 mL 0,1 M HCl, dvakrat po 1 mL 50 mM fosfatnega pufra s pH=5,0 in 1 mL vode
- **Elucija:** 2 mL 2 M NH₃ v MeOH v 2 mL plastične epruvetke.

Sledilo je sušenje vzorca s pomočjo aparature Turbovap, in sicer z dušikom (N₂) pri povišanem tlaku 30 minut in pri konstantni temperaturi 50°C. Temu je sledila derivatizacija vzorca, in sicer smo suhemu vzorcu dodali 100 µL raztopine NBD-Cl s koncentracijo 10 mg/mL, 100 µL mešanice MeOH:acetonitril v razmerju 1:1 (v/v) in 25 µL 250 mM boratnega pufra s pH=10,5. Zmes smo nato vorteksirali 30 sekund in prenesli 200 µL v 1,5 mL plastično epruvetko. Epruvetko smo nato postavili na vodno kopel s temperaturo 60°C, kjer je potekala derivatizacija 15 minut. Sledilo je centrifugiranje vzorca 10 minut pri 16100 g in temperaturi 5°C. Nato smo 140 µL vzorca prenesli v inserte, ki smo jih vstavili v vialo za HPLC.

KROMATOGRAFSKI POGOJI

Kromatografsko ločbo smo izvajali na koloni Eclipse plus C18 150 x 4,6 mm 5 µm (Agilent technologies, ZDA), ki je bila termostatorirana na 45°C. Mobilna faza je bila sestavljena iz 57 % 50 mM K₂HPO₄ pH 4,9 in 43 % metanola, na kolono smo jo črpali izokratsko s pretokom 1,5 mL/min. Vzorec smo detektirali pri 470 nm ekscitacijske in 530 nm emisijske valovne dolžine z ojačitvijo fotopomnoževalke (91):

- 0 – 10,70 min: 9
- 10,71 – 12,40 min: 12
- 12,40 – 21,00 min: 9

3.3.2.5 Topiramata

PRIPRAVA RAZTOPIN ZA UMERITVENO KRIVULJO

Osnovne raztopine topiramata (1 mg/mL) in internega standarda bendroflumetiazida (0,5 mg/mL) smo pripravili z raztapljanjem ustreznih količin v vodi (TPM) in metanolu (IS). Iz osnovne raztopine topiramata smo z redčenjem z vodo pripravili 12 standardnih raztopin za umeritveno krivuljo v koncentracijskem območju 0,01 – 24 µg/mL v končnem vzorcu.

PRIPRAVA VZORCEV

Standardne plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo 500 µL slepe plazme odpipetirali v 2 mL plastično epruveto in dodali 25 µL ustrezne standardne raztopine topiramata in 25 µL raztopine IS (0,5 mg/mL). Plazemske vzorce bolnikov smo pripravili tako, da smo 500 µL bolnikove plazme dodali 25 µL vode ter 25 µL raztopine IS (0,5 mg/mL). Vzorce smo nato nakisali do pH 6,0 z 20 µL 2 % vodne raztopine mravljične kisline in 30 sekund mešali na vorteksu. Po dodatku 1,5 mL diklorometana smo vzorce ponovno 1 minuto vorteksirali in centrifugirali 10 minut na 2300 g pri 5°C. V 1,5 mL plastične epruvetke smo odpipetirali 1,2 mL organske faze in jo sušili na aparaturi Turbovap, in sicer z dušikom (N₂) pri povišanem tlaku 10 minut in pri konstantni temperaturi 50°C. Suhemu ostanku smo dodali 50 µL raztopine NBD-Cl s koncentracijo 6 mg/mL, 50 µL mešanice MeOH:acetonitril v razmerju 1:1 (vol/vol) in 12,5 µL 0,5 M boratnega pufra s pH=10,5. Po mešanju na vorteksu 30 s, smo epruvetko postavili na vodno kopel s temperaturo 60°C, kjer je potekala derivatizacija 15 minut. Sledilo je centrifugiranje vzorca 3 minute pri 16100 g in temperaturi 5°C. NBD-Cl derivate smo nato prenesli v vialo z inserti in analizirali z HPLC.

KROMATOGRAFSKI POGOJI

Kromatografsko ločbo smo izvajali na reverzno-fazni koloni Eclipse plus C18 150 x 4,6 mm 5 μm (Agilent technologies, ZDA) sklopljeni s predkolono Security Guard C18 4x3 mm (Phenomenex, ZDA). Mobilna faza je bila sestavljena iz 61,5 % 50 mM K₂HPO₄ pH 5,5 in 38,5 % acetonitrila, na kolono smo jo črpali izokratsko s pretokom 1,5 mL/min. Temperatura kolone je znašala 45°C, vzorce pa smo hranili v avtomatskem vzorčevalniku pri 4°C. Injicirali smo 15 μL vzorca, fluorescenčni detektor pa je bil nastavljen na 475 nm ekscitacijske in 530 nm emisijske valovne dolžine (92).

3.3.3 OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA

Podatke meritev in izračune smo zbrali in obdelali s programom Microsoft Excel 2010. Uporabili smo ga za izdelavo opisne statistike podatkov. Za prikaz srednje vrednosti zveznih spremenljivk (starost, telesna masa, ITM, trajanje bolezni, aktivnosti encimskih antioksidantov...), smo uporabili aritmetično sredino s standardnim odklonom oziroma aritmetično sredino in razpon (za pogostost epileptičnih napadov, plazemsko koncentracijo PEU). Za prikaz kategoričnih spremenljivk (spol) smo uporabili število in delež.

Statistično analizo smo izvedli s programom IBM Statistical Package for Social Sciences za Windows (verzija 21.0; SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA). Za primerjavo dveh skupin (skupine bolnikov z epilepsijo in kontrolne skupine zdravih prostovoljcev) smo v primeru zveznih spremenljivk uporabili dvosmerni Mann-Whitney-ev U test. Za namen ugotavljanja razlik med več skupinami (bolniki zdravljeni s starejšo generacijo PEU, bolniki zdravljeni z novejšo generacijo PEU, bolniki na politerapiji) smo v primeru zveznih spremenljivk podatke najprej analizirali z uporabo Kruskal-Wallis-ovega testa. Če smo ugotovili statistično značilne razlike, smo za preučitev razlik med posameznimi pari skupin naredili analize z uporabo dvosmernega Mann-Whitney-ovega U testa s korekcijo po Holm-Bonferroniju. Zaporedje testov smo določili glede na generacijo PEU.

Enačba 6. Korekcija po Holm-Bonferroniju.

$$(C - i + 1) \times p \quad C: \text{število testov}; i: \text{zaporedna številka testa}; p: p\text{-vrednost (93)}$$

V primeru kategoričnih spremenljivk (spol) smo za primerjave med skupinami uporabili Hi-kvadrat test. Kot statistični kazalnik za ovrednotenje povezave med dvema zveznima spremenljivkama smo uporabili Spearman-ov koeficient korelacije. Za mejo statistične značilnosti smo pri vseh analizah upoštevali vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Oksidativni stres je poznan kot eden izmed možnih citotoksičnih mehanizmov prisotnih pri epilepsiji. Številne študije so potrdile povišan obseg oksidativnega stresa pri nezdravljenih bolnikih v primerjavi z zdravimi kontrolami, zlasti z določitvijo povišanih vrednosti kazalnikov oksidativnih poškodb bioloških makromolekul (MDA, PC, 8-OHdG...)(57). Poleg tega, da je to proces, ki služi kot osnova za nevrološke poškodbe, lahko oksidativni stres tudi dodatno prispeva k napredovanju epilepsije. Posledica povečanega oksidativnega stresa so namreč motnje v fizioloških signalnih poteh Ca^{2+} , kar se povezuje s povečano tvorbo radikalov, mitohondrijsko disfunkcijo in posledično poškodbo oziroma propadom nevronov, kar lahko služi kot dejavnik, ki pripelje do epileptičnega stanja (94). Vloga oksidativnega stresa pri nevrodegenerativnih boleznih je še posebej pomembna, ker so nevroni, zaradi slabše antioksidativne zaščite v primerjavi z ostalimi tkivi, še posebno občutljivi na škodljive učinke reaktivnih kisikovih (ROS) in dušikovih (RNS) zvrsti ter posledično bolj dovzetni za povišan obseg oksidativnega stresa (95).

Nekatere študije pa poročajo, da naj bi pri epilepsiji dodaten oksidativni stres povzročale celo nekatere protiepileptične učinkovine, zlasti tiste iz prve generacije (57).

Zaradi majhnega števila raziskav, predvsem takih, ki bi proučevale vpliv PEU novejših generacij na obseg oksidativnega stresa pri bolnikih z epilepsijo ter zaradi spodbudnih rezultatov obstoječih študij, smo se odločili, da bomo izvedli klinično študijo na bolnikih z epilepsijo, ki so se zdravili z različnimi PEU, s pomočjo katere bomo preučili vpliv PEU starejše in novejših generacij ter politerapije na obseg oksidativnega stresa ter rezultate primerjali s kontrolno skupino zdravih prostovoljcev.

Magistrska naloga spada v okvir raziskave z naslovom Primerjava oksidativnega stresa pri bolnikih z epilepsijo, zdravljenih s starejšo in novejšo generacijo protiepileptičnih učinkovin, ki jo je v svoji doktorski disertaciji z naslovom Spremljanje zdravljenja epilepsije z zdravili in vloga nekaterih kazalcev oksidativnega stresa opisal dr. Boštjan Martinc (96). Vsi bolniki in zdravi prostovoljci so morali pred vključitvijo v raziskavo podati pisno soglasje. Bolniki so opravili podroben pregled, ki je vključeval demografske podatke, trajanje epilepsije, pogostost epileptičnih napadov in čas od zadnjega napada, prisotnost drugih bolezni, zdravljenje in sočasna uporaba drugih zdravil in prehranskih dopolnil ter morebitno prisotnost sistemskih, nevroloških in redkih preobčutljivostnih neželenih učinkov zdravil. Epileptični bolniki z drugimi kroničnimi boleznimi in motnjami, bolniki, ki so bili

pred kratkim operirani, bolniki s prekomerno telesno maso (ITM > 30) in nosečnice niso bili vključeni v študijo. V študiji smo poleg aktivnosti encimskih antioksidantov (katalaza, superoksid dismutaza, glutation reduktaza in glutation peroksidaza), katerih rezultati so podani v magistrski nalogi, določevali še koncentracije antioksidantov (reducirano in oksidirano obliko glutationa), koncentracije kazalnikov reaktivnih dušikovih spojin (nitrati in nitriti) ter kazalnika lipidne peroksidacije (malondialdehid – MDA) in oksidacije proteinov (proteinski karbonili – PC).

4.1 DEMOGRAFSKI IN KLINIČNI DEJAVNIKI

V raziskavo smo vključili 49 bolnikov z epilepsijo (29 moških, 20 žensk) in 14 zdravih prostovoljcev za kontrolno skupino (7 moških, 7 žensk). Povprečna starost tako bolnikov kot kontrolne skupine je znašala 41 let (**preglednica VIII**). 21 bolnikov z epilepsijo (43 %) se je zdravilo z monoterapijo, 28 bolnikov (57 %) pa s politerapijo. Izmed bolnikov na monoterapiji se jih je 9 (43 %) zdravilo z eno od protiepileptičnih učinkovin starejše generacije (karbamazepin ali valprojska kislina), 12 (57 %) pa z eno od PEU novejše generacije (levetiracetam, pregabalin ali topiramata) (**preglednica XI**).

4.1.1 Demografska primerljivost bolnikov z epilepsijo in kontrolne skupine

Med bolniki z epilepsijo in kontrolno skupino zdravih prostovoljcev ni bilo statistično značilne razlike v starosti ($p = 0,921$), spolu ($p = 0,544$), telesni masi ($p = 0,888$) ali indeksu telesne mase ($p = 0,597$). Na podlagi teh parametrov torej lahko sklepamo, da sta skupini demografsko primerljivi.

Preglednica VIII. Primerjava demografskih dejavnikov bolnikov z epilepsijo in kontrolne skupine

Demografija		Vsi bolniki (n = 49)	Kontrolna skupina (n = 14)	p-vrednost
Starost (leta)		40,8 (± 13,4)	41,1 (± 12,7)	0,921
Spol	Moški (n, %)	29 (59 %)	7 (50 %)	0,544
	Ženske (n, %)	20 (41 %)	7 (50 %)	
Telesna masa (kg)		71,6 (± 17,0)	72,1 (± 11,3)	0,888
ITM (kg/m ²)		24,4 (± 4,4)	24,5 (± 2,9)	0,597

Za prikaz srednje vrednosti zveznih spremenljivk smo uporabili aritmetično sredino s standardnim odklonom oziroma aritmetično sredino in razpon, za prikaz spola pa smo uporabili število in delež.

4.1.2 Primerjava demografskih in kliničnih dejavnikov med skupinami bolnikov

Tudi med skupino bolnikov, zdravljeno s PEU starejše generacije, skupino bolnikov, zdravljeno s PEU novejše generacije in bolniki na politerapiji ni bilo statistično značilne razlike v starosti ($p = 0,647$), spolu ($p = 0,821$), telesni masi ($p = 0,622$) in ITM ($p = 0,453$). Pokazala pa se je statistično značilna razlika med skupinami bolnikov v trajanju epilepsije ($p = 0,037$) in pogostosti napadov ($p = 0,019$).

Preglednica IX. Primerjava demografskih in kliničnih dejavnikov med skupinami bolnikov z epilepsijo

Demografski in klinični dejavniki		Monoterapija (n = 21)		Politerapija (n = 28)	p-vrednost
		Starejše PEU (n = 9)	Novejše PEU (n = 12)		
Starost (leta)		42,8 ($\pm 12,9$)	42,3 ($\pm 15,8$)	39,5 ($\pm 12,8$)	0,647
Spol	Moški (n, %)	5 (56 %)	7 (58 %)	17 (61 %)	0,821
	Ženske (n, %)	4 (44 %)	5 (42 %)	11 (39 %)	
Telesna masa (kg)		73,8 ($\pm 13,3$)	68,7 ($\pm 14,7$)	72,2 ($\pm 19,2$)	0,622
ITM (kg/m^2)		25,4 ($\pm 3,6$)	23,2 ($\pm 3,4$)	24,6 ($\pm 5,0$)	0,453
Trajanje bolezni (leta)		25,3 ($\pm 15,1$)	11,9 ($\pm 6,7$)	21,3 ($\pm 12,0$)	0,037
Pogostost napadov (št. napadov/mesec)		0,6 (0-5)	3,4 (0-30)	9,8 (0-120)	0,019

Za prikaz srednje vrednosti zveznih spremenljivk smo uporabili aritmetično sredino s standardnim odklonom oziroma aritmetično sredino in razpon, za prikaz spola pa smo uporabili število in delež.

Z nadaljnimi analizami smo dokazali, da ni statistično značilne razlike v pogostosti napadov med katerokoli skupino bolnikov ($p_{S/N} = 0,946$, $p_{S/P} = 0,092$, $p_{N/P} = 0,121$) ter v trajanju bolezni med bolniki, zdravljenimi s PEU starejše generacije in bolniki na politerapiji ($p_{S/P} = 0,432$). Pokazala pa se je statistično značilna razlika v trajanju bolezni med skupino bolnikov, zdravljeno s PEU novejše generacije in bolniki, zdravljenimi s PEU starejše generacije ($p_{S/N} = 0,034$) oziroma bolniki na politerapiji ($p_{N/P} = 0,041$) (**preglednica X**).

Preglednica X. Primerjava kliničnih dejavnikov med posameznimi skupinami bolnikov (post hoc analiza)

Klinični dejavniki	p-vrednost		
	$p_{S/N}$	$p_{S/P}$	$p_{N/P}$
Trajanje bolezni (leta)	0,034	0,432	0,041
Pogostost napadov (št. napadov/mesec)	0,946	0,092	0,121

S – PEU starejše generacije, N – PEU novejše generacije, P – politerapija

4.2 ENDOGENI ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI

Za določanje stanja oksidacijskega stresa v organizmu imamo na voljo kar nekaj kazalnikov.

V magistrski nalogi smo se osredotočili na označevalce sposobnosti obrambe organizma pred oksidativnimi poškodbami in sicer smo vsem bolnikom z epilepsijo in zdravim prostovoljcem spektrofotometrično določili aktivnosti encimskih antioksidantov: CAT, SOD, GR in GPx (**preglednice XI – XIV**).

4.2.1 Demografski in klinični podatki ter aktivnosti encimskih antioksidantov

Preglednica XI. Demografski in klinični podatki ter aktivnosti encimskih antioksidantov bolnikov na monoterapiji, ki so se zdravili s PEU starejše generacije

N	Bolniki	Starost (leta)	Spol	ITM (kg/m ²)	Trajanje bolezni (leta)	Pogostost napadov (št./meseč)	CAT (U/mL)	SOD (U/mL)	GR (U/L)	GPx (U/L)
1	B10	38	Ž	22,3	20	1 napad/ 2-3 mesece	16480	310	393	1138
2	B11	67	M	22,0	58	0	14146	292	445	1896
3	B15	32	M	26,0	19	0	16470	251	545	1431
4	B18	42	Ž	29,3	37	0-1	18683	242	383	4156
5	B21	40	M	27,8	15	ni podatka	16977	283	411	3221
6	B37	49	M	31,0	20	0	16654	259	475	1621
7	B40	52	Ž	23,7	27	1-2	17894	299	352	3294
8	B47	44	Ž	20,3	27	5	20790	306	398	3535
9	B48	21	M	25,9	5	0	18177	326	464	2049
	\bar{x}	43	M: 5*	25,4	25	0,8*	17364	285	430	2482
	SD	12,9	Ž: 4*	3,58	15,1	0-5*	1837,4	28,9	58,8	1078

*Za prikaz spola je podano razmerje (število), za pogostost epileptičnih napadov pa aritmetična sredina in razpon.

Preglednica XII. Demografski in klinični podatki ter aktivnosti encimskih antioksidantov bolnikov na monoterapiji, ki so se zdravili s PEU novejšje generacije

N	Bolniki	Starost (leta)	Spol	ITM (kg/m ²)	Trajanje bolezni (leta)	Pogostost napadov (št./meseč)	CAT (U/mL)	SOD (U/mL)	GR (U/L)	GPx (U/L)
1	B1	60	Ž	23,2	10	0-1	9547	163	636	12795
2	B3	49	M	21,4	19	0	14047	181	587	7574
3	B5	18	Ž	24,1	4	0-1	13940	177	598	19866
4	B9	28	M	19,6	10	0	12944	174	679	6436
5	B17	59	Ž	22,8	10	1-2	11098	163	588	12619
6	B19	66	M	18,3	21	1-2	12591	183	572	9450
7	B24	53	M	26,3	0,5	0	12447	176	601	8066
8	B25	26	M	24,4	12	0	13229	171	677	6725

9	B26	50	Ž	24,4	12	1 napad/ 3 mesece	13911	159	596	9829
10	B31	37	Ž	18,3	6	0	12787	167	582	8502
11	B44	33	M	27,8	16	8	15969	183	571	8485
12	B51	28	M	28,4	22	2/dan do 1/mesec	7875	169	661	11726
	\bar{x}	42	M: 7*	23,2	12	3,5*	12532	172	612	10173
	SD	15,8	Ž: 5*	3,38	6,7	0-30*	2161,1	8,3	39,9	3724,0

*Za prikaz spola je podano razmerje (število), za pogostost epileptičnih napadov pa aritmetična sredina in razpon.

Preglednica XIII. Demografski in klinični podatki ter aktivnosti encimskih antioksidantov bolnikov na politerapiji

N	Bolniki	Starost (leta)	Spol	ITM (kg/m ²)	Trajanje bolezni (leta)	Pogostost napadov (št./mesec)	CAT (U/mL)	SOD (U/mL)	GR (U/L)	GPx (U/L)
1	B2	20	M	25,6	6	1 napad/ 1-2 mes.	16388	171	485	1638
2	B4	26	Ž	34,2	9	1 napad/ 1-2 mes.	15252	217	374	5366
3	B6	53	Ž	24,1	42	4	17893	208	436	3851
4	B7	51	Ž	24,2	26	1 napad/ 2 meseca	16889	221	296	3498
5	B8	37	Ž	25,2	15	1-2	11917	171	622	8553
6	B12	61	Ž	24,5	35	0	15260	187	519	9933
7	B13	37	M	22,9	12	min 10	11659	191	460	7208
8	B14	24	M	24,0	17	0	11286	157	635	10105
9	B16	60	M	27,6	21	1-2	11616	177	592	9207
10	B20	46	M	26,7	14	2	12437	165	586	9674
11	B22	65	Ž	21,7	56	2-3	17053	214	454	3207
12	B23	37	M	30,1	33	3/dan	17168	249	441	4161
13	B27	42	M	20,0	20	10	13477	216	557	4277
14	B28	33	M	25,0	17	0	11958	205	452	7370
15	B29	44	Ž	23,0	43	0	12475	198	404	6194
16	B30	40	M	26,0	7	1-2	12957	226	452	5572
17	B32	23	M	19,6	19	0	16022	208	466	4760
18	B33	43	Ž	20,3	28	4-5	17248	202	633	5104
19	B34	34	M	24,7	6	2	14515	223	533	4149
20	B35	40	M	22,0	16	8	13253	220	510	5546
21	B36	35	M	26,6	22	0	16929	217	462	7105
22	B39	33	M	26,5	16	1-2	13239	153	594	9226

23	B41	22	Ž	16,2	10	1	12426	188	627	9200
24	B45	36	M	25,4	25	2-4	15498	171	566	7989
25	B46	28	M	41,2	23	5-10	17110	228	529	4966
26	B49	24	Ž	16,5	16	1-2	16788	239	586	4160
27	B50	62	Ž	24,5	ni podatka	ni podatka	11648	209	557	/
28	B52	49	M	19,7	22	2-6/dan	13914	200	605	5811
	\bar{x}	40	M:17*	24,6	21	9,8*	14438	201	516	6216
	SD	12,8	Ž: 11*	4,98	12,0	0-120*	2209,7	86,5	86,5	2367

*Za prikaz spola je podano razmerje (število), za pogostost epileptičnih napadov pa aritmetična sredina in razpon.

Preglednica XIV. Demografski podatki in aktivnosti encimskih antioksidantov kontrolne skupine

N	Kontrola	Starost (leta)	Spol	ITM (kg/m ²)	CAT (U/mL)	SOD (U/mL)	GR (U/L)	GPx (U/L)
1	K1	27	M	26,7	12195	140	697	11979
2	K2	21	M	20,1	10945	123	678	10335
3	K3	25	Ž	28,3	11427	164	672	8060
4	K4	33	M	25,3	11058	142	710	11800
5	K5	57	Ž	19,4	12526	147	651	8059
6	K6	47	Ž	27,3	12032	129	667	9471
7	K7	39	Ž	23,0	12101	138	521	8010
8	K8	56	Ž	27,3	10837	142	662	8197
9	K9	37	Ž	21,9	10835	137	621	11764
10	K10	31	Ž	21,8	12471	144	700	9625
11	K11	53	M	26,6	11755	150	749	6141
12	K12	60	M	27,1	11469	152	709	6457
13	K13	42	M	24,8	11618	156	648	7731
14	K14	47	M	23,4	12722	139	655	11695
	\bar{x}	41	M: 7*	24,5	11714	143	667	9238
	SD	12,7	Ž: 7*	2,92	647,5	10,4	53,2	2017

\bar{x} – povprečna vrednost SD – standardna deviacija *Za prikaz spola je podano razmerje.

4.2.2 Povezava epilepsije z aktivnostmi encimskih antioksidantov

Najprej smo pri bolnikih z epilepsijo preverili morebitno povezavo demografskih in kliničnih podatkov z aktivnostmi encimskih antioksidantov (**preglednica XV**). Pri starosti, indeksu telesne mase in pogostosti napadov ni bilo nobene statistično značilne korelacije. Medtem ko smo pri trajanju bolezni ugotovili, da obstaja statistično značilna pozitivna

korelacija z aktivnostmi CAT ($p = 0,003$) in SOD ($p = 0,015$) ter statistično značilna negativna korelacija z aktivnostmi GR ($p = 0,006$) in GPx ($p = 0,043$).

Preglednica XV. Bivariatna korelacija demografskih in kliničnih podatkov z aktivnostmi encimov

	Starost	ITM	Trajanje bolezni	Pogostost napadov
CAT	-0,064 (0,660)	0,123 (0,398)	0,424 (0,003)	-0,002 (0,989)
SOD	0,040 (0,787)	0,079 (0,588)	0,348 (0,015)	0,125 (0,475)
GR	-0,163 (0,262)	-0,196 (0,177)	-0,393 (0,006)	0,023 (0,896)
GPx	0,021 (0,886)	-0,035 (0,816)	-0,294 (0,043)	-0,032 (0,855)

Vrednosti predstavljajo Spearmanov koeficient korelacije s p - vrednostjo v oklepajih.

SOD, CAT, GPx in GR, skupaj z glutationom (GSH), tvorijo primarno obrambo pred ROS. SOD katalizira pretvorbo superoksidnega radikala $O_2^{\cdot-}$ v molekularni kisik in vodikov peroksid (H_2O_2), katerega nadalje do vode reducira CAT in GPx. Sočasno z nevtralizacijo H_2O_2 do vode, ki jo katalizira GPx, se GSH oksidira do glutation disulfida (GSSG), kateri se nato reducira nazaj do GSH s pomočjo encima GR. Če H_2O_2 ni popolnoma nevtraliziran, lahko povzroči oksidativne poškodbe bioloških makromolekul ali pa nadalje reagira do bolj škodljivega hidroksilnega radikala (OH^{\cdot}) (97).

To dejstvo podpira teorijo, da ima sistem endogenih antioksidantov pomembno vlogo pri obvladovanju poteka epilepsije kot tudi pri sistemski toksičnosti v povezavi z zdravljenjem s PEU (57).

Medsebojno povezavo trajanja epilepsije in spremenjenih aktivnosti encimskih antioksidantov smo uspeli potrditi tudi v naši magistrski nalogi, kot je razvidno iz **preglednice XV**. Pozitivna korelacija med trajanjem epilepsije ter aktivnostjo CAT in SOD bi lahko pomenila sposobnost tega sistema endogenih antioksidantov, da se lahko dlje časa bojuje proti povišanemu obsegu oksidativnega stresa zaradi epilepsije, medtem ko bi negativna povezava med trajanjem bolezni in aktivnostjo GR in GPx lahko predstavljala nezmožnost obrambe glutationskega sistema antioksidantov proti bolezni na dolgi rok.

4.2.3 Usklajenost v delovanju encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo

Nato smo preverjali morebitno usklajenost v delovanju encimskih antioksidantov. Kot je razvidno iz **preglednice XVI**, obstaja pri bolnikih z epilepsijo statistično značilna pozitivna korelacija med aktivnostjo CAT in SOD ($p < 0,001$), ravno tako med aktivnostjo GR in GPx ($p < 0,001$). Po drugi strani pa aktivnost CAT in SOD negativno korelira z aktivnostjo GR in GPx ($p < 0,001$).

Preglednica XVI. Bivariatna korelacija med aktivnostmi encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo

	CAT	SOD	GR	GPx
CAT		-	-	-
SOD	0,695 (<0,001)		-	-
GR	-0,587 (<0,001)	-0,734 (<0,001)		-
GPx	-0,739 (<0,001)	-0,826 (<0,001)	0,661 (<0,001)	

Vrednosti predstavljajo Spearmanov koeficient korelacije s P - vrednostjo v oklepajih.

Sistem endogenih antioksidantov za vzdrževanje normalne presnove vedno teži k ohranjanju ravnovesja med $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 znotraj celic. Zato lahko pričakujemo, da bo delovanje CAT in SOD usklajeno, ravno tako delovanje GR in GPx. To smo tudi potrdili z ugotovljeno pozitivno korelacijo med aktivnostmi CAT in SOD ter med aktivnostmi GR in GPx (**preglednica XVI**). Na podlagi tega lahko domnevamo, da je ravnovesje med CAT in SOD na eni strani ter GR in GPx na drugi bolj pomembno kot absolutne vrednosti posameznih encimskih antioksidantov (98).

4.2.4 Aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo v primerjavi s kontrolno skupino

Povprečje rezultatov aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo in kontrolni skupini zdravih prostovoljcev je predstavljeno v **preglednici XVII**. Pri bolnikih z epilepsijo so bile aktivnosti encimov **CAT in SOD** statistično značilno **višje** v primerjavi z zdravimi prostovoljci s signifikantno vrednostjo $p < 0,0001$. Po drugi strani pa so bile aktivnosti encimov **GR in GPx** pri bolnikih statistično značilno **nižje** v primerjavi s kontrolno skupino s signifikantno vrednostjo $p < 0,0001$ (za GR) in $p = 0,003$ (za GPx).

Preglednica XVII. Aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih in kontrolni skupini

Encimski antioksidanti	Aritmetična sredina ± SD		p-vrednost
	Vsi bolniki (n = 49)	Kontrolna skupina (n = 14)	
CAT (U/L)	14,5 ± 2,62	11,7 ± 0,65	< 0,0001
SOD (U/mL)	210 ± 44,4	143 ± 10,5	< 0,0001
GR (U/L)	523 ± 93,9	667 ± 53,1	< 0,0001
GPx (U/L)	6505 ± 3623	9237 ± 2017	0,003

Iz **preglenice XVII** je torej razvidno, da so pri vseh bolnikih z epilepsijo, ki so se zdravili s PEU, v primerjavi z zdravimi prostovoljci, plazemske aktivnosti encimskih antioksidantov spremenjene. Opažene povišane aktivnosti CAT in SOD pri bolnikih z epilepsijo predstavljajo povečan odziv endogenih encimskih antioksidantov, ki je bil razvit z namenom zaščite organizma pred povečanim endogenim nastajanjem radikalov. Ker SOD odstranjuje prvi radikal v skupini ROS, je ta encim ključen člen obrambe pred ROS v skoraj vseh celicah, ki so v stiku s kisikom. V reakciji sicer nastane H₂O₂, ki je še vedno oksidant, vendar ni več radikal (99). Pri pretvorbi H₂O₂ do vode velja, da so encimi CAT pomembnejši pri visokih količinah peroksida, medtem ko pri nižjih fizioloških ravneh H₂O₂ vlogo opravlja GPx. S tem si lahko razlagamo ugotovljene značilno povečane vrednosti CAT pri bolnikih z epilepsijo. Ker glavna vloga pri redukciji vodikovega peroksida pripada CAT, lahko pričakujemo manjšo vlogo encimov GPx pri odstranjevanju radikalov (100). Vseeno pa bi lahko pričakovali značilno povečan ali pa kvečjemu nespremenjen odziv encima GPx. Ker je encim GR odgovoren za redukcijo oksidirane oblike glutationa (GSSG) in s tem obnovo GSH, bi podobno pričakovali tudi za GR. Vendar pa so naši rezultati pokazali statistično značilno zmanjšanje aktivnosti GR in GPx, kar bi lahko bila posledica poškodb/oslABLjenosti glutationskega encimskega sistema (98).

Iz naših rezultatov torej lahko ponovno sklepamo, da CAT in SOD najverjetneje predstavljata glavna encimska antioksidanta, odgovorna za vzdrževanje ravnovesja med tvorbo reaktivnih spojin in endogenim obrambnim sistemom pri epilepsiji, medtem ko imata encima GR in GPx manjšo vlogo oziroma sta celo nezmožna vzdrževati obrambo pred povečanim nastajanjem reaktivnih kisikovih spojin.

4.2.5 Primerjava aktivnosti encimskih antioksidantov med posameznimi skupinami bolnikov in kontrolno skupino

Primerjava aktivnosti encimskih antioksidantov med skupinami bolnikov in kontrolno skupino je podana v **preglednici XVIII**.

Aktivnosti encimskih antioksidantov CAT in SOD so bile v vseh treh skupinah bolnikov z epilepsijo statistično značilno višje v primerjavi s kontrolno skupino. Podobno smo zaznali statistično značilno zmanjšanje aktivnosti encimov GR in GPx pri vseh treh skupinah bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino, razen pri bolnikih, zdravljenih s PEU novejšje generacije, kjer ni bilo statistično značilne razlike v aktivnost encima GPx ($p = 0,607$).

Preglednica XVIII. Primerjava aktivnosti encimskih antioksidantov med skupinami bolnikov in kontrolno skupino

Encimski antioksidanti	Aritmetična sredina \pm SD			p-vrednost		
	Starejše PEU (n = 9)	Novejše PEU (n = 12)	Politerapija (n = 28)	P _{S/K}	P _{N/K}	P _{P/K}
CAT (U/L)	17,4 \pm 1,84	12,5 \pm 2,16	14,4 \pm 2,21	< 0,0001	0,031	0,0001
SOD (U/mL)	285 \pm 28,9	172 \pm 8,2	201 \pm 24,9	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
GR (U/L)	430 \pm 58,8	612 \pm 40,1	515 \pm 86,5	< 0,0001	0,007	< 0,0001
GPx (U/L)	2482 \pm 1078	10173 \pm 3724	6216 \pm 2367	< 0,0001	0,607	0,0007

S – PEU starejše generacije, N – PEU novejše generacije, P – politerapija, K – kontrolna skupina

4.2.6 Primerjava aktivnosti encimskih antioksidantov med skupinami bolnikov

Pri bolnikih, ki so se zdravili s PEU starejše generacije, smo v primerjavi z bolniki, ki so se zdravili s PEU novejše generacije in bolniki na politerapiji zaznali statistično značilno povišanje aktivnosti encimov CAT in SOD ter statistično značilno znižanje encimov GR in GPx (**preglednica XIX**). Podobno smo pri bolnikih na politerapiji, v primerjavi z bolniki, ki so se zdravili s PEU novejše generacije, zaznali statistično značilno povišanje encima SOD ter statistično značilno znižanje encimov GR in GPx, medtem ko povišana vrednost CAT pri bolnikih s politerapijo ni bila statistično značilna ($p = 0,059$).

Preglednica XIX. Primerjava aktivnosti encimskih antioksidantov med skupinami bolnikov z epilepsijo

Encimski antioksidanti	p-vrednost		
	P _{S/N}	P _{S/P}	P _{N/P}
CAT (U/L)	0,0005	0,007	0,059
SOD (U/mL)	0,0002	< 0,0001	0,0009
GR (U/L)	0,0004	0,009	0,002
GPx (U/L)	0,0003	0,0003	0,001

S – PEU starejše generacije, N – PEU novejše generacije, P – politerapija

Spremembe v aktivnostih encimskih antioksidantov smo zaznali pri vseh skupinah bolnikov, kot tudi med posameznimi skupinami bolnikov z epilepsijo. Spremembe so bile še posebej očitne, ko smo primerjali PEU starejše in PEU novejše generacije (**preglednica XIX**).

Aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih na politerapiji so se nahajale med aktivnostmi encimov pri bolnikih na monoterapiji. Večina bolnikov na politerapiji se je zdravila s kombinacijo PEU starejše in novejše generacije. Pri tem je potrebno poudariti, da se tudi odmerki posameznih PEU pri bolnikih na monoterapiji in PEU pri bolnikih na politerapiji niso med seboj značilno razlikovali (**preglednica XXV**) oziroma so bili odmerki PEU na politerapiji približen seštevek posameznih odmerkov PEU starejše oziroma novejše generacije. Na podlagi rezultatov bolnikov, ki so se zdravili z monoterapijo, torej le s PEU starejše ali pa PEU novejše generacije, torej lahko pričakujemo, da bodo rezultati bolnikov na politerapiji odražali mešan oziroma skupen učinek obeh generacij.

Če torej predpostavljamo, da PEU starejše generacije povzročajo večje nastajanje reaktivnih zvrsti kot PEU novejše generacije in s tem tudi večje spremembe encimskih antioksidantov v primerjavi z zdravimi prostovoljci (**preglednica XVIII**), bodo spremembe encimskih antioksidantov pri bolnikih na politerapiji (kombinacija PEU starejše in novejše generacije) večje kot pri bolnikih, ki so se zdravili s PEU novejše generacije, kar je razvidno tudi iz naših rezultatov (**preglednica XIX**).

Če bi nadalje predpostavljali, da tudi PEU novejše generacije povzročajo povečano nastajanje reaktivnih zvrsti, bi bile spremembe encimskih antioksidantov pri bolnikih na politerapiji (kot posledica kombinacije PEU starejše in novejše generacije) večje, kot pri bolnikih, ki so se zdravili s PEU starejše generacije. Vendar pa so se vrednosti nahajale med obema skupinama na monoterapiji (**preglednica XIX**). Zato ne moremo trditi, da so spremenjene aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih, ki so se zdravili s PEU novejše generacije (v primerjavi z zdravimi prostovoljci), posledica zdravljenja s predstavniki protiepileptičnih zdravil novejše generacije, saj bi bile povišane vrednosti encimov lahko le posledica same epilepsije.

Ker vemo, da tudi sama epilepsija vpliva na obseg oksidativnega stresa, in ker je prisotna značilna razlika v trajanju epilepsije med bolniki, ki so se zdravili s PEU starejše generacije in bolniki, ki so se zdravili s PEU novejše generacije (**preglednica X**), bi lahko tudi domnevali, da so razlike v aktivnostih encimskih antioksidantov med tema dvema skupinama bolnikov le posledica trajanja epilepsije.

Vendarle pa je se izkazalo, da med bolniki na politerapiji in bolniki, ki so se zdravili s PEU starejše generacije, ni bilo statistično značilne razlike v trajanju epilepsije (**preglednica X**). In ker so bile razlike v rezultatih aktivnosti encimov CAT, SOD, GR in GPx med skupino bolnikov na politerapiji in skupino bolnikov, zdravljenih s PEU starejše generacije, statistično značilne z vrednostjo P vsaj 0,009 (**preglednica XIX**), lahko s tem sklepamo, da na obseg oksidativnega stresa ter posledično aktivnost encimskih antioksidantov poleg epilepsije vpliva tudi zdravljenje s protiepileptičnimi učinkovinami, zlasti tistimi iz starejše generacije.

4.3 ZDRAVLJENJE S PROTIEPILEPTIČNIMI UČINKOVINAMI

Bolniki, vključeni v raziskavo, so bili razdeljeni v tri skupine glede na generacijo PEU za zdravljenje idiopatske ali generalizirane epilepsije. Prva skupina je predstavljala bolnike, zdravljene s PEU starejše generacije (n = 9), druga skupina bolnike, zdravljene s PEU novejše generacije (n = 12), tretja pa bolnike, zdravljene predvsem z kombinacijo PEU starejše in novejše generacije (n = 28) (**preglednica XX**). Izmed bolnikov, ki so se zdravili s PEU starejše generacije, se jih je 5 zdravilo s CBZ, 4 pa z VPA (**preglednica XXI**).

Izmed bolnikov, zdravljenih s PEU novejše generacije, se jih je 8 zdravilo z LEV, 2 bolnika s PGB in 2 z TPM (**preglednica XXII**). V skupini, zdravljeni s politerapijo, se je 11 bolnikov zdravilo s kombinacijo CBZ in enim izmed novejših PEU (lakoamid, lamotrigin, LEV, PGB ali TPM), 6 bolnikov s kombinacijo VPA in enim izmed novejših PEU (LEV ali LTG), 6 bolnikov s kombinacijo LEV in enim izmed novejših PEU (lakoamid, LTG, okskarbazepin), 4 bolniki s kombinacijo TPM in enim izmed novejših PEU (LTG, OXC ali PGB) in 1 bolnik s kombinacijo CBZ, fenitoina in TPM (**preglednica XXIII**).

Preglednica XX. Število bolnikov z epilepsijo, zdravljenih z različnimi PEU

Protiepileptične učinkovine	Monoterapija (n = 21)		Politerapija (n = 28)
	Starejše PEU (n = 9)	Novejše PEU (n = 12)	
CBZ (n = 17)	5	-	12
VPA (n = 10)	4	-	6
LEV (n = 21)	-	8	13
PGB (n = 6)	-	2	4
TPM (n = 7)	-	2	5

4.3.1 Odmerki in plazemske koncentracije PEU pri bolnikih z epilepsijo

Preglednica XXI. Povprečne vrednosti, standardne deviacije in razpon odmerkov in plazemskih koncentracij PEU starejše generacije (ter njunih presnovkov) pri bolnikih na monoterapiji

	Odmerek CBZ (mg/dan)	Konc. CBZ (mg/L)	Konc. EpoCBZ (mg/L)	Odmerek VPA (mg/dan)	Konc. VPA (mg/L)	Konc. 4-en VPA (mg/L)
\bar{x}	1040	3,1	0,43	1000	50,1	1,31
SD	536,7	1,44	0,306	408,2	36,17	0,668
Razpon	400 – 1600	2,2 – 4,8	0,22 – 0,78	500 - 1000	24,0 – 102,3	0,60 – 2,02

\bar{x} – povprečna vrednost SD – standardna deviacija

Preglednica XXII. Povprečne vrednosti, standardne deviacije in razpon odmerkov in plazemskih koncentracij PEU novejše generacije pri bolnikih na monoterapiji

	Odmerek LEV (mg/dan)	Konc. LEV (mg/L)	Odmerek PGB (mg/dan)	Konc. PGB (mg/L)	Odmerek TPM (mg/dan)	Konc. TPM (mg/L)
\bar{x}	1125	25,5	600	4,0	125	6,8
SD	790,6	34,9	0,0	0,0	106,1	1,13
Razpon	500 - 3000	7,7 – 104,0	600 - 600	4,0 – 4,0	50 - 200	6,0 – 7,6

\bar{x} – povprečna vrednost SD – standardna deviacija

Preglednica XXIII. Povprečne vrednosti, standardne deviacije in razpon odmerkov in plazemskih koncentracij PEU (in njihovih presnovkov) pri bolnikih na politerapiji

	Starejše PEU			Novejše PEU		
	Odmerek CBZ (mg/dan)	Konc. CBZ (mg/L)	Konc. EpoCBZ (mg/L)	Odmerek LEV (mg/dan)	Konc. LEV (mg/L)	Odmerek OXC (mg/dan)
\bar{x}	960	4,6	0,85	2154	24,1	1200
SD	386,4	0,67	0,321	774,2	10,02	600,0
Razpon	400 – 1600	3,8 – 5,6	0,55 – 1,41	1000 – 3000	9,5 – 41,4	600 - 1800
	Odmerek VPA (mg/dan)	Konc. VPA (mg/L)	Konc. 4-en VPA (mg/L)	Odmerek PGB (mg/dan)	Konc. PGB (mg/L)	Odmerek LTG (mg/dan)
\bar{x}	1583	94,4	1,96	319	2,3	209
SD	861,2	36,02	0,254	37,5	0,92	167,4
Razpon	500 - 3000	39,7 – 140,0	1,76 – 2,38	300 - 375	1,6 – 2,9	75 - 600
	Odmerek fenitoina* (mg/dan)	-	-	Odmerek TPM (mg/dan)	Konc. TPM (mg/L)	Odmerek lakozamida (mg/dan)
\bar{x}	250	-	-	238	13,6	333
SD	0,0	-	-	62,9	5,85	115,5
Razpon	250 - 250	-	-	150 - 300	5,8 – 20,1	200 - 400

\bar{x} – povprečna vrednost SD – standardna deviacija *fenitoin je predstavnik starejše generacije PEU

4.3.2 Plazemske koncentracije PEU in referenčno območje

Bolnikom z epilepsijo smo določili plazemske koncentracije CBZ, EpoCBZ (presnovek CBZ), VPA, 4-en VPA (presnovek VPA), LEV, PGB in TPM. Izmerjene povprečne plazemske koncentracije CBZ, VPA, LEV in TPM so se nahajale znotraj referenčnih območij (**preglednica XXIV**) (13). Za PGB v literaturi ne najdemo določenega referenčnega območja, vendar so se plazemske koncentracije PGB, ki smo jih izmerili, nahajale znotraj območij, ki so bila določena v različnih kliničnih študijah, in sicer: Arroyo et al. (2004): 0,29–2,84 mg/L (pri odmerku 150 mg/dan), 0,87 – 14,2 mg/L (pri odmerku 600 mg/dan) (101); Berry and Millington (2005): 2,8 – 8,3 mg/L (pri odmerku 600 mg/dan) (102)

Preglednica XXIV. Izmerjene plazemske koncentracije PEU pri bolnikih z epilepsijo in referenčno območje

Protiepileptične učinkovine	IZMERJENE PLAZEMSKE KONCENTRACIJE (mg/L)		REFERENČNO OBMOČJE (mg/L)
	Povprečje (\pm SD)	Razpon	
CBZ	4,1 (\pm 1,14)	2,2 – 5,6	4 – 12
EpoCBZ	0,71 (\pm 0,363)	0,05 – 1,41	0,8 – 8
VPA	76,7 (\pm 41,00)	24,0 – 140,0	50 – 100
4-en VPA	1,67 (\pm 0,564)	0,60 – 2,38	/
LEV	24,6 (\pm 21,19)	7,7 – 104,0	12 – 46
PGB	2,8 (\pm 1,19)	1,6 – 4,0	*ni def.; Arroyo et al.: 0,29 – 2,84; 0,87 – 14,2 Berry and Millington: 2,8 – 8,3
TPM	11,7 (\pm 5,85)	5,8 – 20,1	5 – 20

SD – standardna deviacija *terapevtsko območje za pregabalin ni definirano.

4.3.3 Primerjava zdravljenja s CBZ, VPA in LEV med skupinami bolnikov

Med bolniki na monoterapiji in bolniki na politerapiji ni bilo nobene statistično značilne razlike v odmerku CBZ ($p = 0,840$) in koncentraciji CBZ ($p = 0,197$) oziroma EpoCBZ ($p = 0,121$), odmerku VPA ($p = 0,228$) in koncentraciji VPA ($p = 0,136$) oziroma 4-en VPA ($p = 0,086$) ter koncentraciji LEV ($p = 0,088$). Pokazalo pa se je statistično značilno povišanje odmerka LEV pri bolnikih na politerapiji v primerjavi z bolniki na monoterapiji ($p = 0,006$) (preglednica XXV).

Preglednica XXV. Primerjava odmerkov in plazemskih koncentracij CBZ, VPA in LEV med skupinami bolnikov

PEU	Monoterapija	Politerapija	p-vrednost
Odmerek CBZ (mg/dan)	1040 (400 – 1600)	960 (400 – 1600)	0,840
Konc. CBZ (mg/L)	3,1 (2,2 – 4,8)	4,6 (3,8 – 5,6)	0,197
Konc. EpoCBZ (mg/L)	0,43 (0,22 – 0,78)	0,85 (0,55 – 1,41)	0,121
Odmerek VPA (mg/dan)	1000 (500 – 1500)	1583 (500 – 3000)	0,228
Konc. VPA (mg/L)	50,1 (24,0 – 102,3)	94,5 (39,7 – 140,0)	0,136
Konc. 4-en VPA (mg/L)	1,31 (0,60 2,02)	1,96 (1,76 – 2,38)	0,086
Odmerek LEV (mg/dan)	1125 (500 – 3000)	2154 (1000 -3000)	0,006
Konc. LEV (mg/L)	25,5 (7,7 – 104,0)	24,1 (9,5 - 41,4)	0,088

4.3.4 *Povezava med zdravljenjem (odmerki, plazemske koncentracije) s CBZ, VPA in LEV in aktivnostjo encimskih antioksidantov*

Znano je, da se predvsem PEU starejše generacije presnavljajo do reaktivnih presnovkov, ki lahko povzročijo oksidativni stres in s tem tudi spremenjene aktivnosti encimskih antioksidantov (57, 103, 104).

V primeru zdravljenja (odmerki, plazemske koncentracije) s predstavnikoma starejše generacije PEU (CBZ in VAL) nismo odkrili nobene statistično značilne povezave s plazemskimi aktivnostmi encimskih antioksidantov, razen pri plazemski koncentraciji presnovka VPA (4-en VPA), kjer pa smo, v nasprotju s pričakovanji, ugotovili statistično značilno negativno korelacijo z aktivnostjo CAT (**preglednica XXVI**). Glede na rezultate iz **preglednice XXVIII** in **preglednice XXIX**, kjer so bile aktivnosti CAT pri bolnikih, ki so se zdravili s PEU starejše generacije (kamor spada VPA), statistično značilno višje v primerjavi z ostalimi skupinami, bi namreč tudi v tem primeru pričakovali kvečjemu pozitivno korelacijo aktivnosti CAT s presnovkom VPA. Iz rezultata iz **preglednice XXVI** pa bi lahko sklepali, da pride pri zdravljenju z VPA do znižanja aktivnosti CAT oziroma celo, da pride pri visokih plazemskih koncentracijah presnovka 4-en VPA do inaktivacije encima CAT. Vendarle pa na podlagi ostalih rezultatov iz **preglednice XXVI** vseeno lahko sklepamo, da odmerki in plazemska koncentracija PEU starejše generacije pri terapevtskih koncentracijah bistveno ne vplivata na aktivnost encimskih antioksidantov. V primeru zdravljenja s predstavnikom novejšje generacije PEU smo pri odmerku levetiracetama ravno tako ugotovili statistično značilno negativno korelacijo z aktivnostjo CAT, z ostalimi encimskimi antioksidanti pa nismo ugotovili statistično značilne povezave. Glede na to, da je odmerek LEV pri bolnikih na politerapiji statistično značilno višji v primerjavi z odmerkom pri bolnikih na monoterapiji (**preglednica XXV**), ter dejstvo, da samo aktivnosti CAT pri bolnikih na politerapiji niso statistično značilno višje v primerjavi z bolniki, ki so se zdravili s PEU novejšje generacije (**preglednica XIX**), bi to dejansko lahko pomenilo, da se pri višjih odmerkih LEV, aktivnost CAT zmanjša. Slednjo ugotovitev bi lahko potrjevala študija o nevroprotektivni vlogi LEV. Ta je namreč pokazala, da naj bi levetiracetam zmanjšal koncentracijo glutamata v hipokampusu ter preko povečanega izločanja nitroksidnega radikala sinergistično povečal antioksidativno aktivnost askorbinske kisline in alfa-tokoferola (105). Posledično bi se lahko zmanjšal obseg nastajanja ROS in s tem aktivnost CAT.

Preglednica XXVI. Bivariatna korelacija med zdravljenjem s CBZ, VPA in LEV in aktivnostmi encimskih antioksidantov

	Odmerek CBZ	Konc. CBZ	Konc. EpoCBZ	Odmerek VPA	Konc. VPA	Konc. 4-en VPA	Odmerek LEV	Konc. LEV
CAT	-0,374 (0,169)	-0,567 (0,112)	-0,600 (0,088)	-0,287 (0,422)	-0,321 (0,365)	-0,767 (0,016)	-0,485 (0,026)	-0,135 (0,569)
SOD	0,045 (0,873)	-0,233 (0,546)	-0,333 (0,381)	0,025 (0,945)	0,212 (0,556)	-0,350 (0,356)	0,112 (0,629)	0,149 (0,531)
GR	0,163 (0,179)	0,367 (0,332)	0,317 (0,406)	0,193 (0,593)	0,273 (0,446)	0,283 (0,460)	-0,191 (0,407)	-0,251 (0,286)
GPx	-0,041 (0,884)	0,217 (0,576)	0,283 (0,460)	0,075 (0,837)	0,103 (0,777)	-0,017 (0,966)	-0,053 (0,819)	-0,087 (0,715)

Vrednosti predstavljajo Spearmanov koeficient korelacije s P - vrednostjo v oklepajih.

5 SKLEPI

V magistrski nalogi smo proučevali vpliv zdravljenja s protiepileptičnimi učinkovinami prve in druge generacije na aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo in rezultate primerjali z zdravimi prostovoljci.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko potrdimo naslednjo hipotezo:

- **Delovanje endogenih encimskih antioksidantov je medsebojno usklajeno:** *Med bolniki z epilepsijo je bila ugotovljena pozitivna povezava med aktivnostjo CAT in SOD, ravno tako med aktivnostjo GR in GPx. Tudi negativna povezava med aktivnostjo CAT in GR ter GPx in SOD ter aktivnostjo GR in GPx kaže na delno usklajenost delovanja različnih endogenih encimskih antioksidativnih sistemov.*

Druge hipoteze smo uspeli le delno potrditi:

- **Zdravljenje s protiepileptičnimi učinkovinami pri bolnikih z epilepsijo povzroča višje aktivnosti encimskih antioksidantov v primerjavi s kontrolno skupino:** *Ugotovljena je bila statistično značilno spremenjena aktivnost encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo v primerjavi s kontrolno skupino. Ugotovljeno je bilo statistično značilno povečanje aktivnosti CAT in SOD ter statistično značilno zmanjšanje aktivnosti GR in GPx, kar bi lahko bila posledica motnje v sintezi oziroma proteinski inaktivaciji. Z ugotovljeno spremenjeno aktivnostjo encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo bi posledično lahko sklepali na prisotnost povišanega obsega oksidativnega stresa pri bolnikih v primerjavi z zdravimi prostovoljci.*
- **Zdravljenje s predstavniki starejše generacije PEU povzroča višje aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih kot zdravljenje s predstavniki novejše generacije PEU:** *Uspeli smo dokazati, da pri zdravljenju epilepsije prihaja do pomembnih razlik v aktivnostih encimskih antioksidantov med bolniki, ki so se zdravili s predstavniki starejše generacije PEU ter bolniki, ki so se zdravili s predstavniki novejše generacije PEU. Pri bolnikih z epilepsijo, zdravljenimi s PEU starejše generacije, smo v primerjavi z bolniki zdravljenimi s PEU novejše generacije opazili statistično značilne višje aktivnosti CAT in SOD ter statistično značilno nižje aktivnosti GR in GPx. Te ugotovitve nakazujejo na povečan obseg oksidativnega stresa pri bolnikih z epilepsijo, zdravljenih s PEU starejše generacije.*

- **Zdravljenje s kombinacijo PEU starejše in novejšje generacije povzroča višje aktivnosti encimskih antioksidantov kot zdravljenje s predstavniki novejšje generacije:** *V skupini bolnikov, ki so se zdravili s politerapijo, so se vrednosti encimskih antioksidantov nahajale med vrednostmi določenimi za skupino bolnikov, ki so se zdravili s PEU starejše generacije in vrednostmi določenimi za skupino bolnikov, ki so se zdravili s PEU novejšje generacije. To ponovno potrjuje vpliv vrste protiepileptične učinkovine na aktivnosti encimskih antioksidantov pri bolnikih z epilepsijo.*

Po nam znanih podatkih, je naša študija prva, ki je preučevala vpliv zdravljenja s predstavniki novejšje generacije PEU v primerjavi s predstavniki starejše generacije PEU na aktivnosti encimskih antioksidantov glede na kontrolno skupino zdravih prostovoljcev. Z njo smo prišli do zaključka, da obstaja velika potreba po preučitvi vpliva obstoječih protiepileptičnih učinkovin na obseg oksidativnega stresa pri bolnikih z epilepsijo. Na podlagi dobljenih rezultatov, ki nakazujejo na povečan obseg oksidativnega stresa pri bolnikih z epilepsijo, ki so se zdravili s predstavniki starejše generacije PEU ter dejstva, da pri teh pride do večjega pojava neželenih učinkov, se zdi, da obstaja potreba tudi po nadaljnjem razvoju novih oblik zdravljenja epilepsije. To bi lahko izvedli bodisi z razvojem novejših protiepileptičnih učinkovin, ki bi dodatno vsebovala še antioksidativne oziroma nevroprotektivne učinke ali pa z dodatkom antioksidantov oziroma nevroprotektivnih učinkovin v že obstoječo terapijo z že prisotnimi protiepileptičnimi učinkovinami (106). Študija ima žal tudi nekaj pomanjkljivosti in sicer je bilo število bolnikov v vsaki skupini relativno majhno. Glede na dobljene rezultate, se torej zdi smiselno, da bi za potrditev naših hipotez razvili ter izvedli nadaljnje študije na večjem številu bolnikov. Da bi lahko nedvomno dokazali vpliv protiepileptičnih učinkovin starejše ter predvsem novejšje generacije na aktivnosti encimskih antioksidantov oziroma stanje oksidativnega stresa pri bolnikih z epilepsijo ter izključili vpliv epilepsije na rezultate, pa bi morali bolnike, ki so se zdravili z različnimi PEU, poleg primerjave z zdravimi prostovoljci, primerjati tudi z nezdravljenimi bolniki z epilepsijo, kar pa je dandanes zaradi etičnih in drugih razlogov težko izvedljivo.

6 VIRI IN LITERATURA

1. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Epilepsija> (dostop: 19.09.2016)
2. Fisher RS, Boas EW, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J. Epileptic Seizures and Epilepsy. Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46(4): 470-472.
3. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French A, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55(4): 475-482.
4. Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia* 2011; 52(6): 1052-1057.
5. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology, Sixth Edition*, Churchill Livingstone, Elsevier 2007: 575-587
6. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Boas WvE, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P, Scheffe IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 2010, 51(4): 676-685
7. Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol.* 2002; 1(3): 173-181
8. Eddy CM, Rickards HE, Cavanna AE. The cognitive impact of antiepileptic drugs. *Ther Adv Neurol Disord* 2011; 4(6): 385-407
9. Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* 2010; 19(10): 650 – 655
10. Eadie MJ, Bladin. *A Disease Once Sacred: a History of the Medical Understanding of Epilepsy*. John Libbey & Company Ltd., England 2001.
11. Shorvon S, Perucca E, Engel J. *The Treatment of Epilepsy, Third Edition*, Blackwell Publishing Ltd. 2009: 1-15
12. Lemke TL, Williams DA. *Foye's principles of medicinal chemistry, 6th Ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2007: 521-546
13. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, Perucca E. Antiepileptic drugs – best practice guidelines for

therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2008; 49(7): 1239-1276.

14. Panayiotopoulos CP, Benbadis SR, Beran RG, Berg AT, Engel J, Ganalopoulou AS, Kaplan PW, Koutroumanidis M, Moshe SL, Nordli DR, Serratosa JM, Sisodiya SM, Tatum WO, Valeta T, Wilner AN. *Atlas of Epilepsies*. London, UK, Springer-Verlag 2010: 1861-1864

15. Wyllie E, Gupta A, Lachhwani DK. *The treatment of Epilepsy: Principles & Practice*, 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA 2006: 775-779

16. Wheless JW, Willmore LJ, Brumback RA. *Advanced Therapy in Epilepsy*. People's Medical Publishing House, Shelton, USA 2009: 343-347

17. Browne TR, Holmes GL. *Handbook of Epilepsy*, Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA 2008: 216-217

18. Sirven JI, Fife TD, Wingerchuk DM, Drazkowski JF. Second-generation antiepileptic drugs' impact on balance: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2007; 82(1): 40-47

19. Čebular B, Zgonc V. Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Zdrav Vestn* 2006; 75: 379-388

20. Schmidt D. Efficacy of New Antiepileptic Drugs. *Epilepsy Currents*, Vol. 11, No. 1 2011: 9-11

21. Bialer M, White HS. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(1): 68-82

22. Potschka H. Pharmacological treatment strategies: Mechanisms of antiepileptic drugs. *Epileptology* 2013; 1(1): 31-37

23. Luszczki JJ. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 197-216

24. Patsalos PN, Bourgeois BFD. *The epilepsy prescriber's guide to antiepileptic drugs*, Cambridge University Press, Cambridge 2010: 95-297

25. Bockbrader HN, Burger P, Knapp L, Corrigan BW. Population pharmacokinetics of pregabalin in healthy subjects and patients with chronic pain or partial seizures. *Epilepsia* 2011; 52(2): 248-257

26. Sheth RD, Stafstrom CE, Gsu D. Nonpharmacological Treatment Options for Epilepsy. *Semin Pediatr Neurol* 2005; 12(2): 106-113

27. Bialer M. New antiepileptic drugs that are second generation to existing antiepileptic drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15(6): 637–647
28. Pečar S, Mravljak J. Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Poglavlje 10.1: Definicija oksidativnega stresa. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2015: 200-201
29. Mravljak J. Radikali in oksidativni stres. *Farm Vestn* 2015; 66(2): 127-132
30. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262(5134): 689-695
31. Waldbaum S, Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? *J Bioenerg Biomembr* 2010; 42(6): 449-455
32. Blair RE, Sombati S, Lawrence DC, McCay BD, DeLorenzo RJ. Epileptogenesis causes acute and chronic increases in GABA_A receptor endocytosis that contributes to the induction and maintenance of seizures in the hippocampal culture model of acquired epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310(3): 871-880
33. Morris TA, Jafari N, Rice AC, Vasconcelos O, DeLorenzo RJ. Persistent increased DNA-binding and expression of serum response factor occur with epilepsy-associated long-term plasticity changes. *J Neurosci* 1999; 19(19): 8234-8243
34. Pitkanen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol* 2011; 10(2): 173-186
35. Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(12): 1951-1962
36. Pitkanen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav* 2009; 14 Suppl 1: 16-25
37. Valko M; Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84
38. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59(5): 1609-1623
39. Chuang YC. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. *Acta Neurol. Taiwan* 2010; 19(1): 3-15
40. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th Ed., Chapter 4: Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. Oxford University Press. New York. 2007: 187-267

41. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(3): 205-214
42. Yuksel A, Cengiz M, Seven M, Ulutin T. Changes in the antioxidant system in epileptic children receiving antiepileptic drugs: two-year prospective studies. *J Child Neurol* 2001; 16(8): 603-606.
43. Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin. Chim Acta* 2001; 303(1-2): 19-24
44. Pandey MK, Mitra P, Maheshwari PK. The Lipid Peroxidation Product as a Marker of Oxidative Stress in Epilepsy. *J Clin Diagn Res* 2012; 6(4): 590-592
45. Hamed SA, Abdellah MM, El-Melegy N. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *J Pharmacol Sci* 2004; 96(4): 465-473
46. Nemade ST, Melinkeri RR. Oxidative and Antioxidative Status in Epilepsy. *Pravara Med Rev* 2010; 2(4): 8-10
47. Mehmet UÇ, Sefer V, Yavuz Y, Eşref A, Tahsin Ç, Adalet A, Hatice Y, Mehmet UA. Serum paraoxonase-1 activities and malondialdehyde levels in patients with epilepsy. *Dicel Med J* 2012; 39(4): 557-560
48. Lopez J, Gonzalez ME, Lorigados L, Morales L, Riveron G, Bauza JY. Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. *Clinical biochemistry* 2007; 40(5-6): 292-298
49. Menon B, Ramalingam K, Kumar RV. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. *Seizure* 2012; 21(10): 780-784
50. Ercegovic M, Jovic N, Simic T, Beslac-Bumbasirevic L, Sokic D, Djukic T, Savic-Radojevic A, Matic M, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovic M. Byproducts of protein, lipid and DNA oxidative damage and antioxidant enzyme activities in seizure. *Seizure* 2010; 19(4): 205-210
51. Verrotti A, Basciani F, Trotta D, Pomilio MP, Morgese G, Chiarelli F. Serum copper, zinc, selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in epileptic children before and after 1 year of sodium valproate and carbamazepine therapy. *Epilepsy Res* 2002; 48(1-2): 71-75
52. Aycicek A, Iscan A. The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. *Eur Neurol* 2007; 57(2): 65-69

53. Verrotti A, Scardapane A, Franzoni E, Manco R, Chiarelli F. Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid. *Epilepsy Res* 2008; 78(2-3): 171-177
54. Arhan E, Serdaroglu A, Ozturk B, Ozturk HS, Ozcelik A, Kurt N, Kutsal E, Sevinc N. Effects of epilepsy and antiepileptic drugs on nitric oxide, lipid peroxidation and xanthine oxidase system in children with idiopathic epilepsy. *Seizure* 2011; 20(2): 138-142
55. Zhang YJ, Zhang M, Wang XC, Yu YH, Jin PJ, Wang Y. Effects of sodium valproate on neutrophils' oxidative metabolism and oxidant status in children with idiopathic epilepsy. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2011; 49(10): 776-781
56. Yis U, Seckin E, Kurul SH, Kuralay F, Dirik E. Effects of epilepsy and valproic acid on oxidant status in children with idiopathic epilepsy. *Epilepsy Res* 2009; 84(2-3): 232-237
57. Martinc B, Grabnar I, Vovk T. Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of the Current Status. *Curr Neuropharmacol* 2014; 12(6): 527-550
58. Menon B, Ramalingam K, Kumar RV. Low plasma antioxidant status in patients with epilepsy and the role of antiepileptic drugs on oxidative stress. *Ann Indian Acad Neurol* 2014; 17(4): 398-404
59. Kurekci AE, Alpay F, Tanindi S, Gokcay E, Ozcan O, Akin R, Isimer A, Sayal A. Plasma trace element, plasma glutathione peroxidase, and superoxide dismutase levels in epileptic children receiving antiepileptic drug therapy. *Epilepsia* 1995; 36(6): 600-604
60. Ashrafi MR, Shams S, Nouri M, Mohseni M, Shabani R, Yekaninejad MS, Chegini N, Khodadad A, Safaralizadeh R. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia* 2007; 48(9): 1750-1755
61. Gunes S, Dirik E, Yis U, Seckin E, Kuralay F, Kose S, Unalp A. Oxidant status in children after febrile seizures. *Pediatr Neurol* 2009; 40(1): 47-49
62. Santos NA, Medina WSG, Martins NM, Rodrigues MAC, Curti C, Santos AC. Involvement of oxidative stress in the hepatotoxicity induced by aromatic antiepileptic drugs. *Toxicol In Vitro* 2008; 22(8): 1820-1824
63. Lu W, Uetrecht JP. Peroxidase-mediated bioactivation of hydroxylated metabolites of carbamazepine and phenytoin. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36(8): 1624-1636
64. Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci* 2012; 130(1): 4-16

65. Hamed SA, Abdellah MM. Trace elements and electrolytes homeostasis and their relation to antioxidant enzyme activity in brain hyperexcitability of epileptic patients. *J. Pharmacol Sci* 2004; 96(4): 349-359
66. Schulpis KH, Lazaropoulou C, Regoutas S, Karikas GA, Margeli A, Tsakiris S, Papassotiriou I. Valproic acid monotherapy induces DNA oxidative damage. *Toxicology* 2006; 217(2-3): 228-232
67. Sobaniec W, Solowiej E, Kulak W, Bockowski L, Smigielska-Kuzia J, Artemowicz B. Evaluation of the influence of antiepileptic therapy on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in erythrocytes of children with epilepsy. *J Child Neurol* 2006; 21(7): 558-562
68. Yurekli VA, Naziroglu M. Selenium and topiramate attenuates blood oxidative toxicity in patients with epilepsy: a clinical pilot study. *Biol Trace Elem Res* 2013; 152(2): 180-186
69. Yuksel A, Cengiz M, Seven M, Ulutin T. Erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children with valproate and carbamazepine monotherapy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2000; 11(1): 73-81
70. Liu CS, Wu HM, Kao SH, Wei YH. Serum trace elements, glutathione, copper/zinc superoxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic patients with phenytoin or carbamazepine monotherapy. *Clin Neuropharmacol* 1998; 21(1): 62-64
71. Lu W, Uetrecht JP. Possible bioactivation pathways of lamotrigine. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(7): 1050-1056
72. Bolayir E, Celik K, Tas A, Topaktas S, Bakir S. The effects of oxcarbazepine on oxidative stress in epileptic patients. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004; 26(5): 345-348
73. Ozden H, Kabay SC, Toker A, Ustuner MC, Ozbayer C, Ustuner D, Gunes HV. The effects of levetiracetam on urinary 15f-2t-isoprostane levels in epileptic patients. *Seizure* 2010; 19(8): 514-516
74. Varoglu AO, Yildirim A, Aygul R, Gundogdu OL, Sahin YN. Effects of valproate, carbamazepine, and levetiracetam on the antioxidant and oxidant systems in epileptic patients and their clinical importance. *Clin neuropharmacol* 2010; 33(3): 155-157
75. Oliveira, AA, Almeida JP, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LM, Junior HV, Fonseca FN, Viana GS, Sousa FC, Fonteles MM. Effects of levetiracetam in lipid

peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27(3): 395-406

76. Stettner M, Dehmel T, Mausberg AK, Kohne A, Rose CR, Kieseier BC. Levetiracetam exhibits protective properties on rat Schwann cells in vitro. *J Peripher Nerv Syst* 2011; 16(3): 250-260

77. Ha KY, Carragee E, Cheng I, Kwon SE, Kim YH. Pregabalin as a Neuroprotector after Spinal Cord Injury in Rats: Biochemical Analysis and Effect on Glial Cells. *J Korean Med Sci* 2011; 26(3): 404-411

78. Armagan A, Kutluhan S, Yilmaz M, Yilmaz N, Bulbul M, Vural H, Soyupek S, Naziroglu M. Topiramate and vitamin e modulate antioxidant enzyme activities, nitric oxide and lipid peroxidation levels in pentylenetetrazol-induced nephrotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103(2): 166-170

79. Kutluhan S, Naziroglu M, Celik O, Yilmaz M. Effects of selenium and topiramate on lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in blood of pentylenetetrazol-induced epileptic rats. *Biol Trace Elem Res* 2009; 129(1-3): 181-189

80. Kubera M, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Basta-Kaim A, Leskiewicz M, Tetich M, Maes M, Kenis G, Marciniak A, Czuczwar SJ, Jagla G, Nowak W, Lason W. Effect of topiramate on the kainate-induced status epilepticus, lipid peroxidation and immunoreactivity of rats. *Polish J Pharmacol* 2004; 56(5): 553-561

81. Cardenas-Rodriguez N, Coballase-Urrutia E, Huerta-Gertrudis B, Garcia-Cruz ME, Pedraza-Chaverri J, Coria-Jimenez R, Bandala C, Ruiz-Garcia M. Antioxidant activity of topiramate: an antiepileptic agent. *Neurol Sci* 2013; 34(5): 741-747

82. Cardenas-Rodriguez N, Coballase-Urrutia E, Rivera-Espinosa L, Romero-Toledo A, Sampieri A, Ortega-Cuellar D, Montesinos-Correa H, Floriano-Sanchez E, Carmona-Aparicio L. Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproic acid, oxcarbazepine, and topiramate): evidence in humans and experimental models. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 598493

83. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126

84. Karakucua C, Ustdala M, Ozturkb A, Baskola G, Saraymena R. Assessment of DNA damage and plasma catalase activity in healthy term hyperbilirubinemic infants receiving phototherapy. *Mutation Research* 2009; 680: 12-16

85. <http://www.randox.com/superoxide-dismutase-ransod/>

86. <http://www.randox.com/glutathione-reductase/>

87. <http://www.randox.com/glutathione-peroxidase-ransel/>
88. Ramšak J. Analiza karbamazepina, okskarbazepina in njunih presnovkov v krvni plazmi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti: razvoj in validacija metode. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2016
89. Beznec T. Razvoj enostavne analizne metode za terapevtsko spremljanje koncentracije valprojske kisline v posušeni krvni madeži. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2015
90. Šturm A. Razvoj in validacija analizne metode za kvantifikacijo levetiracetama v plazmi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2012
91. Grdešič P. Razvoj in validacija analizne metode za sočasno določanje plazemskih koncentracij protiepileptičnih učinkovin druge generacije s tekočinsko kromatografijo. Diplomatska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011
92. Milosheška D, Vovk T, Grabnar I, Roškar R. Simple and Sensitive High Performance Liquid Chromatography Method with Fluorescence Detection for Therapeutic Drug Monitoring of Topiramate. *Acta Chim Slov* 2015; 62: 411-419
93. Abdi H. Holm's Sequential Bonferroni Procedure. In Neil Salkind (Ed.), *Encyclopedia of Research Design*. Thousand Oaks, CA: Sage. 2010; 1-8
94. Patel, M.N. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy. *Free Radic Res* 2002. 36(11): 1139-1146
95. Martinc B, Grabnar I, and Vovk T. The role of reactive species in epileptogenesis and influence of antiepileptic drug therapy on oxidative stress. *Curr Neuropharmacol* 2012; 10(4): 328-343.
96. Martinc B. Spremljanje zdravljenja epilepsije z zdravili in vloga nekaterih kazalcev oksidativnega stresa. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2015: 151-190
97. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th Ed., Chapter 3: Antioxidant defences: endogenous and diet derived. Oxford University Press. New York 2007: 79-186
98. Erakovic V, Zupan G, Varljen J, Laginja J, Simonić A. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. *Neurosci Res* 2000; 36(2): 157-166

99. Pečar S, Mravljak J. Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Poglavje 9.3: Encimi antioksidanti in glutation. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2015: 144-158
100. Rumia J, Marmol F, Sanchez J, Gimenez-Crouseilles J, Carreno M, Bargallo N, Boget T, Pintor L, Setoain X, Donaire A, Saez GT, Ribalta T, Ferrer E, Puig-Parellada P. Oxidative stress markers in the neocortex of drug-resistant epilepsy patients submitted to epilepsy surgery. *Epilepsy Res* 2013; 107(1-2): 75-81
101. Arroyo S, Anhut H, Kugler AR, Lee CM, Knapp LE, Garofalo EA, Messmer S. Pregabalin add-on treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response study in adults with partial seizures. *Epilepsia* 2004; 45(1): 20-27.
102. Berry D, Millington C. Analysis of pregabalin at therapeutic concentrations in human plasma/serum by reversed-phase HPLC. *Ther Drug Monit* 2005; 27(4): 451-456.
103. Sołowiej E, Sobaniec W. The effect of antiepileptic drug therapy on antioxidant enzyme activity and serum lipid peroxidation in young patients with epilepsy. *Neurol Neurochir Pol* 2003; 37(5): 991–1003
104. Aycicek A, Iscan A. The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. *Eur Neurol* 2007; 57(2): 65-69
105. Ueda Y, Doi T, Takaki M, Nagatomo K, Nakajima A, Willmore LJ. Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: in vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. *Brain Res* 2009; 1266: 1-7
106. Kelemen A, Rásonyi G, Neuwirth M, Barcs G, Szucs A, Jakus R, Fabó D, Juhos V, Pálffy B, Halász P. Our clinical experience with zonisamide in resistant generalized epilepsy syndromes. *Ideggyogy Sz* 2011; 64(5-6): 187-192