

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA MIKELJ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA MIKELJ

**SPREMLJANJE OKSIDATIVNEGA STRESA V CELICAH THP-1,
IZPOSTAVLJENIH PROTIEPILEPTIČNIM UČINKOVINAM**

**EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS IN THP-1 CELLS
EXPOSED TO ANTIEPILEPTIC DRUGS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Tomažu Vovku, mag. farm., za dragoceni čas, znanje in usmerjanje med nastajanjem magistrske naloge. Hvala Nevenki Lilik, ing. kem., za prijazne nasvete in pomoč pri delu s celicami. Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm., ter doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm., za izvedbo analiz na LC-MS/MS. Najlepša hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Iskrena hvala družini, Kristjanu in vsem najbližjim za pomoč in podporo v času študija ter lepe spomine.

Lepo je priti do konca poti, a najpomembnejša je vendarle pot. (Ursula LeGuin)

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izvedla pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.

Neža Mikelj

Predsednica izpitne komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Član izpitne komisije: asist. dr. Nejc Horvat, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO PREGLEDNIC.....	II
KAZALO ENAČB.....	III
KAZALO SLIK.....	III
POVZETEK.....	V
ABSTRACT.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1. UVOD.....	1
1.1 EPILEPSIJA.....	1
1.2 ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE EPILEPSIJE.....	2
1.2.1 Karbamazepin.....	3
1.2.2 Valprojska kislina.....	4
1.2.3 Topiramet.....	4
1.2.4 Levetiracetam.....	5
1.2.5 Pregabalin.....	6
1.3 RADIKALI IN REAKTIVNE SNOVI.....	6
1.4 OKSIDATIVNI STRES.....	8
1.5 MITOHONDRIJSKI ELEKTRONSKI TRANSPORT IN REAKTIVNE SNOVI.....	9
1.6 OBRAMBNI MEHANIZMI PRED REAKTIVNIMI SNOVMI.....	10
1.7 DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA.....	12
1.8 OKSIDATIVNI STRES IN CENTRALNI ŽIVČNI SISTEM.....	14
2. NAMEN IN POTEK DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE.....	17
3.1 MATERIALI.....	17
3.2 METODE.....	21
3.2.1 Izpostavitve celic THP-1 protiepileptičnim učinkovinam.....	21
3.2.2 Določanje neencimskega antioksidanta: glutation.....	23
3.2.3 Določanje encimskih antioksidantov: katalaza.....	25
3.2.4 Določanje encimskih antioksidantov: superoksidna dismutaza.....	27
3.2.5 Določanje encimskih antioksidantov: glutation peroksidaza.....	29
3.2.6 Označevalec lipidne peroksidacije: malondialdehid.....	29
3.2.7 Obdelava podatkov.....	34
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	35
4.1 PRIMERJAVA OZNAČEVALCEV OKSIDATIVNEGA STRESA PO 1., 2. IN 3. TEDNU TRETIRANJA.....	35

4.1.1 Katalaza po 1., 2. in 3. tednu tretiranja	35
4.1.2 Superoksidna dismutaza po 1., 2. in 3. tednu tretiranja	35
4.1.3 Malondialdehid po 1., 2. in 3. tednu tretiranja.....	36
4.2 PRIMERJAVA OZNAČEVALCEV OKSIDATIVNEGA STRESA PO TRITEDENSKEM TRETIRANJU CELIC S PROTIEPILEPTIČNIMI UČINKOVINAMI	36
4.2.1 Primerjava monotretiranj	36
4.2.2 Primerjava politretiranj	38
4.2.3 Primerjava monotretiranj in politretiranj	41
5. SKLEPI.....	46
6. LITERATURA.....	48
7. PRILOGA	53
7.1 REZULTATI MERITEV OZNAČEVALCEV OKSIDATIVNEGA STRESA PO 3. TEDNU NORMIRANI NA NETRETIRANE KONTROLE	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Pogoste reaktivne kisikove snovi.....	7
Preglednica II: Uporabljeni standardi.	17
Preglednica III: Reagenti in topila.	17
Preglednica IV: Sestava medijev za gojenje celic.....	18
Preglednica V: Laboratorijska oprema.....	19
Preglednica VI: Koncentracije PEU v medijih s katerimi smo tretirali celice.	21
Preglednica VII: Priprava reagentov za določanje GSH.	23
Preglednica VIII: Priprava standardov GSH in GSSG.....	24
Preglednica IX: Nastavitve masnega analizatorja za analizo GSH in GSSG.....	25
Preglednica X: Priprava reagentov za meritve katalaze.....	26
Preglednica XI: Priprava standardov za merjenje SOD.	27
Preglednica XII: Priprava reagentov za merjenje MDA.	30
Preglednica XIII: Priprava standardov MDA.....	31
Preglednica XIV: Shema gradientne elucije.	32
Preglednica XV: Nastavitve masnega analizatorja.	33
Preglednica XVI: Relativna aktivnost CAT v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.	53
Preglednica XVII: Relativna aktivnost SOD v celicah v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.	53
Preglednica XVIII Relativna aktivnost GPx v celicah v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.	54

Preglednica XIX: Relativna vrednost MDA v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.	54
Preglednica XX: Relativna vrednosti GSH v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.	54
Preglednica XXI: Relativne vrednosti GSSG v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.	55
Preglednica XXII: Relativna vrednost razmerja GSH/GSSG v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.	55

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun koncentracije celic s hemocitometrom.	22
Enačba 2: Izračun naklona premice za aktivnost CAT.	26
Enačba 3: Sprememba absorbance formazana v prvih treh minutah merjenja	28
Enačba 4: Določanje odstotka inhibicije nastajanja formazana.	28

KAZALO SLIK

Slika 1: Karbamazepin.	4
Slika 2: Valprojska kislina.	4
Slika 3: Topiramet.	5
Slika 4: Levetiracetam.	6
Slika 5: Pregabalin.	6
Slika 6: Fentonova reakcija.	8
Slika 7: Nastajanje superoksidnega radikala zaradi uhajanja elektronov pri mitohondrijskem elektronskem transportu	9
Slika 8: Oksidirani glutation.	11
Slika 9: Prepletenost encimov.	11
Slika 10: Metode za določanje oksidativnega stresa.	13
Slika 11: Prikaz reakcij ksantin oksidaze in SOD.	27
Slika 12: Kumen hidroperoksid.	29
Slika 13: Shema reakcij, ki ju katalizirata GPx in GR.	29
Slika 14: Malondialdehid.	30
Slika 15: DNPH.	30
Slika 16: Relativne aktivnosti CAT glede na netretirane kontrole po 1., 2. in 3. tednu tretiranja s PEU.	35
Slika 17: Relativne aktivnosti SOD glede na netretirane kontrole po 1., 2. in 3. tednu tretiranja s PEU.	35

Slika 18: Relativne koncentracije MDA glede na netretirane kontrole po 1., 2. in 3. tednu tretiranja s PEU.....	36
Slika 19: Relativne aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava prve in druge generacije.	37
Slika 20 : Relativne aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava posameznih PEU.....	37
Slika 21: Relativne aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava kombinacije CBZ-VPA z drugimi kombinacijami.	39
Slika 22: Relativne aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava kombinacije CBZ-VPA, drugih kombinacij s CBZ in drugih kombinacij z VPA.	40
Slika 23: Relativna aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava monotretiranj in politretiranj.....	41
Slika 24: Relativna aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava monotretiranj in kombinacij.....	42
Slika 25: Relativna aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava tretiranj s CBZ, VPA in kombinacij PEU.	43

POVZETEK

Epilepsija je pogosta nevrološka motnja. V proces epileptogeneze naj bi bil vključen oksidativni stres, poleg tega pa naj bi ravnotežje med antioksidanti in oksidanti porušile tudi protiepileptične učinkovine (PEU), predvsem prva generacija PEU. V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti razlike med predstavniki prve in druge generacije PEU na nastanek oksidativnega stresa.

Celice monocitne linije THP-1 smo za tri tedne izpostavili mediju s terapevtskim koncentracijam PEU prve (valprojska kislina, karbamazepin) in druge (levetiracetam, pregabalin, topiramata) generacije ter kombinacijam. Z meritvami označevalcev oksidativnega stresa, in sicer označevalca lipidne peroksidacije (malondialdehid), neencimskega antioksidanta (glutation) ter encimskih antioksidantov (superoksidna dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza), smo želeli določiti obseg oksidativnega stresa.

S primerjavo označevalcev oksidativnega stresa, ki smo jih merili enkrat tedensko, tri tedne zapored, nismo dokazali, da se oksidativni stres pri celicah z daljšanjem izpostavljenosti PEU spreminja. Z označevalci, ki smo jih pomerili pri celicah, ki so bile izpostavljene PEU najdlje, to je tri tedne, smo dokazali, da PEU vplivajo na oksidativni stres. Pri primerjavi monotretiranj (celice izpostavljene samo eni učinkovini) smo dokazali razliko v glutationu, ki je bil zvišan pri tretiranjih s prvo generacijo PEU. Razlik med posameznimi predstavniki PEU nismo dokazali. Kombinacija karbamazepina in valprojske kisline je v primerjavi s kombinacijami PEU prve in druge generacije statistično značilno povečala glutacion in njegovo oksidirano obliko. Nadalje smo dokazali razlike v glutationskem sistemu in malondialdehidu med kombinacijami s karbamazepinom in kombinacijami z valprojsko kislino, pri čemer so bile vrednosti povišane pri tretiranjih z valprojsko kislino. Med tretiranjimi nismo dokazali razlik v aktivnosti katalaze in superoksidne dismutaze, superoksidna dismutaza je bila statistično značilno povišana le pri primerjavi monotretiranj in politretiranj (celice izpostavljene kombinaciji učinkovin). Pri primerjavi teh dveh skupin smo dokazali tudi razlike v aktivnosti glutacion peroksidaze in razmerju GSH/GSSG. Statistično značilne razlike v glutationskem sistemu ter malondialdehidu smo dokazali tudi med monotretiranjimi z drugo generacijo PEU in kombinacijami učinkovin valprojske kisline z drugo generacijo PEU. Označevalci oksidativnega stresa so bili bolj povišani pri kombinacijah z valprojsko kislino kot pri kombinacijah s karbamazepinom.

Ključne besede: epilepsija, oksidativni stres, protiepileptične učinkovine, prva generacija, druga generacija

ABSTRACT

Epilepsy is a common neurological disorder. It is likely that oxidative stress is included in the process of epileptogenesis and, additionally, antiepileptic drugs (AED) presumably disrupt balance between oxidants and antioxidants, in particular the first generation of AED. The purpose of the master thesis was to determine the differences between the representatives of the first and second generation of AEDs on the formation of the oxidative stress.

The monocytic cell line THP-1 was exposed to the medium with therapeutic concentrations of first (valproic acid, carbamazepine) and second (levetiracetam, pregabalin, topiramate) generation AEDs and combinations for three weeks. By measuring markers of oxidative stress, namely the marker of lipid peroxidation (malondialdehyde), non-enzymatic antioxidant (glutathione) and enzymatic antioxidant (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase), we wanted to determine the extent of oxidative stress.

By comparing markers of oxidative stress measured once a week, three weeks in a row, we could not demonstrate any change of oxidative stress through time. Markers in cells that were exposed to the AEDs for three weeks, demonstrate that AEDs have effect on oxidative stress. When comparing the exposure to an individual AED, we have confirmed the difference in the glutathione, which was higher in the cells exposed to first generation AEDs. However, there was no differences between various representatives of the AEDs. The combination of carbamazepine and valproic acid statistically significantly increased glutathione and its oxidized form compared with combinations of the first and second generation AEDs. Furthermore, we have shown the difference in the glutathione system and malondialdehyde between the combinations with carbamazepine and combinations with valproic acid, wherein the values were higher in treatments with valproic acid. We have not demonstrated the differences in activity of catalase and superoxide dismutase among treatments as the superoxide dismutase was significantly increased solely by comparison between cells exposed to one AED and cells exposed to combinations of AEDs. When comparing these two groups, differences in the activity of glutathione peroxidase and in the ratio GSH/GSSG have been shown. We have also proved statistically significant differences in glutathione system and malondialdehyde when comparing treatments with second generation AEDs and combinations of valproic acid with the second generation AEDs. Markers of oxidative stress were more elevated by combinations with valproic acid as combinations with carbamazepine.

Key words: *epilepsy, oxidative stress, antiepileptic drugs, first generation, second generation*

SEZNAM OKRAJŠAV

1gPEU	prva generacija protiepileptičnih učinkovin
2gPEU	druga generacija protiepileptičnih učinkovin
8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksigvanozin
AMPA	2-amino-3-hidroksi-5-metil izooksazol propionska kislina
ATP	adenozin trifosfat
CAT	katalaza
CBZ	karbamazepin
CBZ-2gPEU	karbamazepin v kombinaciji s protiepileptičnimi učinkovinami druge generacije
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EPR (ESR)	elektronska paramagnetna (spinska) resonanca
ESI	elektrozprševalna ionizacija (<i>ang. electrospray ionization</i>)
FBS	fetalni goveji serum
G6PD	glutation-6-fosfat dehidrogenaza
GABA	gaba-aminomaslena kislina
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation, reducirana oblika
GSSG	glutation, oksidirana oblika
HNE	4-hidroksinonenal
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>ang. High Pressure Liquid chromatography</i>)
INT	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid
LAF	laminarni pretok zraka (<i>ang. laminar air flow</i>)
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LEV	levetiracetam
MDA	malondialdehid
MF	mobilna faza
NAD(P)H	nikotinamidadenindinukleotid(fosfat)
NMDA	N-metil-D-aspartat
Nrf2	jedrni dejavnik, povezan z eritroidom 2

NTC	netretirane celice oziroma celice v PBS
OS	oksidativni stres
PBS	fosfatni pufer
PEU	protiepileptične učinkovine
PEZ	protiepileptična zdravila
PRG	pregabalin
RNK	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove snovi
RPM	obrati na minuto
RS	reaktivne snovi
SOD	superoksid dismutaza
SRM	spremljanje zgolj starševskega in hčerinskega iona pri MS (<i>angl. selected reaction monitoring</i>)
SV2A	sinaptični veziklov glikoprotein
TCA	trikloroacetna kislina
TOP	topiramat
UV	ultravijolična svetloba
VPA	valprojska kislina
VPA-2gPEU	valprojska kislina v kombinaciji s protiepileptičnimi učinkovinami druge generacije

1. UVOD

1.1 EPILEPSIJA

Epilepsija je kronična nevrološka motnja z značilnimi ponavljajočimi se napadi, ki so posledica prekomerne električne aktivnosti možganskih celic (1). Trajni epizodni epileptični napadi s katerimi se kaže epilepsija so posledica nenormalnega proženja nevronov, ki je lahko lokalno ali pa se razširi po celotnih možganih. S to možgansko motnjo so povezane nevrobiološke, kognitivne, psihološke in socialne posledice. Pogosto ni prepoznavnega vzroka, lahko pa se razvije zaradi možganske poškodbe, travme, infekcije, tumorja ali zaradi podedovanih nevroloških sindromov (2, 3).

Klinična slika epilepsije je odvisna od funkcije prizadetega dela možganov in od tega, kako se električna aktivnost razširi. Tako se kaže v različnih oblikah — od kratkega pomanjkanja pozornosti do konvulzijskih napadov z izgubo zavesti, ki trajajo do nekaj minut. Klinična razvrstitev epilepsije opredeljuje dve večji kategoriji napadov: delne (parcialne/fokalne/žariščne) in generalizirane. Pri delnih napadih se nenormalna električna aktivnost pojavi lokalno in največkrat ostane lokalizirana po eni možganski polobli ter povzroča večinoma motorične, senzorične in vedenjske pojave. Generalizirani napadi nastanejo po celotnih možganih, vključujoč retikularni sistem, z nenormalno električno aktivnostjo obeh polobel. Značilna je takojšna izguba zavesti (2, 4).

1. **Delni napadi** so lahko:

- *preprosti* – zavest ni prizadeta, prisotni psihični simptomi, strah, halucinacije, rdečica, potenje, neprijeten okus in vonj;
- *kompleksni* – to so psihomotorni napadi za katere so značilni poslabšana zavest, strmenje, neodzivanje na preproste ukaze, ponavljajoči, nehotni gibi (žvečenje, stiskanje pesti);
- *sekundarno generalizirani* – napadi, ki se pričnejo na omejenem področju ene možganske poloble in se nato razširijo na obe polobli.

2. Pri **generaliziranih napadih** pa ločimo:

- *absence* – to so bežne izgube zavesti, s spremembo izraza na obrazu, strmenjem v prazno,
 - *tipični (petit mal)* so značilni pri otrocih, so kratkotrajni (10 sekund) in se pojavijo večkrat dnevno;
 - *atipični* trajajo dlje (minute) in lahko vključujejo klonične gibe;

- *mioklonične* - kratkotrajni, sunkoviti krči omejeni na posamezne dele telesa ali celotno telo;
- *klonične* – značilni pri dojenčkih in otrocih, poslabšanje zavesti in zmanjšanje mišičnega tonusa, ritmični krči;
- *tonični* - predvsem pri otrocih, padec zaradi povečanega tonusa ekstenzorskih mišic;
- *tonično-klonične (grand mal)* - začne se s krikom, nenadna popolna nezavest, tonična otrdelost in posledični padec z možnostjo poškodb, simetrično krčenje okončin, pogosto bolniku uide voda in blato;
- *atonične* - hipno zmanjšanje tonusa in izguba zavesti;
- in *neklasificirane napade* (4, 5).

Status epilepticus je urgentno stanje, ki je lahko en sam epileptični napad, ki traja več kot 5 minut, ali več napadov, med katerimi ni izboljšanja. Najpogostejši in najbolj ogrožajoč je tonično klonični *status epilepticus* (5, 6).

1.2 ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE EPILEPSIJE

Namen zdravljenja je preprečiti nadaljnje epileptične napade in ohraniti kakovostno življenje. Bolniki večinoma potrebujejo zdravila celo življenje, zato je zelo pomembno, da je neželenih učinkov čim manj. Protiepileptična zdravila (PEZ) se zaradi izogibanja neželenim učinkom, povezanih predvsem s centralnim živčnim sistemom, uvajajo z nizkim odmerkom, ki se kasneje povečuje. V primeru ko monoterapija ni odpravila napadov, se uporabi kombinacija PEZ (7). Strategija zdravljenja mora biti individualizirana glede na obliko epileptičnega napada/sindroma, prisotnost drugih bolezni, uporabo drugih zdravil, starost in življenjski slog. Nepravilna uporaba PEZ lahko tudi poslabša stanje (7, 8). Čeprav se za večino učinkovin ve, kako pretežno delujejo, se malo ve o patofiziologiji epilepsij in odpornosti posameznih bolnikov na določena zdravila (9).

Moderno zdravljenje epilepsije se je začelo z uporabo kalijevega bromida (10). Veliko protiepileptičnih učinkovin (PEU) je bilo odkritih empirično, na podlagi poskusov na živalskih modelih. Namen terapije je preprečiti nenormalne električne impulze, ne da bi vplivali na normalno prevajanje dražljajev.

Vsi mehanizmi delovanja PEU niso natančno pojasnjeni (7). Glavni mehanizmi delovanja PEU, ki predvsem inhibirajo generiranje in prevajanje akcijskega potenciala, so izboljšanje GABA-nergičnega prenosa in delovanje na natrijeve in kalcijeve ionske kanale. Drugi

mehanizmi pa so povezani z zaviranjem ekscitatornih prenosov – inhibicijo sproščanja glutamata ali blokiranjem glutamatnih receptorjev (2).

PEU razdelimo na tri generacije, ki se razlikujejo glede na čas odkritja (v oklepajih so navedene letnice začetka uporabe v Evropi):

1. generacijo: kalijev bromid (leta 1857), fenobarbital, fenitoin, primidon, sultiam, karbamazepin (l.1965), valprojska kislina (l. 1970);
2. generacijo: vigabatrin (l. 1989), okskarbazepin, lamotrigin, gabapentin, felbamat, topiramet (l. 1995), tiagabin, levetiracetam (l. 2000), pregabalin (l. 2005), zonisamid, stiripentol, rufinamid (l. 2007);
3. generacijo: eslikarbazepin (l. 2010), lakozamid, retigabin (ezogabin) (l. 2011).

Novejše učinkovine imajo manj neželenih učinkov, manj interakcij z drugimi učinkovinami in bolj predvidljivo farmakokinetiko (11).

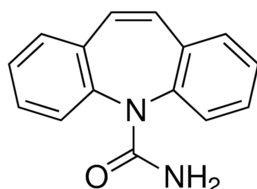
V eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali karbamazepin, valprojsko kislino, topiramet, levetiracetam in pregabalin, ki so ene izmed najpogosteje uporabljenih PEU v terapiji. Obseg oksidativnega stresa so zato v predhodnih študijah največkrat preučevali v povezavi z uporabo teh petih PEU, za katere so na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko tudi razvili analizne metode.

1.2.1 Karbamazepin

Karbamazepin (CBZ, slika 1) je derivat tricikličnih antidepresivov, njegovo protiepileptično delovanje pa je bilo odkrito na podlagi rutinskega presejalnega testa na miših. Učinkovit je pri zdravljenju delnih in generaliziranih tonično-kloničnih napadov, uporablja pa se tudi za zdravljenje nevropatske bolečine. CBZ je odsvetovan pri zdravljenju absenc, miokloničnih napadov in idiopatske generalizirane epilepsije (2, 7, 8). Učinek naj bi bil povezan z blokado natrijevih kanalov. S stabilizacijo in podaljšanjem neaktivnega stanja natrijevega kanala naj bi zmanjšal prevajanje signala (10) in tako zaviral nevronske vzdraženje in zmanjšal širjenje ekscitacijskih impulzov. Terapevtska koncentracija je od 20 do 50 $\mu\text{mol/L}$ (12).

Dobro se absorbira, razpolovni čas v plazmi je 30 ur, ki pa se zaradi indukcije jetrnih mikrosomalnih encimov po večkratnem odmerjanju zmanjša. CBZ spodbuja aktivnost citokrom P450 encimov in encimov vključenih v glukuronidacijo (2). Tako vpliva na hitrejšo presnovo mnogih PEU in drugih učinkovin, ki se presnavljajo v jetrih (2, 9). Ob ukinitvi

zdravila, ki inducira encime, se lahko plazemska koncentracija drugega zdravila zviša tudi do toksične koncentracije. Zdravljenje se navadno začne z nižjimi odmerki, ki se potem višajo, da se izognejo z odmerkom povezani toksičnosti. Resnejši neželeni učinki so depresija kostnega mozga, nevtropenija in hiperobčutljivostne reakcije (2).

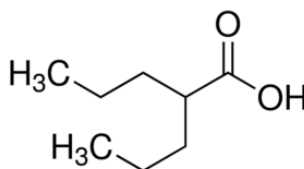


Slika 1: Karbamazepin.

1.2.2 Valprojska kislina

Valprojska kislina (VPA, slika 2) oziroma njena sol, natrijev valproat, je zdravilo izbire pri generalizirani epilepsiji in nerazvrščenih epilepsijah, učinkovita pa je tudi pri zdravljenju bipolarnе depresivne motnje. Deluje prek različnih mehanizmov, inhibira tudi ponovni privzem inhibitornega nevrottransmitterja GABA-e in njegov metabolizem preko različnih mehanizmov (zaviranja GABA transaminaze, glutamat dehidrogenaze) in s tem povečuje razpoložljivost GABA v možganih (2, 7, 9). Terapevtska koncentracija je od 350 do 700 $\mu\text{mol/L}$ (12).

Dobro se absorbira, razpolovni čas v plazmi je od 9 do 15 ur. 90 % učinkovine je vezane na plazemske beljakovine, metabolizem pa poteka večinoma v jetrih. Zavira metabolične procese in zviša koncentracije nekaterih PEZ ob sočasnem jemanju (5). Najbolj resen neželeni učinek je hepatotoksičnost. Je teratogena, povzročča *spino bifido* (okvara nevrálne cevi pri plodu), predvsem pri višjih odmerkih in kot del politerapije, zato ni primerna za terapijo epilepsije pri ženskah v rodni dobi. Povzročča tudi tanjšanje in izpadanje las (2, 7, 8).



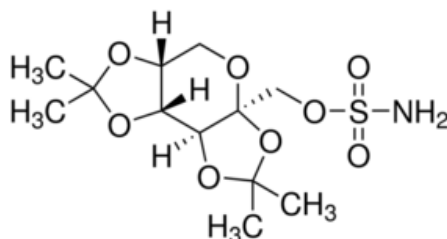
Slika 2: Valprojska kislina.

1.2.3 Topiramát

Topiramát (TOP, slika 3) je učinkovit pri samostojnem zdravljenju miokloničnih napadov in idiopatskih generaliziranih epilepsij, kot dodatno zdravljenje pa pri preprečevanju

žariščnih napadov, generaliziranih tonično-kloničnih napadov in absencah, uporablja pa se ga tudi pri terapiji migrene (7, 8). Terapevtska koncentracija je od 15 do 60 $\mu\text{mol/L}$ (12).

Mehanizem delovanja ni točno pojasnjen, deluje na različne tarče: z vezavo na natrijeve in kalcijeve kanale ter poveča aktivnost GABA-e (9, 10). Najpogostejši neželeni učinki so zaspanost, slabost, izguba teže, psihomotorna upočasnjenost in zmedenost (13). Pri bolnikih, ki so nagnjeni k ledvičnim kamnom, je potrebna pazljivost, saj topiramate poveča tveganje za nastanek ledvičnih kamnov (7, 14).

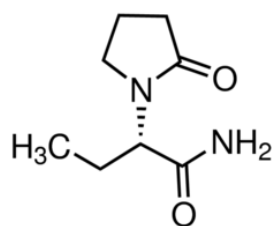


Slika 3: Topiramate.

1.2.4 Levetiracetam

Levetiracetam (LEV, slika 4) se za samostojno zdravljenje uporablja pri parcialnih epileptičnih napadih in kot dodatno zdravljenje pri generaliziranih tonično-kloničnih napadih in miokloničnih napadih (7, 8). Eksperimentalni podatki kažejo, da je glavni mehanizem delovanja vezava na SV2A – vezikularni membranski protein, ki se izraža v membrani sinaptičnega vezikla inhibitornih in ekscitatornih sinaps (10, 15). Terapevtska koncentracija je od 70 do 270 $\mu\text{mol/L}$ (12).

Po peroralni aplikaciji se skoraj popolnoma absorbira, ima linearno farmakokinetiko in na plazemske beljakovine se veže v zelo majhni količini (pod 10 %), zato je mogoče koncentracijo v plazmi titrirati na podlagi odmerka (16). Večinoma se odstranjuje s presnavljanjem v jetih (7). Najpogostejši neželeni učinki so zaspanost, astenija in omotičnost. Pri bolnikih s psihiatričnimi težavami v preteklosti, se lahko pojavijo motnje vedenja, na primer psihoze, agitacija, agresivnost (7, 17).

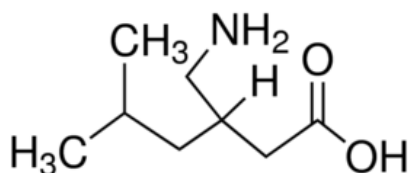


Slika 4: Levetiracetam.

1.2.5 Pregabalin

Pregabalin (PRG, slika 5) se uporablja za preprečevanje žariščnih napadov kot dodatno zdravilo ali za zdravljenje nevropatske bolečine, diabetične periferne nevropatije in anksioznostne motnje (7, 18). Veže se na alfa-2-delta podenoto napetostno odvisnega kalcijevega kanala presinaptičnega nevrona. Deluje samo na prekomerno vzdražene nevrone, kjer zmanjša sproščanje ekscitatornih neurotransmiterjev. Ne deluje na GABA receptorje, čeprav je strukturni analog GABA (19). Terapevtska koncentracija je od 5 do 90 $\mu\text{mol/L}$ (12).

Pregabalin ima visoko biološko uporabnost – več kot 90 %, na proteine se ne veže. Nespremenjen se v celoti izloča skozi ledvice, zato je pri bolnikih z ledvično insuficienco potrebna previdnost (7, 12). Pregabalin ima večino blage neželene učinke, najpogostejša pa sta zaspanost in omotica (18).



Slika 5: Pregabalin.

1.3 RADIKALI IN REAKTIVNE SNOVI

Radikali so atomi, ioni ali nevtralne spojine, ki imajo v zunanji elektronski ovojnici vsaj en nesparjen elektron (20) in so zaradi tega reaktivni (21). Glede na atom, kjer se najverjetneje nahaja nesparjen elektron, ločimo na primer kisikove, dušikove, žveplove ali ogljikove radikale (19). Izraz **reaktivne kisikove snovi** (ROS), *ang. reactive oxygen species*, združuje radikale in neradikalne molekule (20). V preglednici I je naštetih nekaj primerov ROS.

Reaktivne snovi (RS) so dušikove, kloridne, bromidne, žveplove snovi in druge (22). Da bi vzpostavili stabilne vezi, te zelo nestabilne reaktivne snovi sprožijo verižne reakcije z

odvzemanjem elektronov in tako poškodujejo biološke sestavine, na primer beljakovine, lipide, DNK (20, 21).

Preglednica I: Pogoste reaktivne kisikove snovi.

Reaktivne kisikove snovi	Radikali	Neradikalske snovi
	alkoksilni RO [•]	hidroperoksidi ROOH
	hidroksilni OH [•]	hipoklorna kislina HOCl
	hidroperoksilni HO ₂ [•]	ozon O ₃
	peroksilni RO ₂ [•]	singletni kisik O ₂ ¹
	superoksidni O ₂ ^{•-}	peroksinitrit ONOO ⁻
		vodikov peroksid H ₂ O ₂

(povzeto po 20)

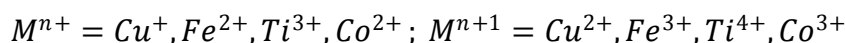
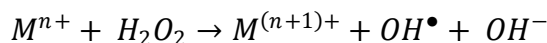
Odvisno od dela celice, reaktivne snovi vplivajo na: večjo prepustnost celične membrane, peroksidacijo molekul, oksidacijo GSH (20, 21), poškodbe DNK, tiolno oksidacijo proteinov, oksidacijo piridinskih nukleotidov, nepravilnosti pri prenosu dražljajev, modifikacijo razporeditve citoskeleta, nepravilnosti homeostaze ionov, inhibicijo glikolize, izčrpanje NADPH in ATP, upad mitohondrijskega membranskega potenciala in drugo (23). Najpomembnejše reaktivne kisikove snovi so superoksidni radikal, vodikov peroksid in hidroksilni radikal.

Superoksidni radikal nastane z redukcijo molekularnega kisika encimatsko (s pomočjo NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz) ali ne-encimatsko, na primer v mitohondrijski transportni verigi (24). V vodnih raztopinah je relativno neaktiven, zelo pa je reaktiven v organskih topilih (22). Čeprav sam ni zelo reaktiven, lahko na primer odvzame vodikov atom kateholaminom, DNK, RNK in maščobnim kislinam (25).

Vodikov peroksid nima nesparjenega elektrona in zato ni radikal. Fiziološko nastane iz približno 2 % celotnega kisika privzetega v telo. Veliko vodikovega peroksida nastane v mikrosomih in peroksisomih (26).

Hidroksilni radikal lahko nastane pod vplivom ionizirajočega sevanja, pod vplivom ozona in z reakcijo kovinskih ionov z H₂O₂ (22). Na redoks stanje celice pomembno vplivajo železo in druge prehodne kovine, ki so vezni v molekulah. Pod stresnimi pogoji se lahko kovine sprostijo in vstopijo v Fentonovo reakcijo (slika 6), pri kateri nastane zelo reaktiven hidroksilni radikal (26). Ker ima hidroksilni radikal kratek razpolovni čas (v vodnih raztopinah manj kot 1 ns) in kratko difuzijsko razdaljo, v citoplazmi ne more neposredno

poškodovati DNK, ampak reagira v bližini nastanka. V primeru, da nastane v jedru ali mitohondriju je genotoksičen (26, 27).



Slika 6: Fentonova reakcija.

1.4 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres (OS) je vrsta kemičnega stresa in patološko stanje, ki se pojavi zaradi porušenega ravnotežje med antioksidanti in reaktivnimi snovmi v korist slednjih, ki lahko potencialno povzročijo poškodbe (22, 23). Prevladovati začnejo spontane, enoelektronske oksidacije, s čimer se poruši prvotno in z antioksidanti nadzorovano ravnotežje med oksidacijami in redukcijami. Najprej je oksidativni stres za celico kemični stres, saj se poveča obseg nekataliziranih oksidacij do take mere, da je neobvladljiv in škodljiv ter lahko vpliva na celoten organizem (20).

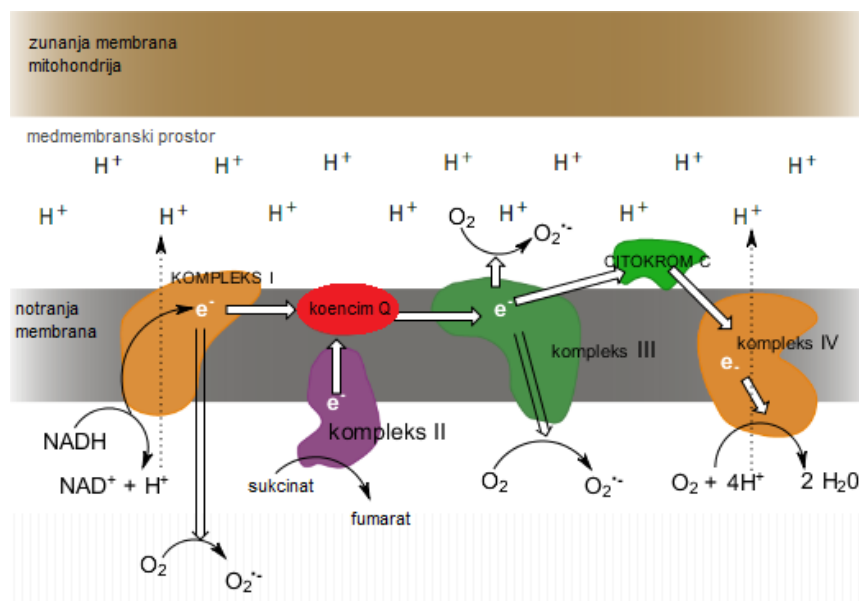
Povečanje oksidativnega stresa je možno zaradi fizikalnih (ionizirajoče, UV-sevanje), kemičnih (snovi, ki aktivirajo nastajanje radikalov, npr. ozon) ali bioloških (nosečnost, povečan mišični napor, bolezni) vzrokov. Porušeno ravnovesje je lahko zaradi poškodb celičnih organelov, manjše sposobnosti celičnega dihanja, sprememb v znotrajceličnem tlaku kisika in izpostavljenosti toksinom vzrok ali posledica pri različnih bolezenskih stanjih. Do upada antioksidantne zaščite lahko privede zmanjšan vnos in pomanjkanje esencialnih sestavin iz hrane pomembnih za zgradbo in obnavljanje antioksidantov (Cu, Zn, Mg, Fe, aminokislina, NADPH), pomanjkljiva sinteza ali biološka uporabnost antioksidantov (20, 22, 23). Endogeno reaktivne snovi nastajajo npr. v mitohondriju, preko elektronske transportne verige in pri reakciji NO-sintaze. Poleg tega nastajajo radikali tudi pri reakcijah s citokromi P450 in pri aktiviranih fagocitih (28).

Celice normalno tolerirajo blag oksidativni stres, ki se pogosto kaže s povečano obrambo, da bi se čimprej povrnilo fiziološko ravnotežje. Antioksidativna obrambna mreža mora odstraniti reaktivne snovi, da poškodbe ne nastajajo v preveliki meri in da jih je še vedno dovolj za njihove fiziološke vloge. Blag oksidativni stres lahko povzroči okrepitev obrambnih sistemov in tako celico zaščiti pred kasnejšim, hujšim oksidativnim stresom (22).

Posledice oksidativnega stresa so različne: povečana proliferacija (ob blagem povečanju oksidativnega stresa), prilagoditev celice oziroma organizma s povečanjem obrambnih sistemov ali celične poškodbe. Celica si lahko opomore z nadomeščanjem poškodovanih molekul, lahko preživi kljub poškodbam, a se ne deli več ali pa se sprožijo poti apoptoze in nekroze (22). Oksidativni stres naj bi bil vpleten pri več kot stotih boleznih, kot njihov vzrok ali posledica (28).

1.5 MITOHONDRIJSKI ELEKTRONSKI TRANSPORT IN REAKTIVNE SNOVI

Veliko ROS, predvsem superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$), nastane na dihalni verigi med prenosom elektronov na notranji mitohondrijski membrani (slika 7). Po ocenah naj bi $O_2^{\bullet-}$ nastal iz približno 0,1 % vsega kisika porabljenega s strani mitohondrijev. Iz transportne verige uidejo elektroni in se vežejo na kisik. Poškodbe mitohondrijskih kompleksov lahko povečajo izpuščanje kisika in nastajanje radikala. Kisik lahko uhaja predvsem med komponentami kompleksa I in III ali pa med kompleksom II in glicerol-3-fosfat dehidrogenazo.



Slika 7: Nastajanje superoksidnega radikala zaradi uhajanja elektronov pri mitohondrijskem elektronskem transportu (povzeto po 20).

Večina $O_2^{\bullet-}$ nastalega v mitohondrijih se sprosti v matriks, nekaj tudi v medmembranski prostor (20, 22). Ker v mitohondrijih nastane veliko reaktivnih snovi, ti organeli vsebujejo veliko antioksidantov na obeh straneh membran, kot so glutation (GSH), superoksidna dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) ... V matriksu mitohondrija je zato prisotna MnSOD, ki $O_2^{\bullet-}$ takoj pretvori v vodikov peroksid (26). Nastali peroksid je zaradi

Fentonove reakcije, v katero vstopi, bolj nevaren, ga pa po prehajanju v citosol lahko odstrani katalaza (20, 22).

1.6 OBRAMBNI MEHANIZMI PRED REAKTIVNIMI SNOVMI

Antioksidant je vsaka snov, ki zakasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo molekule (22). Antioksidanti nastajajo v telesu ali pa jih vnašamo s hrano, na primer vitamine (23). Po kemijski strukturi so lahko encimi ali neencimi. Antioksidativna obramba se glede na tkivo, tip celice in mesto v celici razlikuje (22).

Endogeni antioksidanti so glutation, tioli, bilirubin, sečna kislina, holesterol, albumini (23), transferin, laktoferin, ceruloplazmin, haptoglobin (22, 23) ter eksogene snovi, kot so askorbinska kislina, tokoferoli, polifenoli, bioflavonoidi in drugi, ki ohranjajo homeostazo predvsem z lovljenjem in nevtralizacijo radikalov. Pri tem nastajajo novi radikali, ki pa so stabilnejši in manj škodljivi (23).

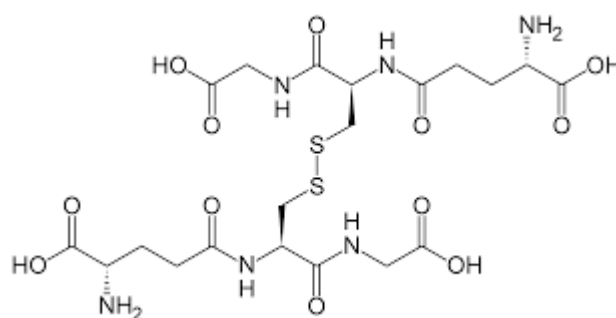
V celici so pomembni predvsem encimski antioksidanti. Trije najpomembnejši encimi, ki v evkariontski celici katalitično odstranjujejo ROS so superoksid dismutaze, katalaza in glutation peroksidaze. Različne celice in deli v celicah vsebujejo različne količine encimskih antioksidantov (29).

Pri celičnih procesih, kjer se porablja kisik (na primer dihalna veriga, fagocitoza, encimske oksidacije) nastaja superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$). Encim **superoksidna dismutaza** katalizira dismutacijo (disproporcionacijo) superoksidnega radikala, pri tem nastane vodikov peroksid in kisik (20, 22, 24). Različne oblike encima imajo v aktivnem centru različne kovinske ione. SOD s cinkom in bakrom se pretežno nahaja v citosolu, z manganom v mitohondriju, obstajajo pa tudi izooblike z železom in nikljem, ki omogočajo prenos elektrona iz ene molekule superoksidnega radikala na drugo (20, 26).

Katalaza je hemoprotein, ki se nahaja v celičnih organelih peroksisomih in katalizira direktni razpad vodikovega peroksida do kisika in vode (22, 26). Vodikov peroksid *in vivo* ni zelo reaktiven, v Fentonovi reakciji pa nastane bolj škodljiv hidroksilni radikal. Hidroksilni radikal sproži peroksidacijo maščobnih kislin, s tem lahko poškoduje lipidni dvosloj celične membrane in posledično vpliva na njene funkcije (22, 23).

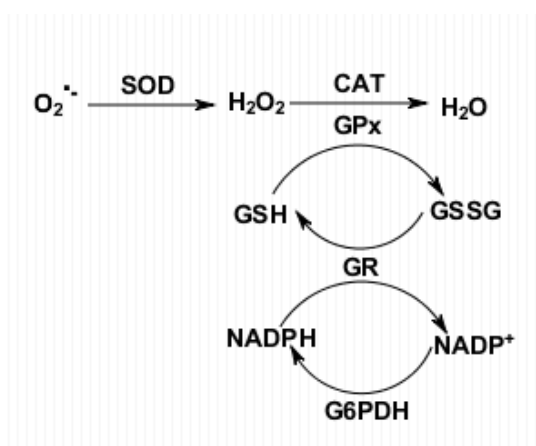
Glutation peroksidaza odstranjuje vodikov peroksid in organske perokside tako, da oksidira GSH, ki se pretvori v dimerno obliko glutation disulfid (GSSG, slika 8), pri tem nastane voda, v primeru organskih peroksidov tudi alkohol (26).

Glutation je tripeptid, ki je evkarionskih in prokarionskih celicah prisoten v mM koncentracijah in najbolj prispeva k redoks stanju v celici (22). Je glavni topni ne-encimatski antioksidant v celici, pomemben za obnavljanje sulfhidrilnih skupin. Poleg tega, da je kofaktor glutacion peroksidaze in drugih encimov, sodeluje pri prenosu aminokislin preko plazemske membrane, direktno lovi hidroksilne radikale in singletni kisik in regenerira antioksidante, kot sta vitamin C in E (26).



Slika 8: Oksidirani glutation.

Glutation reduktaza pretvori oksidirani glutation nazaj v GSH, pri čemer je donor vodika nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) (22). Prepletenost encimov, ki sodelujejo pri odstranjevanju ROS, je prikazana na sliki 9.



Slika 9: Prepletenost encimov.

Ob izpostavitvi ROS se zmogljivost obrambe lahko poveča. Poveča se lahko ekspresija DNK za encime, ki skrbijo za popravljanje oksidativnih poškodb bioloških makromolekul (28). Eden od pomembnih dejavnikov za uravnavanje količine encimskih antioksidantov naj bi bil nuklearni transkripcijski faktor (Nrf2). Pri homeostatskih pogojih je Nrf2 v citoplazmi, vezan na Keap1 (*ang. Kelch-like ECH-associated protein 1*), ki je na reaktivne snovi občutljiv, ker te oksidirajo cisteinske ostanke. Nrf2 ob izpostavitvi ROS disociira v jedro, se

veže na DNK sekvence in sproži transkripcijo genov, ki kodirajo encime, na primer SOD, GPx, hemoksigeno-1, NADPH-kinon oksidoreduktazo, in s tem uravnava nivo oksidantov (22, 30). Nrf2 uravnava nivo oksidantov v celici preko ekspresije encimov oziroma prenašalcev udeleženih pri metabolizmu, encimskih antioksidantov in signalnih proteinov (31). Glede na dokaze iz eksperimentalnih modelov bi lahko aktivacija Nrf2 predstavljala tarčo za zmanjševanje poškodb povzročenih z ROS (30).

1.7 DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA

Večina ROS je kratkoživih in jih ni mogoče meriti direktno, ena izmed izjem je vodikov peroksid. Posamezne radikale se lahko izmeri s pomočjo nedestruktivne spektroskopske tehnike, elektronske paramagnetne oziroma spinske resonance preko spinskih pasti. Posredno lahko ovrednotimo sledi radikalskih napadov na bioloških molekulah (*ang. fingerprinting*) (22). Posredno je mogoče oceniti količino ROS tudi glede na kapaciteto antioksidantov s kolorimetričnimi, imunološkimi in encimskimi metodami. Merjenje posameznih antioksidantov je časovno potratno, na rezultat pa lahko vplivajo tudi nepoznani antioksidanti ali sinergistično delovanje antioksidantov. Obseg poškodb povzročenih z ROS je lahko ustrežnejši za oceno oksidativnega statusa, saj ni nujno da nizek nivo antioksidantov pomeni povišano količino ROS (32).

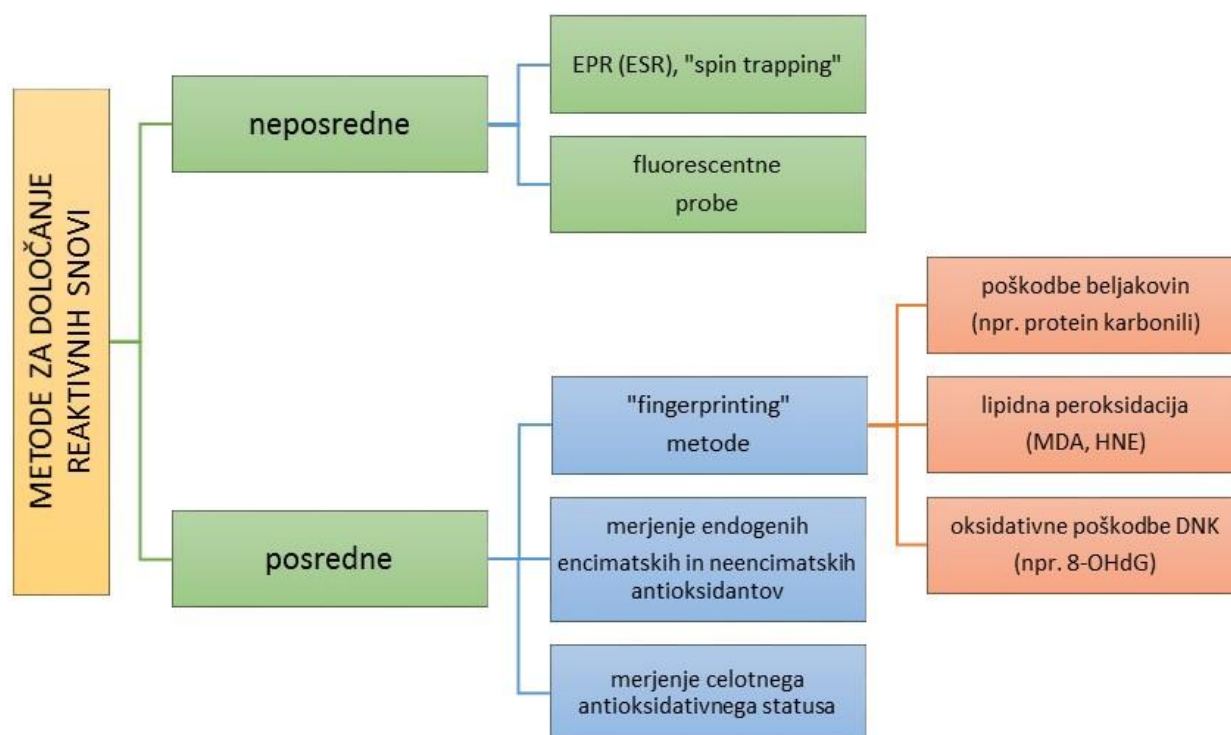
Reaktivne snovi lahko poškodujejo purinske, pirimidinske baze ali deoksiribozne sladkorje. Oksidacije lahko spremenijo zaporedje nukleinskih baz ali pa se zaradi tega veriga DNK pretrga. Dokler obseg poškodb dednega zapisa ni prevelik, se lahko to popravi. Nepopravljene poškodbe se lahko prenesejo na naslednjo generacijo. Večje poškodbe pa lahko vodijo v programirano celično smrt, apoptozo (20). Hidroksilni radikal oksidira gvanin do 8-hidroksigvanina. To je dober označevalec oksidativnega stresa in pomemben, ker je karcinogen in mutagen. Za določanje označevalca se uporabljajo HPLC metode (26). Ni primeren za kvantitativno določanje RS. Ustrežnejše je merjenje več produktov, npr. modificiranih baz, nastalih po napadu reaktivnih snovi na DNK (22).

Beljakovine (proteini) so polimerne molekule sestavljene iz aminokislin in imajo *in vivo* različne funkcije kot receptorji, protitelesa, encimi, strukturni in transportni proteini itd. Poškodba proteinov lahko nadalje vodi v poškodbo drugih proteinov in molekul. Za merjenje oksidativnih poškodb proteinov se običajno določa protein karbonile, ki nastanejo po oksidaciji aminokislinskih ostankov, z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) (22).

Membrane, ki obdajajo celice in organele vsebujejo veliko nasičenih ali nenasičenih maščobnih kislin. Tudi membrane možganskih celic vsebujejo veliko večkratnenasičenih maščobnih kislin. Lipidna peroksidacija se lahko prične z adicijo radikala ali z odvzemom vodika metilenski skupini. To lahko storijo naslednji radikali: hidroksilni radikal, peroksilni radikal, alkoksilni in ariloksilni, reaktivni C- radikal (npr. lipidni radikal), dušikov dioksid in peroksinitrit. Hidroksilni radikal zlahka sproži peroksidacijo maščobnih kislin, lipoproteinov in membran. Nastali hidroperoksidi, ki nastanejo, zaradi svoje polarnosti spremenijo strukturo in posledično funkcijo membrane. Oksidacije začete v membrani, pa se lahko razširijo še na beljakovine in DNK (20, 20).

Eni izmed označevalcev lipidne peroksidacije so končni produkti, na primer: F₂-izoprostan in aldehida - malondialdehid (MDA) ter 4-hidroksinonenal (HNE), ki se jih lahko določi z masno spektrometrijo (22, 23). MDA nastane pri peroksidaciji večkratnenasičenih maščobnih kislin z dvema ali več dvojnima vezema. MDA je mutagen v bakterijskih in sesalskih celicah in karcinogen pri podganah. Reagira z beljakovinami in z DNK bazami ter tvori adukte. V sesalskih tkivih se hitro metabolizira do acetaldehida in acetata (22). HNE je verjetno glavni toksični produkt lipidne peroksidacije. Je šibko mutagen (26).

Metode za določanje reaktivnih spojin oziroma oksidativnega stresa so prikazane na sliki 10.



Slika 10: Metode za določanje oksidativnega stresa (povzeto po 28).

1.8 OKSIDATIVNI STRES IN CENTRALNI ŽIVČNI SISTEM

Celice centralnega živčnega sistema potrebujejo veliko kisika in so zelo dovzetne za oksidativni stres, predvsem nevroni. Oksidativni stres lahko poškoduje tudi celice možganske-krvne pregrade in poveča njeno permeabilnost (22).

Nevroni so občutljivi na oksidativni stres zaradi:

- visoke prisotnosti Ca^{2+} ,
- povečane prisotnosti ekscitotoksičnih aminokislin (NMDA, AMPA, glutamat, aspartat, kainat)
- proizvodnja $\text{O}_2^{\bullet-}$ v nevronskih mitohondrijih, s starostjo so pogostejše mutacije v mitohondrijski DNK,
- nevrottransmiterjev, ki se lahko avtooksidirajo (dopamin, serotonin, noradrenalin)
- prehodnih kovinskih ionov (Mn, Fe, Cu), ki katalizirajo radikalne reakcije,
- lipidov živčnih membran, ki vsebujejo veliko nenasičenih maščobnih kislin;
- skromne antioksidativne obrambe, predvsem CAT,
- mikroglia lahko proizvaja RS in citokine, ki za vnetni odziv aktivirajo tudi astrocite (22, 34).

Oksidativni stres naj bi bil udeležen pri samem procesu epileptogeneze oziroma dodatno povečan med epileptičnimi napadi. Izvedenih je bilo veliko različnih študij, kjer so proučevali povezavo med PEZ/PEU in obsegom oksidativnega stresa, saj naj bi tudi terapija epilepsije vplivala na razmerje med oksidanti in antioksidanti, vendar povezava PEZ z oksidativnim stresom ni nedvoumno dokazana (35, 36, 37).

Večina poskusov in študij je preučevala vpliv prve generacije PEU, medtem ko je vpliv novejših učinkovin slabše opisan. Raziskave na živalskih modelih in bolnikih nakazujejo, da imajo oboji, epileptični napadi in PEU negativen učinek na zaščito z antioksidanti (38).

Mehanizmi pojava OS v povezavi z epilepsijo oziroma terapijo niso razjasnjeni. Na OS lahko vplivajo presnovki CBZ, VPA in fenobarbitala, ki se po oksidaciji kovalentno vežejo na biološke makromolekule (34). CBZ se presnavlja do več kot 30 metabolitov, med najpomembnejšimi je CBZ-10,11-epoksid, ki naj bi bil po nekaterih virih, poleg CBZ 2,3-epoksid in 3-hidroksi-CBZ, odgovoren za oksidativni stres (39). Nastajanje RS je torej lahko povzročeno z metaboliti PEU ali pa je s toksičnostjo povezana vezava metabolitov na biološke molekule. (40).

Dodatni dokazi, da uporaba protiepileptičnimi zdravili vpliva na oksidativni stres in z njim povezano toksičnost, bi bili pomembni za razvoj novih protiepileptičnih učinkovin, ki bi ohranile antikonvulzivno delovanje, brez prooksidativnih neželenih učinkov in bi hkrati delovale tudi nevroprotektivno preko antioksidativnega delovanja.

2. NAMEN IN POTEK DELA

Namen magistrskega dela je opredeliti vpliv protiepileptičnih učinkovin na nastanek oksidativnega stresa v celicah THP-1.

Celice bomo izpostavili terapevtskim koncentracijam PEU prve (CBZ, VPA) in druge generacije (TOP, LEV, PRG) ter kombinacijam (CBZ-VPA, CBZ-TOP, CBZ-LEV, CBZ-PRG, VPA-TOP, VPA-LEV, VPA-PRG) in ovrednotili razlike med učinkovinami glede na vrednosti označevalcev oksidativnega stresa.

Celice bodo PEU izpostavljene do treh tednov, dvakrat tedensko jih bomo šteli, redčili na primerno gostoto, pri čemer jim bomo enkrat tedensko zamenjali medij s svežim.

V celicah bomo določili:

- koncentracije malondialdehida (označevalec oksidativnih poškodb lipidov) z LC-MS/MS metodo,
- encimske antioksidante superoksidno dismutazo in glutation peroksidazo s komercialnimi metodami za določanje encimov in katalazo z metodo po Aebiju ter
- neencimski antioksidant glutation in njegovo reducirano obliko z LC-MS/MS metodo

Za ovrednotenje učinkov PEU na oksidativni status smo postavili naslednje hipoteze:

- I. Predstavnik prve generacije PEU povzročata večji oksidativni stres v celicah kot predstavniki druge generacije.
- II. Kombinacija PEU povzroča večji oksidativni stres v celicah kot izpostavitve le posameznim PEU.
- III. Oksidativni stres v celicah se z daljšanjem časa izpostavljenosti PEU spreminja.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Preglednica II: Uporabljeni standardi.

Standardi	Proizvajalec
Glutation, oksidiran (GSH)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Glutation, reduciran (GSSG)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Goveji serumski albumin	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Karbamazepin	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Levetiracetam	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
Malondialdehid (MDA) tetrabutylamonijeva sol	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Natrijev valproat	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Pregabalin	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
Topiramamat	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo

Preglednica III: Reagenti in topila.

Reagenti in topila	Proizvajalec
2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) raztopina s fosforno kislino (~0,2 M, 4 %)	Sigma-Aldrich Chemie; Steinheim, Nemčija
Acetonitril	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Amonijev acetat	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
DMSO (dimetilsulfoksid)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
EDTA (etilendiamintetraocetna kislina)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Etanol 70 %	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
H ₃ PO ₄	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Klorovodikova kislina (HCl) 37 %	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Komplet komercialne metode za določanje GPx - Ransel	Radox Laboratories Ltd, Združeno kraljestvo

Komplet komercialne metode za določanje SOD - Ransod	Radox Laboratories Ltd, Združeno kraljestvo
Metanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Mravljična kislina	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Natrijev hidroksid (NaOH)	Fluka Analytical; St. Louis, ZDA
Ocetna kislina, 100 %	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Trikloroocetna kislina (TCA)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Triptansko modrilo, 0,4 % raztopina (angl. Trypan Blue Solution)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Ultračista voda ^[1] , pridobljena z Milli Q – Advantage A10; specifična upornost 18,2 MΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) 5 µg/L	Millipore Corp., Billerica, MA
Vodikov peroksid (H ₂ O ₂) 30 % wt. vodna raztopina	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Vsebniki (T-flask) za gojenje celičnih kultur (75 in 150 cm ² rastne površine)	TPP Trasadingen, Švica

Preglednica IV: Sestava medijev za gojenje celic.

Medij za gojenje celic	Sestava	Proizvajalec
Medij za celice THP-1	500 ml medija RPMI 1640, HEPES Modification	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
	50 ml fetalni goveji serum (FBS)	Invitrogen; Auckland, Nova Zelandija
	5,5 ml L-glutamin	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
	5,5 ml antibiotik/antimikotik 100× (10 000 enot penicilina, 10 mg streptomicina in 25 µg amfotericina B na mL)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
	0,5 mL 50 mM 2-merkaptetanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA

¹ Ultračisto vodo smo uporabljali pri pripravi vseh reagentov in vzorcev, v nadaljevanju bomo uporabljali izraz: voda.

Dimetisulfoksid (DMSO)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Fosfatni pufer (<i>Dulbecco's</i> PBS) modificiran, brez MgCl ₂ in CaCl ₂	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA

Preglednica V: Laboratorijska oprema.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Analitična tehtnica	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Avtoklav A-21	Kambič laboratorijska oprema; Semič, Slovenija
Centrifuga	Centrifuge 5415R, Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija Megafuge 16R, Thermo Scientific
Centrifugirke	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Grelnik in stresalnik VORTEMP 56 EVC	Tehtnica; Železniki, Slovenija
Komora za štetje celic	Brand Neubauer (Blau Brand)
Hladilnik (+5 °C)	LTH; Škofja Loka, Slovenija
Inkubator	HERAUS Holding GmbH; Hanau, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop OLYMPUS CK40	Olympus Optical Co.; Hamburg, Nemčija
Komora z laminarnim pretokom zraka (LAF)	Iskra pio, Šentjernej, Slovenija
Krovna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija
LC-MS/MS Sistem Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jeatstream® LC/MS	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA
Mikrotiterski čitalec Safire2™ Genios	Tecan, Genios; Zürich, Švica
Mikrotitrne ploščice (96 vdolbin)	TPP; Trasadingen, Švica
Multikanalna pipeta (300 µL)	Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija
pH meter	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Polavtomatske pipete (100-1000 µL, 20-200 µL, 2-20 µL, 0,5-10 µL, 0,1- 2,5 µL)	Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija
Nastavki za pipete	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija

Serološke pipete (5, 10, 25 in 50mL)	TPP; Trasadingen, Švica
Serološke pipete za enkratno uporabo (za 5, 10, 25 in 50 mL)	TPP; Trasadingen, Švica
Steklovina: steklene čaše (25 in 250 mL); steklene bučke (5, 10, 25, 50, 100 in 250 mL); tehtiči	
Stresalnik Vibromix 403 Evit	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Škatle za zamrzovanje vzorcev	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Tehtnica AG 245	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Ultrazvočna kadička: Sonis 4	Iskra; Kranj, Slovenija
Vibracijski mešalnik Lab dancer,	Ika, Staufen, Nemčija
Vibracijski mešalnik Vibromix 10	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Vodna kopel	Memmert; Schwabach, Nemčija
Vsebniki za gojenje celic (T-flaski)	TPP; Trasadingen, Švica
Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje; Velenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80 °C)	Forma Scientific; Midland, ON, Kanada
Zamrzovalnik (-80 °C)	Sanyo Electric Co., Ltd.; Japonska

3.2 METODE

3.2.1 Izpostavitev celic THP-1 protiepileptičnim učinkovinam

3.2.1.1 Celična kultura THP-1

Za tretiranje s protiepileptičnimi učinkovinami smo izbrali suspenzijske, človeške monocitne levkemične celice linije THP-1, ki se lahko neomejeno delijo. Celična linija je izolirana iz periferne krvi eno leto starega bolnika z akutno monocitno levkemijo. Povprečni čas podvajanja je 35 do 50 ur (41).

3.2.1.2 Priprava raztopin PEU

Osnovne raztopine PEU smo pripravili v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komori) tako, da smo v sterilne mikrocentrifugirke ($V=1,5$ mL) zatehtali standarde in jih raztopili v primernem topilu. Raztopine smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Osnovne raztopine smo uporabili za pripravo medijev z dodatki PEU. Koncentracije učinkovin v medijih in topila, v katerih smo pripravili osnovne raztopine, so prikazani v preglednici VI.

Preglednica VI: Koncentracije PEU v medijih s katerimi smo tretirali celice.

PEU	CBZ	VPA	TOP	LEV	PRG
Terapevtske koncentracije (μM)	20 - 50	350 -700	15 - 60	70 - 270	5 - 90
Koncentracije pripravljenih raztopin (μM)	50	700	60	300	100
Topilo	DMSO	PBS	DMSO	PBS	PBS

3.2.1.3 Gojenje in tretiranje celic

Celice smo gojili v mediju RPMI 16-40 z dodanim L-glutaminom, antibiotiki, antimikotiki, FBS in 2-merkapt-etanolom, v inkubatorju s 37 °C, 95 % vlažnostjo in 5 % deležem CO_2 . S celicami smo delali v LAF komori. Vključili smo jo pol ure pred začetkom dela, površine in materiale za delo pa razkužili s 70 % etanolom. Uporabljali smo sterilni material. Z materiali smo rokovali v skladu z internimi navodili za delo v celičnem laboratoriju, saj smo uporabljali material človeškega izvora in je zato potrebna previdnost. Po končanem delu smo ponovno očistili delovno površino s 70 % etanolom in vklopili UV luč.

Celice smo gojili v večjih vsebnikih za gojenje celic (T-flaskih, $S=150 \text{ cm}^2$) do ustreznega števila. Suspenzijo celic smo nato razdelili v 42 manjših vsebnikov ($S=72 \text{ cm}^2$), v vsakega smo odpipetirali približno 1 milijon celic/ml.

Celicam smo (ob dnevu 0) dodali ustrezní medij (z dodanim PEU, DMSO ali PBS). Za vsak medij smo naredili tri biološke ponovitve. Gostota celic ob začetku tretiranja je bila v vsakem vsebniku približno 1 milijon celic/ml.

Celice smo redno šteli in redčili na koncentracijo 1×10^6 celic/mL, da smo zagotovili optimalno rast. Prešteli smo jih tako, da smo najprej $10 \mu\text{L}$ celic prenesli v mikrocentrifugirko in dodali $40 \mu\text{L}$ 0,4 % raztopine barvila Trypan Blue ter premešali. $10 \mu\text{L}$ obarvane celične suspenzije smo prenesli na komoro za štetje celic po Neubauerju (hemocitometer), ki omogoča štetje celic v znanem volumnu. Koncentracijo osnovne raztopine smo določili neposredno s štetjem celic pod svetlobnim mikroskopom s pomočjo enačbe 1.

Enačba 1: Izračun koncentracije celic s hemocitometrom.

$$\frac{A + B + C + D}{4} * f * 10^4 = \frac{\text{število celic}}{\text{mL}}$$

A, B, C, D: število živih celic v posameznem polju Neubauerjevega števca; f: faktor redčenja.

Celice smo v različnih medijih gojili tri tedne. Dvakrat tedensko smo jih šteli in redčili na primerno gostoto, pri čemer smo enkrat tedensko zamenjali medij s svežim. Med gojenjem celic nismo opazili, da bi tretiranja pomembno vplivala na živost celic.

Ob dnevih 4, 10 in 17 smo celice iz vsebnikov prenesli v centrifugirke (z $V=12 \text{ ml}$). Na podlagi štetja celic smo odstranili višek celic, da smo dosegli koncentracijo 1×10^6 celic/ml.

Ob dnevih 7 in 14 smo celice iz vsebnikov prenesli v centrifugirke ($V=12 \text{ ml}$), kjer smo spet želeli imeti koncentracijo celic 1×10^6 , višek celic pa smo na podlagi izračuna koncentracije celic prenesli v dodatno, drugo, sterilno centrifugirko. Celice v prvi centrifugirki smo centrifugirali (1200 RPM, 5 min), odstranili supernatant in v centrifugirko dodali 12 ml svežega medija ogretega na sobno temperaturo ter resuspendirali celice. Suspenzijo smo prenesli v vsebnik za gojenje, ki smo ga nato položili v inkubator s temperaturo $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 95 % vlažnostjo in atmosfero s 5 % CO_2 , ter jih tako gojili naprej do naslednjega redčenja oziroma menjave medija.

Višek celic, ki smo ga shranili v drugo centrifugirko, smo centrifugirali (1200 RPM, 5 min), odstranili supernatant in dodali 5 ml PBS za spiranje ter vsebino resuspendirali. Suspenzijo smo ponovno centrifugirali (5000 RPM, 10 min) ter odstranili supernatant. Celice smo shranili v zamrzovalniku pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na dan 21 smo celice ponovno prenesli v centrifugirke. Poleg živih celic, smo prešteli tudi mrtve. Suspenzijo smo centrifugirali (1200 RPM, 5 min) in odstranili supernatant. 2,0 ml tega supernatanta (medija v katerem smo gojili celice) smo v shranili v mikrocentrifugirko za določevanje metabolitov. Centrifugirane celice smo resuspendirali v ustrezni količini PBS-a, da smo dobili suspenzije s koncentracijo 1 milijon celic/mL. V sterilne mikrocentrifugirke (2 mL) smo razdelili po 2 milijona celic (2,0 ml suspenzije celic). Ponovno smo jih centrifugirali (1200 RPM, 5 min) in nato odstranili pufer. Mikrocentrifugirke s celicami in medijem smo shranili v zamrzovalniku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Določanje neencimskega antioksidanta: glutation

Ključni intracelularni in ekstracelularni antioksidant je GSH, iz katerega pri oksidaciji nastane GSSG. Pri kroženju med reducirano in oksidirano obliko glutationa pa sodelujeta GR in GPx. Razmerje med GSH in GSSG tudi služi kot označevalec oksidativnega stresa (42).

Metoda določanja glutationa z LC/MS-MS je bila predhodno izdelana na Katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko (43).

Preglednica VII: Priprava reagentov za določanje GSH.

Reagenti	Priprava
1mM HCl z 1mM EDTA	V 100 mL bučko smo natehtali 47,4 mg dinatrijevega edetata dihidrata ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ga raztopili v približno 80 mL vode, dodali 25 μL 4 M HCl in dopolnili z vodo do oznake.
4 M klorovodikova kislina (HCl)	V 50 mL bučko smo natočili malo vode, odpipetirali 16,57 mL 37 % HCl in dopolnili z vodo do oznake.

3.2.2.1 Priprava standardov GSH in GSSG

V 10 mL bučko smo natehtali 6,15 mg GSH in dodali 1 mM HCl do oznake (GSH I). V drugo 10 mL bučko smo natehtali 6,12 mg GSSG in dodali 1 mM HCl do oznake (GSSG I). Nato smo v novo 10 mL bučko odpipetirali 1mL GSH I in 80 μL GSSG I in dodali 1 mM

HCl do oznake. Dobili smo delovno raztopino GSH in GSSG s koncentracijami 200 $\mu\text{mol/L}$ in 8 $\mu\text{mol/L}$. Delovno raztopino smo redčili z 1 mM HCl v razmerju 1:10 in dobili raztopini s koncentracijama 20 $\mu\text{mol/L}$ GSH in 0,8 $\mu\text{mol/L}$ GSSG. V preglednici VIII je prikazana priprava kalibracijskih standardov iz delovnih raztopin.

Preglednica VIII: Priprava standardov GSH in GSSG.

Koncentracija raztopine GSH/GSSG [$\mu\text{mol/L}$]	Alikvot delovne raztopine [μL]	Volumen 1mM HCl [μL]	Koncentracija kalibracijskega standarda GSH/GSSG [$\mu\text{mol/L}$]
/	/	200	0/0
20/0,8	2,5	197,5	0,25/0,01
20/0,8	5	195	0,5/0,02
20/0,8	10	190	1/0,04
20/0,8	20	180	2/0,08
20/0,8	30	170	3/0,12
20/0,8	50	150	5/0,2
20/0,8	100	100	10/0,4
20/0,8	200	/	20/0,8
200/0,8	30	170	30/1,2
200/0,8	40	160	40/1,6

3.2.2.2 Priprava vzorcev za analizo

Celice smo odtalili, jim dodali 200 μL 1 mM HCl z 1 mM EDTA na 2 milijona celic in jih 30 sekund mešali na vibracijskem mešalniku.

K 200 μL vzorca (celičnega lizata ali standarda) smo dodali 400 μL hladnega acetonitrila in premešali na vibracijskem mešalniku. Vzorce smo centrifugirali 10 min pri 4°C in 13200 obratih/min (obarjanje proteinov). 150 μL supernatanta smo odpipetirali na mikrotitrne ploščice za analizo na LC-MS/MS.

3.2.2.3 Metoda LC

Uporabili smo LC sistem Agilent 1290 Infinity. Analizo smo izvajali na koloni Kinetex PFP (100 \times 3 mm, velikost delcev 2,6 μm) s temperaturo 50 °C. Injicirali smo 5 μL vzorca. Avtomatski vzorčevalnik je bil ohlajen na 10 °C. MF je bila sestavljena iz 0,1 % mravljične kisline in metanola v razmerju 98:2. Pred analizo smo topili razplinili v ultrazvočni kadički. Analiza se je izvajala z izokrasko elucijo. Po 2 minutah analize smo eluat vodili na masni

spektrometer, čas analize pa je znašal 3,5 minute. Pretok MF je bil 0,2 mL/min, postkolonsko smo z dodatno kvarterno črpalko preko T-člena dovajali 0,2 mL/min acetonitrila.

3.2.2.4 Metoda MS/MS

Uporabili smo masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Za metodo ionizacije smo uporabili ESI v pozitivnem načinu. Pri kvalifikaciji GSH smo spremljali prehod 308,1 → 76,2, pri kvantifikaciji pa prehod 308,1 → 179. Pri kvalifikaciji GSSG smo spremljali prehod 613,2 → 231, pri kvantifikaciji pa prehod 613,2 → 355,1. Nastavitve širine kvadrupolov Q1 in Q3 smo nastavili na wide (1,2 masne enote). Nastavitve masnega analizatorja so podane v preglednici IX.

Preglednica IX: Nastavitve masnega analizatorja za analizo GSH in GSSG.

Sušilni plin	300 °C, 5 L/min
Nebulizacijski plin	45 psi
Jetstream® plin	320 °C, 11 L/min
Napetost na kapilari	3500 V
Nozzle voltage®	500 V
GSH: SRM prehod	308,1 → 179
Energija kolizije (CE)	4 eV
Fragmentor (FR)	76 V
GSSG: SRM prehod	613,2 → 355,1
Energija kolizije (CE)	20 eV
Fragmentor (FR)	162 V

3.2.2.5 Izračun

Koncentracije GSH in GSSG izračunamo iz linerane umeritvene krivulje. Rezultate podamo kot razmerja tretiranj na netretirane celice, ki predstavljajo kontrolo.

3.2.3 Določanje encimskih antioksidantov: katalaza

Za določanje aktivnosti encima katalaze smo uporabili metodo po Aebiju. Katalaza razgrajuje vodikov peroksid na vodo in kisik. Z dodajanjem standardne količine vodikovega peroksida, lahko določimo aktivnost katalaze. Pri valovni dolžini 240 nm kinetično spremljamo padec absorbance H₂O₂ s časom. Iz naklona absorbance pri 240 nm kot funkcije

časa krivulje izračunamo aktivnost CAT v celičnem vzorcu. Pred meritvijo moramo vzorec toliko razredčiti, da reakcija razgradnje H₂O₂ poteka po kinetiki prvega reda.

Preglednica X: Priprava reagentov za meritve katalaze.

Reagenti	Priprava
Fosfatni pufer	V 250 mL vode smo raztopili 1,34 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O in 681 mg KH ₂ PO ₄ , nato uravnali pH na 7,0.
30 mM H ₂ O ₂	34 μL 30 % H ₂ O ₂ smo raztopili v 10 mL fosfatnega pufera

3.2.3.1 Priprava vzorcev

Celice smo odtalili, dodali 100 μL vode na 2 milijona celic in jih 20 s mešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo celice trikrat zamrznili na -80 °C in jih odtalili, pri čemer smo jih odtaljene vedno premešali na vibracijskem mešalniku. Za tem smo jih centrifugirali 5 minut na 10000 RPM pri 4 °C. 12 μL supernatanta smo shranili pri -80 °C za določanje vsebnosti proteinov. Za merjenje katalaze smo supernatant še 30-krat razredčili – 13,3 μL supernatanta smo s fosfatnim pufrom redčili do 400 μL.

3.2.3.2 Meritve aktivnosti katalaze

160 μL redčenega supernatanta smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščico in dodali 80 μL H₂O₂. Padec absorbance H₂O₂ smo kinetično merili pri valovni dolžini 240 nm.

Aktivnost CAT določimo v prvi minuti merjenja absorbance, ko reakcija poteka po kinetiki prvega reda. V tem primeru nam naklon premice poda aktivnost CAT. Naklon izračunamo preko enačbe 2.

Enačba 2: Izračun naklona premice za aktivnost CAT.

$$k = \frac{2,3}{60 \text{ s}} \times \log \frac{A_1}{A_2} \quad \left[\frac{1}{\text{s}} \right]$$

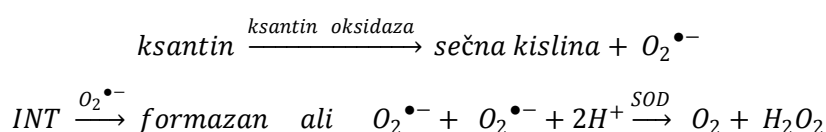
k: naklon premice; *A*₁: absorbanca ob času 0s; *A*₂: absorbanca ob času 60s.

Rezultat podamo kot relativno vrednost vzorca glede na netretirano kontrolo.

3.2.4 Določanje encimskih antioksidantov: superoksidna dismutaza

Superoksidna dismutaza katalizira, tj. pospeši, dismutacijo superoksidnega radikala $O_2^{\bullet-}$ na kisik in vodikov peroksid, in s tem ščiti pred superoksidnim radikalom, enim najpogostejših radikalov v telesu.

Za določanje SOD smo uporabili komercialni komplet RANDOX RANSOD, s katerim encim določimo kolorimetrično. Ksantin in ksantin oksidaza tvorita superoksidni radikal, ki reagira z 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijevim kloridom (INT), pri tem nastane rdeče barvilo formazan (slika 11). Aktivnost SOD se določi kot odstotek inhibicije te reakcije. 1 enota SOD povzroči 50 % inhibicijo hitrosti redukcije INT pri pogojih poskusa.



Slika 11: Prikaz reakcij ksantin oksidaze in SOD.

3.2.4.1 Priprava reagentov in standardov

Reagente in standarde smo pripravili po navodilih kita Randox Ransod. Reagent R1a (ksantin, INT) smo rekonstituirali z 20 mL pufra R1b (EDTA, CAPS) in dobili raztopino substrata (R1). Ksantin oksidazo (R2) smo raztopili v 10 mL vode. Standard smo raztopili v 10 mL vode (koncentracija 5,24 U/mL, S6) in z nadaljnjim redčenjem z redčitvenim reagentom (Ransod Diluent) pripravili standarde kot je navedeno v preglednici XI.

Preglednica XI: Priprava standardov za merjenje SOD.

Uporabljena raztopina	Volumen standarda [μ L]	Volumen redčitvenega reagenta [μ L]	Koncentracija pripravljenega standarda [U/mL]	Pripravljen standard
neredčeni standard	-	-	5,24	S6
S6	50	50	2,62	S5
S5	50	50	1,31	S4
S4	50	50	0,655	S3
S3	30	60	0,218	S2
redčitveni reagent	-	-	0	S1

3.2.4.2 Priprava celičnih lizatov

Celicam (2×10^6 v vzorcu) smo dodali 100 μL hladne vode in jih 20 sekund mešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo celice trikrat zamrznili na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in jih odtalili, pri čemer smo jih odtaljene vedno premešali na vibracijskem mešalniku. Za tem smo jih centrifugirali 5 minut na 10000 RPM pri $4\text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant smo 5x redčili: 5 μL supernatanta smo dodali 20 μL redčitvenega reagenta.

3.2.4.3 Meritve in izračun

Na mikrotitrsko ploščico smo v dveh paralelkah odpipetirali po 5 μL standarda ali vzorca in dodali 170 μL substrata (R1). Tik pred pričetkom meritve smo dodali še 25 μL ksantin oksidaze (R2) in kinetično merili padec absorbance formazana pri 505 nm vsakih 30 sekund 7-krat zapored, pri $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Najprej smo podali spremembo absorbance v prvih treh minutah merjenja preko enačbe 3 za vzorce, standarde in slepi vzorec.

Enačba 3: Sprememba absorbance formazana v prvih treh minutah merjenja

$$\Delta A = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

ΔA : sprememba absorbance formazana na minuto; A_2 : absorbanca formazana po treh minutah merjenja; A_1 : absorbanca formazana ob začetku merjenja.

Zatem smo izračunali odstotek inhibicije, ki ga k tvorbi formazana prispeva SOD (izračunamo za standarde in vzorce) preko enačbe 4:

Enačba 4: Določanje odstotka inhibicije nastajanja formazana.

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

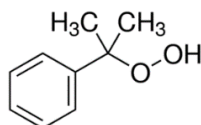
ΔA : sprememba absorbance formazana na minuto v vzorcu ali standardu; ΔA slepa: sprememba absorbance formazana na minuto v slepem vzorcu.

Iz logaritmskih vrednosti koncentracij standardov in vrednosti odstotkov inhibicije smo izračunali umeritveno krivuljo s pomočjo linearne regresije, iz katere smo nato določili koncentracijo SOD v vzorcih. Rezultat smo podali kot relativne vrednosti vzorcev glede na netretirano kontrolo.

3.2.5 Določanje encimskih antioksidantov: glutation peroksidaza

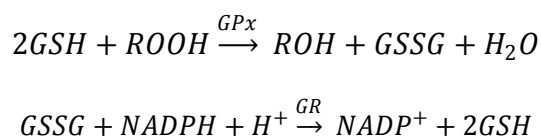
Glutation peroksidaza je eden od encimov iz družine peroksidaz, ki razgrajuje peroksid ob prisotnosti glutationa.

Meritve aktivnosti GPx smo opravili s pomočjo RANDOX RANSEL reagentov. GPx katalizira oksidacijo reduciranega glutationa in kumen hidroperoksida.



Slika 12: Kumen hidroperoksid.

Oksidirani glutation se ob prisotnosti glutation reduktaze (GR) in NADPH pretvori v reducirano obliko, NADPH pa se oksidira v $NADP^+$ (slika 13). To povzroči padec absorbanco pri 340 nm.



Slika 13: Shema reakcij, ki ju katalizirata GPx in GR.

3.2.5.1 Priprava vzorcev za meritve

Celice smo odtalili. V mikrocentrifugirke s celicami smo dodali 100 μ L vode ter premešali na vibracijskem mešalniku. Za 15 minut smo mikrocentrifugirke dali v hladilnik, nato pa centrifugirali 5 minut pri 10000 RPM in 4 °C. 10 μ L supernatanta (oz. 10 μ l vode za slepi vzorec) smo redčili z 20 μ L reagenta R3.

3.2.5.2 Meritve

Na mikrotitrsko ploščico smo nanegli 5 μ L vzorca in 250 μ L reagenta R1. 10 μ L kumen hidroperoksida (R2) smo dodali tik pred začetkom meritev. Merili smo absorbanco pri 340 nm in 37 °C vsako minuto, 3-krat zapored. Od odzivov vzorca smo odšteli odziv slepega vzorca. Rezultat smo podali kot relativne vrednosti odzivov glede na netretirano kontrolo

3.2.6 Označevalec lipidne peroksidacije: malondialdehid

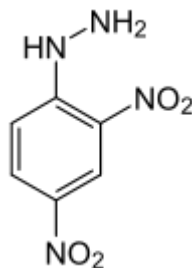
Malondialdehid (slika 14) nastane pri peroksidaciji večkratnenasičenih, maščobnih kislin, na primer iz arahidonske, dokoheksanojske in linolenske maščobne kisline, preko bicikličnih

endoperoksidov ali encimatsko pri presnovi eikozanoidov. Pri fiziološkem pH-ju je večina MDA-ja v obliki enolatnega aniona, pri nižjem pH-ju pa je v obliki dialdehida (slika 14), ki je tudi bolj reaktiven (22).



Slika 14: Malondialdehid.

Uporabili smo metodo derivatizacije z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH, slika 15)).



Slika 15: DNPH.

3.2.6.1 Priprava reagentov

Preglednica XII: Priprava reagentov za merjenje MDA.

Reagent	Priprava
0,1 M klorovodikova kislina (HCl)	V 100 mL bučko smo najprej natočili malo vode, odpipetirali 0,829 mL 37 % HCl, dopolnili do oznake z vodo in premešali.
1 M HCl	V 10 mL bučko smo najprej natočili malo vode, odpipetirali 0,829 mL 37 % HCl, dopolnili do oznake z vodo.
4 M HCl	V 10 mL bučko smo najprej natočili malo vode, odpipetirali 3,314 mL 37 % HCl, dopolnili do oznake z vodo in premešali.
6 M natrijev hidroksid (NaOH)	V 10 mL bučko smo nalili 5 mL vode in med mešanjem dodajali predhodno natehtani NaOH (2,40 g). Ko se je raztopil celoten NaOH, smo dodali vodo do oznake in premešali.
20% trikloroacetna kislina (TCA)	V 25 mL bučko smo natehtali 5,00 g TCA, dopolnili z vodo do oznake in premešali. Raztopino smo ohladili v zamrzovalniku.
1mg/mL raztopina	50 μL raztopine DNPH s fosforno kislino ($c=0,2$ M) smo v duplikatu odpipetirali v 2 mL mikrocentrifugirko, dodali 950 μL vode in premešali na vorteksu.

2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)	
0,2 M pufer očetna kislina/amonijev acetat (CH ₃ COOH/CH ₃ COO-NH ₄ ⁺)	V 10 mL bučko smo nalili 5 ml vode in s pipeto dodali 114,6 µL 100 % očetne kisline ter 1,766 ml 25 % (m/m %) amonijaka v vodi, dopolnili z vodo do oznake in premešali.

3.2.6.2 Priprava standardov malondialdehida

V 10 mL bučko smo natehtali 43,50 mg malonaldehid tetrabutilamonijeve soli ter z acetonitrilom dopolnili do oznake. Tako smo dobili 1 mg/mL osnovno raztopino I (OR I). Nato smo 180 µL OR I odpipetirali v 50 mL bučko, dopolnili do oznake z 0,1 M HCl in raztopino dobro premešali. Tako smo dobili standard MDA s koncentracijo 50 µmol/L (osnovna raztopina II, OR II). V 1,5 mL mikrocentrifugirkah smo z redčenjem z 0,1 M HCl pripravili 1 mL standarde s koncentracijami od 2,5 do 0,039 µmol/L.

V preglednici XIII so prikazana pripravljena redčenja 50 µM OR II in 1,25 µM standarda z 0,1 M HCl, s katerimi smo pripravili standarde MDA z ustrežno koncentracijo.

Preglednica XIII: Priprava standardov MDA.

Koncentracija raztopine [µmol/L]	Alikvot raztopine [µL]	Volumen 0,1 M HCl [µL]	Koncentracija pripravljenega standarda [µmol/L]
50	50	950	2,5
50	25	975	1,25*
1,25	500	500	0,625
1,25	375	635	0,469
1,25	250	750	0,313
1,25	188	812	0,235
1,25	125	875	0,156
1,25	63	937	0,078
1,25	31	969	0,039
/	/	1000	0

* pripravljeno v duplikatu

3.2.6.3 Priprava vzorcev na analizo

Celice smo odtalili in na 2 milijona celic dodali 200 µL 0,1 M HCl. 30 sekund smo jih mešali na vibracijskem mešalniku. V 1,5 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 200 µL standarda.

V mikrocentrifugirke s standardom in celičnim lizatoma smo dodali 50 μL 6 M NaOH, premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali 30 min v termostatisiranem stresalniku pri 60 $^{\circ}\text{C}$ in 20 obratih/min (alkalna hidroliza na proteine vezanega MDA). Vzorce smo nato hladili v hladilniku 10 minut. Potem smo vzorcem dodali 250 μL ohlajene 20 % TCA, premešali in jih centrifugirali 10 minut pri 5 $^{\circ}\text{C}$ in 13200 obratih/min (potekalo je obarjanje proteinov). Po 450 μL supernatanta smo prenesli v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke in dodali 4 μL 6 M NaOH, da smo dobili raztopino s pH 6-7 in premešali. Nato smo dodali 10 μL 1 M HCl in tako pH znižali na približno ter nato premešali. Če je vzorec postal moten, smo ga ponovno centrifugirali. 200 μL te raztopine smo prenesli v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke ter dodali 150 μL 1 M HCl in 50 μL raztopine DNPH ter premešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo jih 60 minut inkubirali na termostatisiranem stresalniku pri 50 $^{\circ}\text{C}$ in 20 RPM, zaščitene pred svetlobo (potekla je derivatizacija MDA). Nastali produkt MDA-DNPH je nestabilen v prisotnosti svetlobe, zato smo derivatizirane vzorce ohladili na sobni temperaturi (10 minut), zaščitene pred svetlobo. Vzorcem smo dodali 150 μL acetatnega pufru ter premešali. 150 μL raztopine smo odpipetirali na mikrotitrne ploščice za analizo na LC-MS/MS.

3.2.6.4 Metoda tekočinske kromatografije

Metoda LC in MS/MS je bila predhodno izdelana na Katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko (43). Uporabili smo LC sistem Agilent 1290 Infinity. Analizo smo izvajali na koloni Kinetex C18 (50 \times 2,1 mm, velikost delcev 5 μm). Injicirali smo 5 μL vzorca, avtomatski vzorčevalnik je bil ohlajen na 4 $^{\circ}\text{C}$. Mobilna faza (MF) je bila sestavljena iz 0,1 % mravljične kisline (topilo A) in acetonitrila (topilo B). Obe topili smo pred analizo razplinili v ultrazvočni kadički. Čas analize je znašal 2,6 minute. Retencijski čas analita (tr) je bil 1,23 min. Pretok MF je bil 0,5 mL/min, analiza se je izvajala z gradientno elucijo po shemi predstavljeni v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Shema gradientne elucije.

t (min)	delež topila B (%)
0	30
2	60
2,05	30
2,6	30

3.2.6.5 Metoda MS/MS

Uporabili smo masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadрупolnim MS/MS analizatorjem. Za metodo ionizacije smo uporabili ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju oziroma elektrorazprševalno ionizacijo - ESI (angl. electrospray ionization). Pri kvantifikaciji smo spremljali prehod 235,1 (pirazolska oblika MDA-DNPH produkta) v 159,2 (fragmentacija z odcepom NO₂ in NO skupine) in za odziv vzeli odziv ionov 159,2. Nastavitve masnega analizatorja so podane v preglednici XV.

Preglednica XV: Nastavitve masnega analizatorja.

Sušilni plin	300 °C, 5L/min
Nebulizacijski plin	450 psi
Jetstream plin	320 °C, 11L/min
Napetost na kapilari	3500 V
Nozzle voltage	500 V
MDA: SRM prehod	235,1 → 159,2
Kolizijska energija	20 eV
Fragmentor	100 v

3.2.6.6 Izračun

Koncentracijo MDA izračunamo iz linearne umeritvene krivulje. Rezultat podamo kot odstotek koncentracije MDA v tretiranih celicah glede na koncentracijo v netretiranih celicah.

3.2.7 Obdelava podatkov

Podatke opravljenih meritev smo zbirali v programu Microsoft Excel 2013. Glede na umeritvene premice smo izračunali koncentracije in podatke za različna tretiranja podali glede na povprečje netretirane kontrole. V programu Excel smo tudi grafično prikazali rezultate.

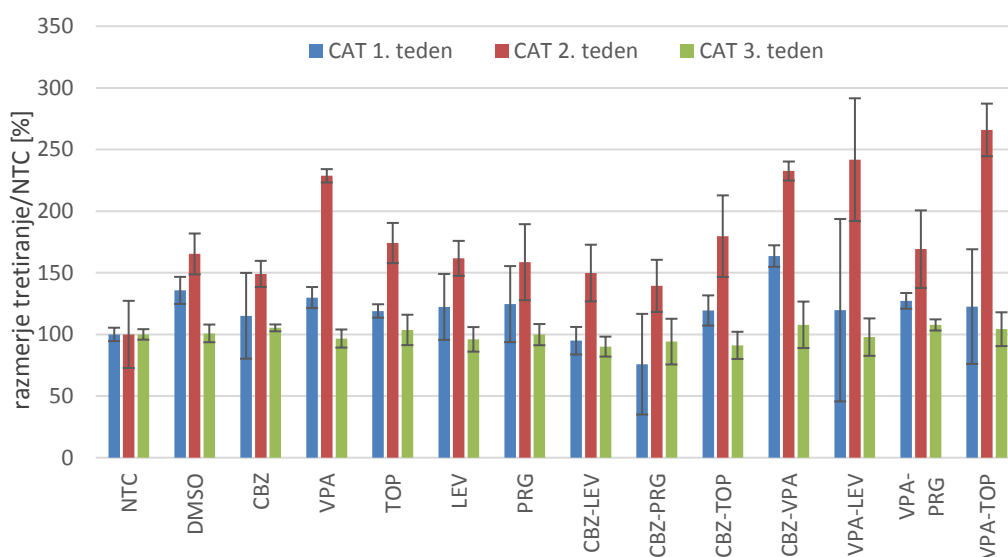
Pri statistični analizi smo tretiranja s PEU razdelili v različne skupine in primerjali razlike v vrednostih označevalcev oksidativnega stresa. Na podlagi hipotez smo naredili statistično analizo s programom IBM SPSS (verzija 20.0). Za dokazovanje razlik med več skupinami smo uporabili neparametrični, Kruskal-Wallisov test. Za ugotavljanje razlik med pari smo uporabili Mann-Whitney-jev test. V primerih ko smo primerjali več parov, smo upoštevali Holm-Bonferroni korekcijo. Upoštevali smo stopnjo tveganja 0,05.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIMERJAVA OZNAČEVALCEV OKSIDATIVNEGA STRESA PO 1., 2. IN 3. TEDNU TRETIRANJA

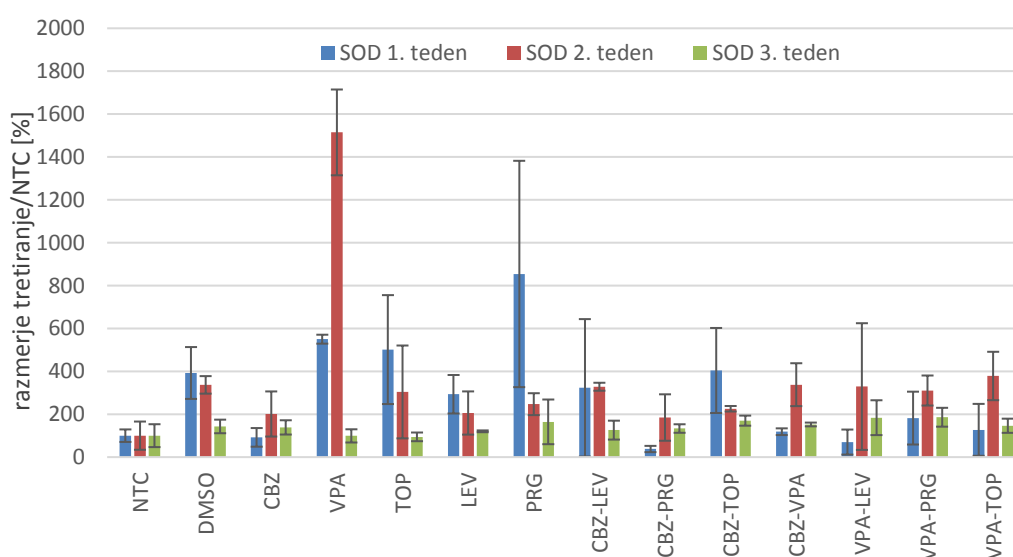
SOD, CAT in MDA smo izmerili po 1., 2. in 3. tednu tretiranja (slike 16, 17, 18) in poskušali določiti statistične razlike v oksidativnem stresu med celicami, ki so bile različno dolgo izpostavljene protiepileptičnim učinkovinam.

4.1.1 Katalaza po 1., 2. in 3. tednu tretiranja



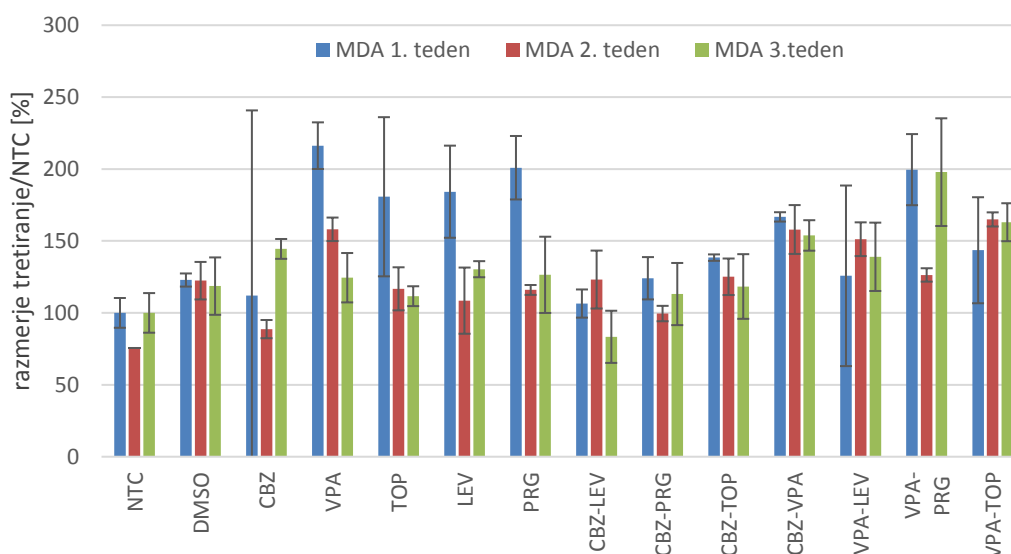
Slika 16: Relativne aktivnosti CAT glede na netretirane kontrole po 1., 2. in 3. tednu tretiranja s PEU.

4.1.2 Superoksidna dismutaza po 1., 2. in 3. tednu tretiranja



Slika 17: Relativne aktivnosti SOD glede na netretirane kontrole po 1., 2. in 3. tednu tretiranja s PEU.

4.1.3 Malondialdehid po 1., 2. in 3. tednu tretiranja



Slika 18: Relativne koncentracije MDA glede na netretirane kontrole po 1., 2. in 3. tednu tretiranja s PEU.

Časovne odvisnosti pri tritedenskem merjenju aktivnosti encimskih antioksidantov SOD in CAT nismo dokazali. Glede na prikazane rezultate tudi ne moremo predvideti kakršnegakoli trenda, ki bi nakazoval, da se OS pri celicah z daljšanjem izpostavitve PEU spreminja.

Tudi pri MDA nismo dokazali časovne povezave, ampak so na sliki 18 vidna večja odstopanja od NTC pri tretiranjih z VPA, medtem ko bi lahko CBZ v kombinaciji s PEU 2. generacije omejil lipidno peroksidacijo.

V bodoče bi bilo smiselno preveriti, ali se v odvisnosti od časa spreminja glutationski sistem, narediti poskus z večjim številom bioloških ponovitev in spremljati označevalce OS dalj časa, več kot tri tedne.

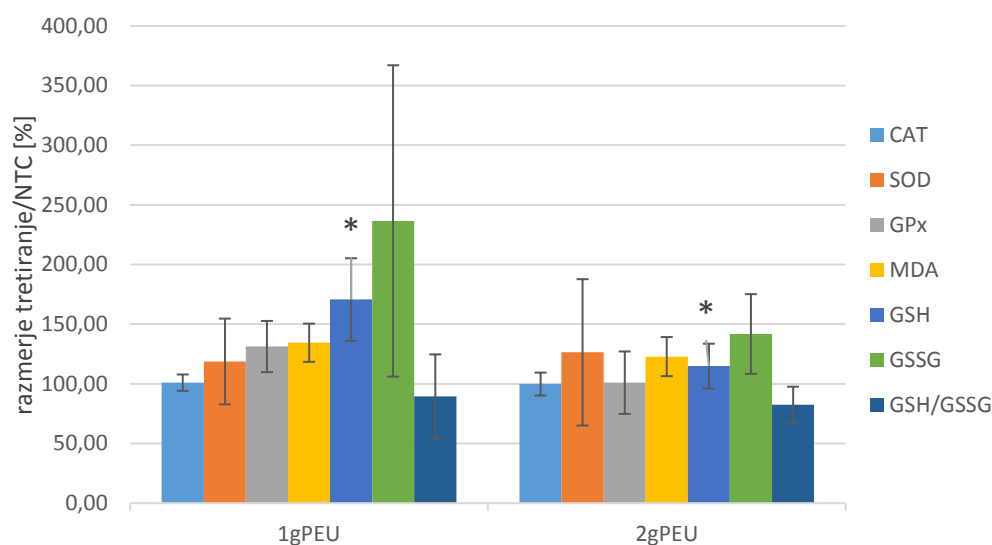
4.2 PRIMERJAVA OZNAČEVALCEV OKSIDATIVNEGA STRESA PO TRITEDENSKEM TRETIRANJU CELIC S PROTIEPILEPTIČNIMI UČINKOVINAMI

V celicah, ki so bile izpostavljene PEU 3 tedne, smo pomerili SOD, CAT, GPx, MDA in GSH. Tretiranja smo združevali v različne skupine in primerjali meritve označevalcev OS.

4.2.1 Primerjava monotretiranj

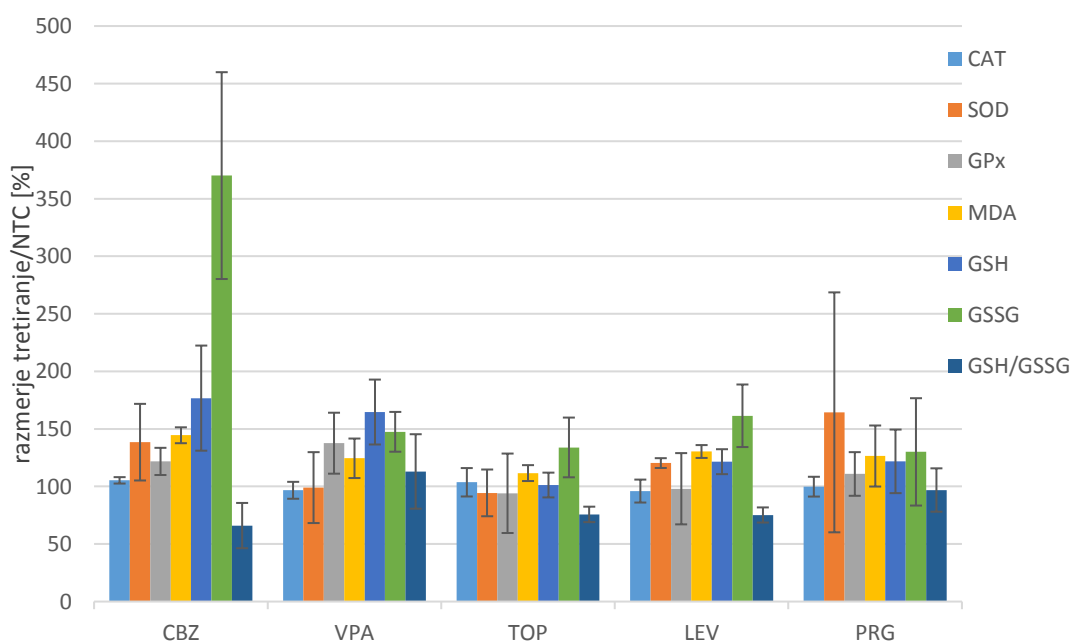
Predstavnika 1. generacije, CBZ in VPA, smo dodelili v eno skupino (1gPEU) in jo primerjali s skupino, v kateri smo združili PEU 2. generacije: TOP, LEV in PRG (2gPEU).

Statistično razliko smo uspeli dokazati samo pri GSH-ju ($p=0,007$), ki je bil zvišan pri monotretiranjih (to je celicah, izpostavljenih le eni učinkovini) s 1gPEU (slika 19).



Slika 19: Relativne aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava prve in druge generacije.

Nato smo med seboj primerjali meritve označevalcev oksidativnega stresa med petimi različnimi tretiranjimi s posameznimi učinkovinami (CBZ, VPA, TOP, LEV in PRG). Med temi monotretiranjimi nismo dokazali statistično pomembne razlike (slika 20).



Slika 20 : Relativne aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava posameznih PEU.

S primerjavo skupin, v katere smo različno združevali monotretiranja (sliki 19 in 20), razlik v aktivnosti CAT nismo dokazali. Prav tako ni prišlo do opaznih razlik pri SOD.

Razlik v GPx med 1gPEU in 2gPEU nismo uspeli potrditi, a smo dokazali razlike v GSH, kjer so bile vrednosti povišane pri tretiranjih s 1gPEU (slika 19). Pri primerjavi teh dveh skupin bi sicer, v primeru, da so celice izpostavljene oksidativnemu stresu, pričakovali upad GSH, ki se z večanjem aktivnosti GPx tudi v večji meri porablja. Lahko pa se celice prilagodijo in zaradi večjih potreb povečajo sintezo GSH ter tako ta poraste.

Opazili smo nižje relativne vrednosti GSH in GPx pri tretiranjih s TOP, LEV ali PRG v primerjavi s tretiranjem s CBZ ali VPA, vendar razlike med posameznimi tretiranjmi niso statistično značilne (slika 20).

Potrebni bi bili dodatni poskusi, da bi lahko potrdili ugodne učinke 2gPEU na zmanjševanje oksidativnega stresa, na katere nakazuje statistično signifikantna razlika v GSH pri primerjavi monotretiranj s 1gPEU in 2gPEU in rezultati poskusov na celicah in živalskih modelih, ki jih zasledimo v literaturi (44, 45, 46).

MDA je eden od reaktivnih aldehydov, ki nastanejo kot končni produkti pri oksidativnih poškodbah lipidov. Statistično pomembnih razlik v koncentraciji MDA pri primerjavi monotretiranj nismo dokazali.

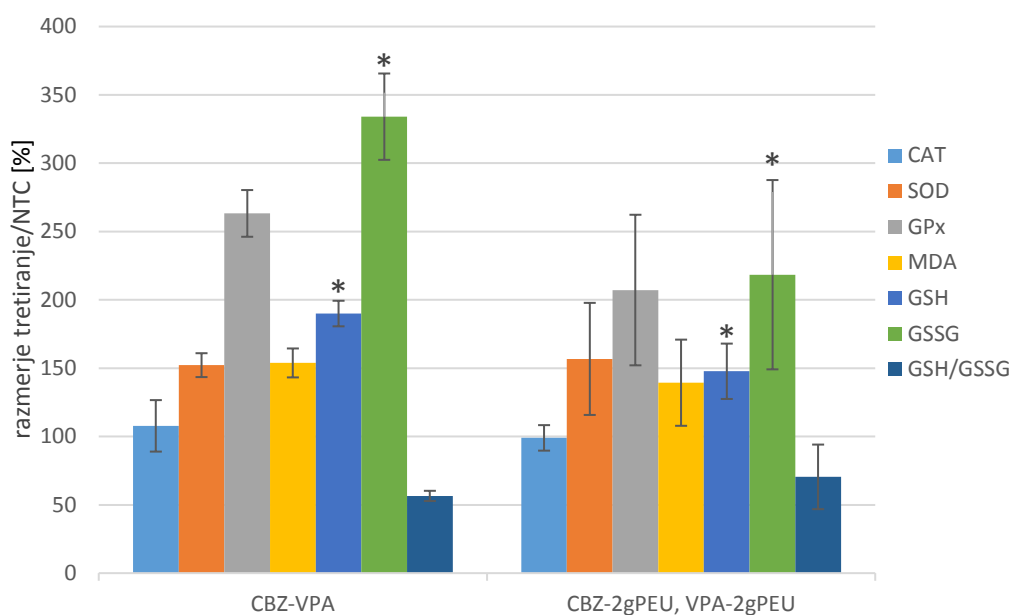
Na podlagi objavljenih študij smo pričakovali porast oksidativnih poškodb lipidov pri tretiranjih z VPA (47), vendar razlik v obsegu lipidne peroksidacije pri monoterapiji nismo opazili. Pavone in sod. so po 12-dnevni izpostavitvi podganjih astrocitov PEU v koncentracijah od 1 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$ ugotovili, da so imeli največji vpliv na nastanek ROS in porast MDA CBZ, ki je predstavnik 1. generacije, in okskarbazepin ter TOP, ki sta predstavnik 2. generacije, in sicer pri najnižji koncentraciji. Pri ostalih PEU 2. generacije (LEV, tiagabin, lamotrigin in gabapentin) niso dokazali signifikantnih razlik v primerjavi s kontrolami (48).

Opazili smo, da so koncentracije MDA najnižje pri TOP, a razlike niso statistično značilne. Tudi pri primerjavi drugih označevalcev nismo dokazali statističnih razlik, čeprav so v študijah na pilokarpinskem modelu na podganah in različnih celični linijah dokazali nevroprotektivni in antioksidantni učinek TOP (49, 50).

4.2.2 Primerjava politretiranj

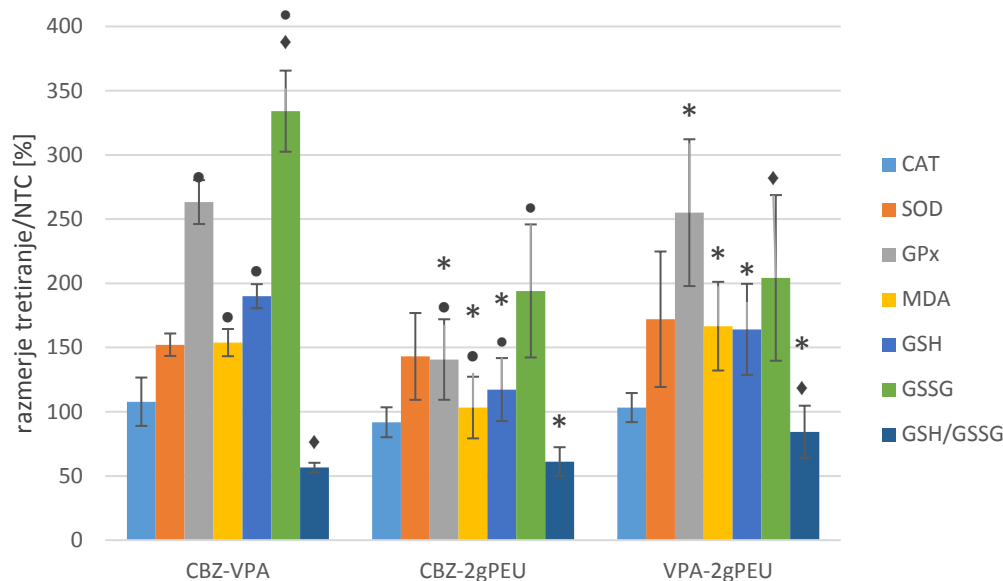
Želeli smo še dokazati, da se oksidativni stres razlikuje med politretiranjmi — celicami, izpostavljenimi kombinacijami PEU (slika 21). Kombinacija s PEU 1. generacije (CBZ-

VPA) se je od skupine, v kateri smo zajeli vse ostale kombinacije učinkovin (CBZ in VPA v kombinacijah s predstavniki 2. generacij, okrajšano: CBZ-2gPEU in VPA-2gPEU), razlikovala pri vrednosti GSH ($p=0,044$) in GSSG ($p=0,007$), kar je prikazano na sliki 21.



Slika 21: Relativne aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava kombinacije CBZ-VPA z drugimi kombinacijami. * $p<0,05$ pri primerjavi teh dveh skupin

Nadalje smo tretiranja razdelili v tri skupine, in sicer na kombinacijo CBZ-VPA, CBZ-2gPEU in VPA-2gPEU (slika 22). S Kruskal-Wallisovim testom smo določili statistično razliko pri GPx ($p=0,01$), MDA ($p=0,002$), GSH ($p=0,006$), GSSG ($p=0,020$) in razmerju GSH/GSSG ($p=0,009$). Razliko med posameznimi pari smo določili z Mann-Whitneyevim testom. Med parom CBZ-VPA in CBZ-2gPEU smo določili statistično pomembne razlike pri GPx ($p=0,025$), MDA ($p=0,029$), GSH ($p=0,025$) in GSSG ($p=0,038$). Označevalci so bili izrazito povečani pri kombinaciji CBZ-VPA. Med parom CBZ-VPA in VPA-2gPEU smo določili statistično pomembne razlike pri GSSG ($p=0,025$) in pri razmerju GSH/GSSG ($p=0,025$). Razmerje je bilo višje pri tretiranjih VPA-2gPEU, medtem ko so bile vrednosti GSSG pri teh tretiranjih znižane. Med CBZ-2gPEU in VPA-2gPEU so bile razlike opazne pri GPx ($p=0,002$), MDA ($p=0,004$), GSH ($p=0,038$) in pri razmerju GSH/GSSG ($p=0,036$). Vrednosti so bile vedno višje pri skupini, kjer je prisotna VPA (slika 22).



Slika 22: Relativne aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava kombinacije CBZ-VPA, drugih kombinacij s CBZ in drugih kombinacij z VPA. *, •, ◆ $p < 0,05$ pri primerjavi različnih skupin med sabo

Razlik pri SOD in CAT torej tudi pri primerjavi tretiranj s kombinacijami učinkovin med sabo nismo dokazali. Sklepamo, da superoksidni radikal oziroma vodikov peroksid nista glavna vira RS pri celicah, ki smo jih izpostavili PEU. Lahko se tvorijo drugi peroksidi, in ne vodikov peroksid, ki zvišajo aktivnost GPx. Vzrok, da med skupinami nismo dokazali razlik, bi lahko bil tudi le blago povečan OS, ko naj bi imela nalogo odstranjevanja peroksida predvsem GPx, medtem ko pride pri resnejšem povešanju oksidativnega stresa do povečanja aktivnosti katalaze (51).

Rezultati naših poskusov najbolj očitno kažejo na prisotno razliko v glutationskem sistemu. Pri kombinaciji CBZ-VPA sta bila GSH in GSSG značilno povišana v primerjavi z drugimi politretiranj. Tudi pri primerjavi treh skupin – CBZ-VPA, CBZ-2gPEU in VPA-2gPEU – smo dokazali statistične razlike v GPx in GSH, ki kažejo na to, da ima na glutationski sistem velik vpliv 1. generacija PEU.

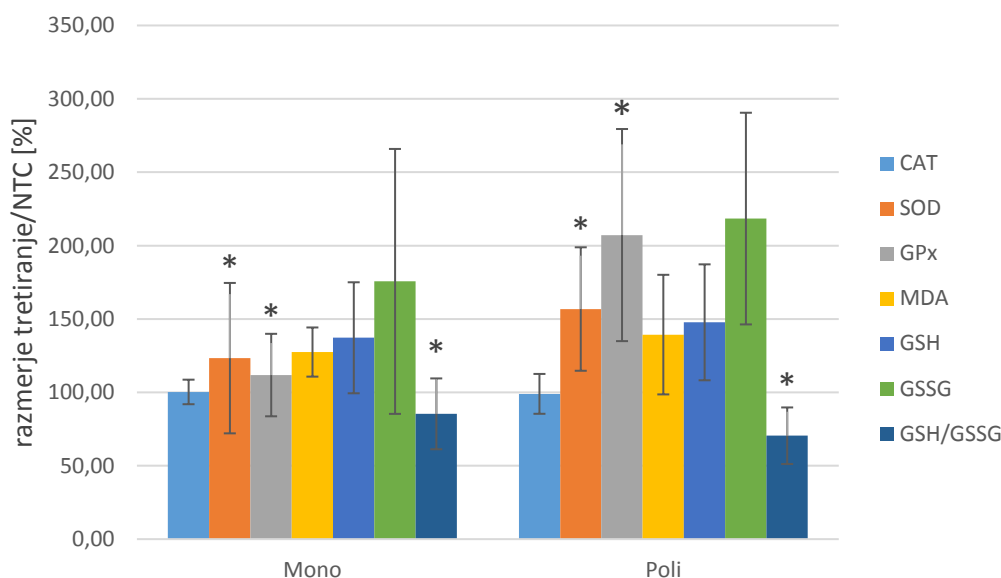
Politretiranja z VPA-2gPEU so bolj povečala GSH in GPx kot CBZ-2gPEU, prav tako je imela večji vpliv na ta dva označevalca kombinacija CBZ-VPA kot pa politretiranja CBZ-2gPEU, medtem ko pri primerjavi tretiranj CBZ-VPA in VPA-2gPEU ni bilo razlik v GSH in GPx.

Kombinacije PEU so imele podoben vpliv na MDA kot na glutationski sistem. Tudi tu so bile statistično značilne razlike med skupinami in koncentracije MDA višje pri tretiranjih z dodano VPA, torej pri tretiranjih s kombinacijami CBZ-VPA ali VPA-2gPEU.

Na podlagi sprememb GPx, GSH in MDA sklepamo, da kombinacije z VPA vplivajo na oksidativni stres in v večji meri kot kombinacije s CBZ (slika 22).

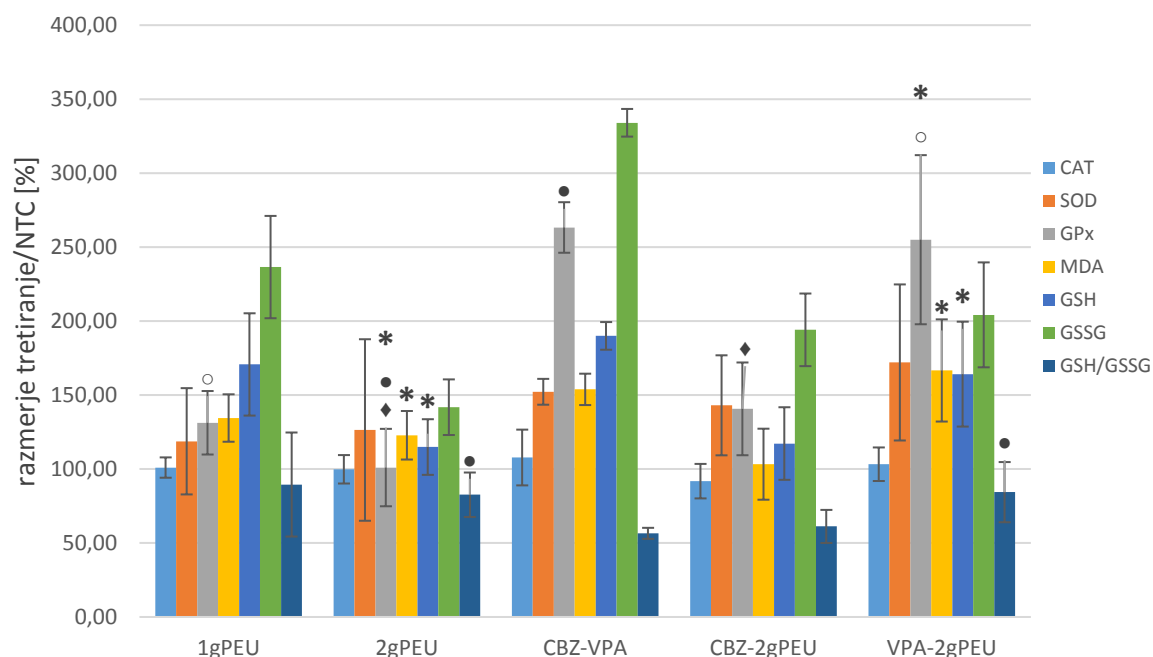
4.2.3 Primerjava monotretiranj in politretiranj

Monotretiranja smo primerjali s politretiranjmi. Tretiranja samo z eno učinkovino so imela značilno manjšo aktivnost SOD ($p=0,005$) in GPx ($p<0,001$) in razmerje GSH/GSSG ($p=0,033$) zvišano (slika 23).



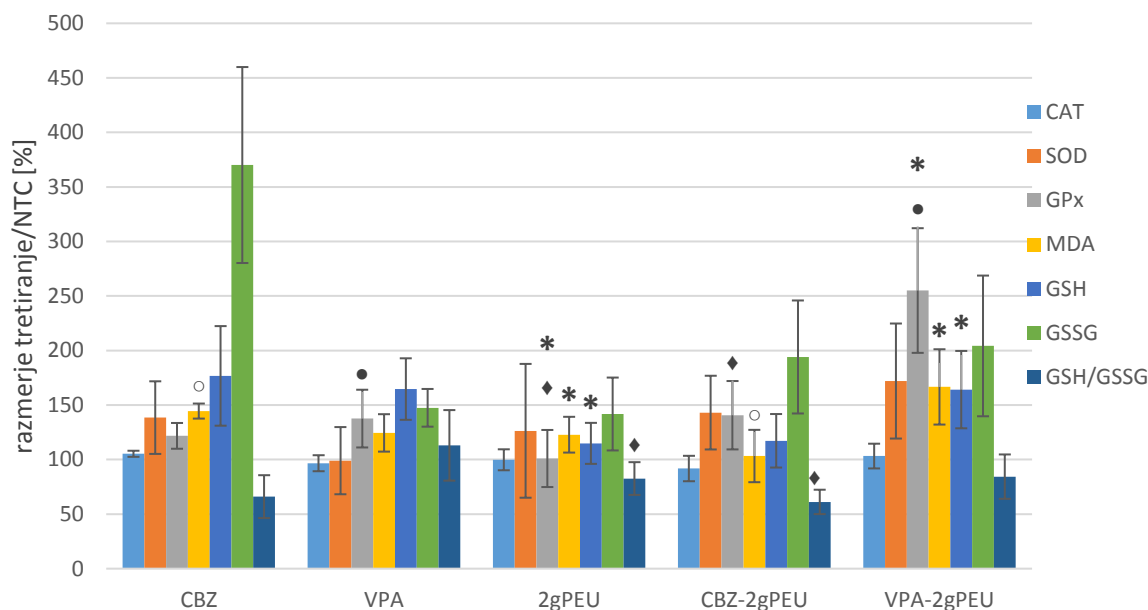
Slika 23: Relativna aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava monotretiranj in politretiranj. * $p<0,05$ pri primerjavi teh dveh skupin

Kombinacije učinkovin smo razdelili v tri skupine (CBZ-VPA, CBZ-2gPEU, VPA-2gPEU) in jih primerjali z monotretiranjmi, ki smo jih razdelili v dve skupini (1gPEU, 2gPEU). To je prikazano na sliki 24. Pri primerjavi posameznih parov skupin smo največkrat dokazali razliko med 2gPEU in VPA-2gPEU. V teh primerih je bil pri politretiranju z VPA povišan GPx ($p=0,002$), MDA ($p=0,032$) in GSH ($p=0,025$). Med tretiranjmi s CBZ-2gPEU in 2gPEU, smo določili razliko le pri GPx ($p=0,029$).



Slika 24: Relativna aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava monotretiranj in kombinacij. *, ●, ◆, ○ $p < 0,05$ pri primerjavi različnih skupin med sabo

V nadaljevanju smo monotretiranja s CBZ, VPA in 2gPEU primerjali s kombinacijami učinkovin CBZ-2gPEU in kombinacijami VPA-2gPEU (slika 25). Ponovno smo največkrat zasledili razlike pri primerjavi 2gPEU in VPA-2gPEU. Statistično pomembno razliko smo določili pri GPx ($p=0,001$), MDA ($p=0,022$) in GSH ($p=0,016$). Pri primerjavi 2gPEU in CBZ-2gPEU smo določili razliko pri GPx ($p=0,021$) in GSH/GSSG ($p=0,022$). Med tretiranjem VPA in VPA-2-gPEU smo tudi dokazali razliko v GPx ($p=0,025$). Tretiranje s CBZ se je od tretiranja s CBZ-2gPEU razlikovalo samo v MDA ($p=0,043$).



Slika 25: Relativna aktivnosti encimov in odstotki MDA, GSH, GSSG ter razmerje GSH/GSSG glede na netretirane kontrole po tritedenskem tretiranju s PEU – primerjava tretiranj s CBZ, VPA in kombinacij PEU. *, ●, ◆, ○ $p < 0,05$ pri primerjavi različnih skupin med sabo

Martinc in sod. so v študiji s 49 pacienti z epilepsijo in 14 zdravimi prostovoljci, pri primerjavi terapij s 1gPEU in 2gPEU, opazili razliko pri CAT, predvsem pa pri SOD – oba encima sta bila povišana pri pacientih, ki so se zdravili s 1gPEU. Pri primerjavi monoterapije s 1gPEU, monoterapije z 2gPEU in politerapije so bile aktivnosti encimov najvišje pri pacientih zdravljenih s 1gPEU, srednje pri politerapiji in najnižje pri pacientih na terapiji z 2gPEU (34). Rezultati Martinc in sod. se le delno ujemajo z našimi, saj je bila aktivnost SOD povišana pri celicah THP-1, ki so bile izpostavljene kombinaciji PEU (slika 23). Pri naši analizi podatkov nismo naredili direktne primerjave med skupinami, ki jih omenjajo Martinc in sod., vendar večjih razlik v SOD in CAT tudi pri drugih primerjavah, ki smo jih opravili, nismo dokazali. Možni vzroki za razlike, so, kot že omenjeno, nižje koncentracije superoksidnega radikala, nastajanje peroksidov, ki jih razgrajuje samo GPx ali razlike v času izpostavljenosti PEU.

Pri primerjavi tretiranj z eno samo učinkovino in tretiranj s kombinacijami nismo statistično dokazali razlike v aktivnosti GSH. Vseeno lahko na podlagi razlik v aktivnosti GPx in razmerju GSH/GSSG, kjer je bilo razmerje zmanjšano pri tretiranjih s kombinacijami PEU (slika 23), sklepamo, da imajo na oksidativni stres večji učinek kombinacije PEU.

Večkrat smo dokazali statistične razlike pri primerjavi monotretiranj z 2gPEU s politretiranj. Na sliki 24 vidimo, da kombinacije s CBZ niso imele tako velikega vpliva na glutationski sistem, kot pa kombinacije z VPA. Med tretiranj z 2gPEU in politretiranj s CBZ-2gPEU ali VPA-2gPEU smo dokazali razlike v GPx, je bil nižji pri CBZ-2gPEU kot pri VPA-2gPEU.

V kliničnih študijah so dokazali signifikantne razlike pri primerjavi OS med zdravimi osebami in bolniki na terapiji s PEZ, kjer so dokazali zvišane aktivnosti GPx pri bolnikih z epilepsijo (52, 53, 54, 55), kar se ujema z našimi rezultati na celicah. Rezultati našega poskusa se pri primerjavi GPx ne ujemajo z ugotovitvami študije Martinc in sod., kjer je pri bolnikih, ki so se zdravili s PEZ, prišlo do upada aktivnosti GPx. Možna razlaga takšnih razhajanj je, da se aktivnost GPx najprej poveča, z daljšo izpostavitvijo PEU, pa pride do upada aktivnosti.

Za obsežnejšo sliko glutationskega sistema, bi bilo potrebno izmeriti tudi spremembe glutacione reduktaze in jih primerjati z aktivnostjo glutacione peroksidaze.

Skoraj vsi pari, med katerimi smo določili statistično pomembne razlike v MDA, so vsebovali tudi VPA. VPA je najbolj vplival na oksidativni stres tudi pri drugih poskusih in sicer krajši, 24-urni, izpostavljenosti PEU, kjer je povzročila porast MDA in ROS. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi po enotedenski inkubaciji s PEU (56, 57).

Med tretiranj s CBZ in kombinacijami CBZ-2gPEU je bil MDA povečan pri tretiranjih s CBZ. Do podobnih rezultatov so prišli tudi pri diplomskih nalogah opravljenih na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, kjer je CBZ v območju terapevtskih koncentracij pri RAMOS in perifernih krvnih mononuklearnih celicah, izpostavljenih PEU 48 ur, povzročil oksidativni stres, medtem ko v kombinacijah z LEV in TOP ni prišlo do sprememb v koncentraciji MDA oziroma lipidni peroksidaciji (43, 55, 58). Iz tega lahko sklepamo, da imajo nekatere kombinacije PEU ugoden vpliv na celice oziroma nakazujejo, da bi 2gPEU lahko zmanjševala lipidno peroksidacijo, vendar so za potrditev domneve potrebne dodatne študije.

Pri primerjavi tretiranj z 2gPEU s tretiranj CBZ-2gPEU smo dokazali statistične razlike le v GPx in razmerju GSH/GSSG, pri primerjavi 2gPEU s kombinacijami VPA-2gPEU pa so bile opazne razlike v glutationskem sistemu in MDA, prav tako so bili ti označevalci povišani pri VPA-2gPEU, ko smo jih primerjali s CBZ-2gPEU. Razlike lahko vidimo tudi

na sliki 25. Na podlagi tega sklepamo, da kombinacije z VPA povzročijo večji obseg oksidativnih poškodb kot kombinacije s CBZ.

Pavone in sod. v študiji niso dokazali razlik med nezdravljenimi in zdravljenimi (CBZ, fenitoin, VPA, klobazam, fenobarbital, lamotrigin, TOP, LEV) bolniki, ravno tako ne med monoterapijo in politerapijo in svojo študijo so zaključili z ugotovitvijo, da je oksidativni stres pri bolnikih povečan zaradi same epilepsije, zdravljenje s PEZ pa ne vpliva na antioksidantno ravnovesje (48).

Zaključimo lahko, da so rezultati kliničnih raziskav nekonsistentni, kar je verjetno posledica neprimerljivih načrtov raziskav (bolnikov, vrst epilepsij, zdravil, režimov odmerjanj zdravil, metod merjenja OS ...). Študije bi morale v prihodnje skrbno načrtovati. Poskusi na živalih bi morali biti načrtovani na podoben način kot poskusi na različnih celicah, predvsem bi se morale ujemati v trajanju izpostavitve in koncentracijah PEU. Tako bi jih lažje primerjali med sabo ter morebitne ugotovitve potrdili tudi pri bolnikih z epilepsijo.

THP-1 celice niso tako metabolično aktivne. V primeru da oksidativni stres sprožijo metaboliti PEU, bi s tem lahko razložili razhajanja s študijami, ki so jih izvedli na astrocitih, podganah in ljudeh. Zato bi bilo v morebitnih nadaljnjih študijah smiselno THP-1 celice izpostaviti metabolitom PEU ali narediti poskus tudi na metabolično bolj aktivnih celicah, na primer HepG2.

Menimo, da bi lahko v prihodnje poskus dolgotrajne izpostavljenosti PEU razširili, in sicer z večjim naborom PEU, večjim številom bioloških ponovitev in spremljanjem večjega števila označevalcev oksidativnih poškodb skozi več časovnih točk.

5. SKLEPI

Celice THP-1 smo za tri tedne izpostavili terapevtskim koncentracijam PEU prve (karbamazepin, valprojska kislina) in druge generacije (topiramet, levetiracetam in pregabalin) ter kombinacijam. Da bi ugotovili razlike med vplivom protiepileptičnih učinkovin na OS, smo izmerili označevalce OS (MDA, GSH, SOD, CAT, GPx).

Razlik v aktivnosti CAT in SOD nismo potrdili, razen pri primerjavi aktivnosti SOD med monotretiranji in politretiranji. Predhodno postavljene hipoteze smo ovrgli oziroma potrdili na podlagi razlik v glutationskem sistemu (predvsem aktivnosti GPx in koncentraciji GSH) ter MDA.

- I. Hipotezo *Predstavnik prve generacije PEU povzročata večji oksidativni stres v celicah kot predstavniki druge generacije* lahko potrdimo, saj smo pri monotretiranjih dokazali povišan GSH v skupini s 1. generacijo PEU. Hipotezo smo dokazali tudi posredno, saj je kombinacija karbamazepin-valprojska kislina v primerjavi s kombinacijami PEU prve in druge generacije statistično značilno povečala glutation in njegovo oksidirano obliko. Pri primerjavi monotretiranj z 2. generacijo PEU in politretiranj z dodano valprojsko kislino in/ali karbamazepinom smo dokazali razlike v glutationskem sistemu pri slednjih.
Rezultati kažejo tudi, da kombinacije z VPA povzročijo večji obseg oksidativnih poškodb kot kombinacije s CBZ, saj so bili označevalci OS pri prvih bolj povišani. Med posameznimi predstavniki PEU 2. generacije nismo dokazali razlik. Učinke PEU na oksidativni stres bi bilo smiselno še natančneje preučiti in določiti razlike med predstavniki znotraj generacije.
- II. Hipotezo *Kombinacija PEU povzroča večji oksidativni stres kot izpostavitve le posameznim PEU* lahko potrdimo. Pri primerjavi monotretiranj in politretiranj smo dokazali razlike v aktivnosti glutation peroksidaze in razmerju GSH/GSSG. Kombinacije z VPA izkazujejo zelo povečan OS v primerjavi z monotretiranjmi s PEU 2. generacije.
- III. Hipoteze *Oksidativni stres v celicah se z daljšanjem časa izpostavljenosti PEU spreminja* ne moremo potrditi. S spremljanjem oksidativnega stresa tekom treh tednov nismo dokazali časovne odvisnosti.

Oksidativni stres v celicah izpostavljenih PEU, bi bilo v prihodnje smiselno spremljati dlje kot tri tedne.

Dodatne študije, ki bi potrdile vpliv protiepileptičnih učinkovin na oksidativni stres, bi bile pomembne za razvoj novih zdravil oziroma vpeljavo novih pristopov terapije epilepsije z antioksidanti.

6. LITERATURA

- 1 World Health Organization: Fact sheet about epilepsy - updated February 2016 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> (dostop 1.9.2016)
- 2 Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology, Churchill Livingstone, 5. izdaja, Edinburgh, 2003: 550–562.
- 3 Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE: ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55(4): 475–482
- 4 Cvetko B: Knjiga o epilepsiji, samozaložba, Rašica, 2011: 18–73.
- 5 Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of medicinal chemistry, 5th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2002: 384–407.
- 6 Cross JH: Setting the scene: definition of prolonged seizures, acute repetitive seizures, and status epilepticus. Do we know why seizures stop? *Epileptic Disorders*. 2014; 16(1): 2–5.
- 7 Zgonc V, Čebular B: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Zdravniški vestnik* 2006; 75:379–88.
- 8 The National Institute for Health and Care Excellence. The epilepsies: diagnosis and management. NICE. January 2012; Clinical Guideline 137.
- 9 Brodie MJ, Covanis A, Gil-Nagel A, Lerche H, Perucca E, Sills GJ, White HS: Antiepileptic drug therapy: Does mechanism of action matter? *Epilepsy & Behavior* 2011; 21: 331–341.
- 10 Brodie MJ: Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* 2010; 19: 650–655.
- 11 Reimers A, Brodtkorb E: Second-generation antiepileptic drugs and pregnancy: A guide for clinicians. *Exp. Rev. Neurother.* 2012; 12, 707–717.
- 12 Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI: 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): 1239–76.
- 13 French JA, Kanner AM, Bautista J, Abou-Khalil B, Browne T, Harden CL: Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs, II: Treatment of refractory epilepsy: report of the TTA and QSS Subcommittees of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Epilepsia* 2004; 45(5):410–23.

- 14 Lamb EJ, Stevens PE, Nashef L: Topiramate increases biochemical risk of nephrolithiasis. *Annals of Clinical Biochemistry* 2004; 41(2):166–9.
- 15 Potschka H: Pharmacological treatment strategies: Mechanisms of antiepileptic drugs. *Epileptology* 2013; 1:31–37.
- 16 Opp J, Tuxhorn I, May T, Kluger G, Wiemer-Kruel A, Kurlemann G, Gross-Selbeck G, Rating D, Brandl U, Bettendorf U, Härtel C, Korn-Merker E: Levetiracetam in children with refractory epilepsy: a multicenter open label study in Germany. *Seizure* 2005; 14(7): 476–84.
- 17 Sirsi D, Safdieh JE: The safety of levetiracetam. *Expert Opinion on Drug Safety* 2007; 6(3): 241–50.
- 18 Kamel JT, D'Souza WJ, Cook MJ: Severe and disabling constipation: An adverse effect of pregabalin. *Epilepsia* 2010, 51(6): 1094–1096.
- 19 Kavoussi R: Pregabalin: From molecule to medicine. *European Neuropsychopharmacology* 2006; 16: 128–133.
- 20 Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 16-39, 77-96, 199–211.
- 21 Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T: Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed Research International* 2015; 2015:1–20.
- 22 Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*, 4th edition. Oxford University Press 2007: 8–29, 79–115, 149–166, 187–264, 268–277, 309–335.
- 23 Osredkar J: Oksidativni stres/Oxidative stress. *Zdravniški vestnik* 2012; 81(5): 393–406.
- 24 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2007; 39: 44–84.
- 25 Buetler TM, Krauskopf A, Ruegg UT. Role of superoxide as a signaling molecule. *News in Physiological Science* 2004; Jun19: 120–3.
- 26 Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions* 2006; Mar 10: 160(1): 1–40.
- 27 Ribarič S. *Temelji patološke fiziologije*, druga izdaja. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2011: 18–29.

- 28 Poljsak B, Šuput D, Milislav I: Achieving the balance between ROS and Antioxidants: When to use synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013; 2013: 1–11.
- 29 Sies H: Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 1993; 215: 213–219.
- 30 Carmona-Aparicio LC, Pérez-Cruz C, Zavala-Tecuapetla C, Granados-Rojas L, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H: Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy. *International Journal of Molecular Science* 2015; 16: 18348–18367.
- 31 Ma Q: Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2013; 5: 401–26.
- 32 Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. *Farmaceutski vestnik* 2015; 66: 127–132.
- 33 Tsukahara H: Biomarkers for Oxidative Stress: Clinical Application in Pediatric Medicine. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14: 339–351.
- 34 Martinc B: Spremljanje zdravljenja epilepsije z zdravili in vloga nekaterih kazalcev oksidativnega stresa. *Doktorska disertacija* 2015; 154–184.
- 35 Cardenas-Rodrigues N, Coballase-Urrutia E, Perez-Cruz C et al: Relevance of the glutathione system in temporal lobe epilepsy: evidence in human and experimental models. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014; vol. 2014.
- 36 Martinc B, Grabnar I, Vovk T: Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of Current Status. *Current Neuropharmacology* 2014; 12: 527–550.
- 37 Devi PU, Manocha A, Vahora D: Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2008; 9(18): 3169–77.
- 38 Majkowski J, Westermarck T, Atroschi F: Oxygen stress: epilepsy and antiepileptic drugs. *Epileptologia* 2011; 19: 143–157.
- 39 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. *Toxicological sciences* 2012; 130(1): 4–16.
- 40 Martinc B, Grabnar I, Vovk T: The role of Reactive Species in Epileptogenesis and Influence of Antiepileptic Drug Therapy on Oxidative Stress. *Current Neuropharmacology* 2012; 10: 328–343.
- 41 Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* 2014; 23(1): 37-45.

- 42 Zitka O, Skalickova S, Gumulec J: Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology letters* 2012, 4:1247–1263.
- 43 Čvan M: Vpliv protiepileptičnih učinkovin na oksidativni stres v celični liniji limfocitov B. *Diplomska naloga*, 2013.
- 44 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 research* 2009; 1266:1-7
- 45 Oliveira AA, Almeida JP, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LM, Júnior 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. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2007; 27(3): 395–406.
- 46 Stettner M, Dehme T, Mausberg AK, Köhne A, Rose CR, Kieseier BR. Levetiracetam exhibits protective properties on rat Schwann cells in vitro. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2011; 16: 250–260.
- 47 Chuang YC et al: Effects of long-term antiepileptic drug monotherapy on vascular risk factors and atherosclerosis. *Epilepsia* 2012; 53(1): 120–8.
- 48 Pavone A, Cardile V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia*, 2003; 44 (10): 34–9.
- 49 Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Elger CE, Kunz WS: The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45(12): 1478–87.
- 50 Cardenas-Rodriguez N, Coballase-Urrutia E, Huerta-Gertrudis B, et al. Antioxidant activity of topiramate: an antiepileptic agent. *Neurological Sciences*. 2013; 34(5): 741–747.
- 51 Mates JM: Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 82–10.
- 52 Sobaniec W, Solowiej E, Kulak W: Evaluation of the influence of antiepileptic therapy on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in erythrocytes of children with epilepsy. *Journal of child neurology* 2006; 21(7): 558–62.

-
- 53 Keskin Guler S, Aytac B, Durak ZE, Gokce Cokal B, Gunes N, Durak I, Yoldas T: Antioxidative-oxidative balance in epilepsy patients on antiepileptic therapy: a prospective case-control study. *Neurological Sciences* 2016; 37(5): 763–7.
- 54 Menon B, Ramalingam K, Kumar RV: Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. *Seizure* 2012; 21(10) 740–4.
- 55 Menon B, Ramalingam K, Kumar RV: Low plasma antioxidant status in patients with epilepsy and the role of antiepileptic drugs on oxidative stress. *Annals of Indian Academy of Neurology* 2014; 17:398–404.
- 56 Pukšič P: Proučevanje vpliva starejše generacije protiepileptičnih učinkovin na nastanek oksidativnega stresa v celičnih linijah. *Diplomska naloga*, 2014.
- 57 Franko N: Preučevanje vpliva protiepileptičnih učinkovin prve in druge generacije na nastanek oksidativnega stresa na celicah THP-1. *Magistrska naloga*, 2015.
- 58 Robnik B: Vrednotenje označevalcev oksidativnega stresa v celicah podvrženim protiepileptičnim učinkovinam. *Diplomska naloga*, 2013.

7. PRILOGA

7.1 REZULTATI MERITEV OZNAČEVALCEV OKSIDATIVNEGA STRESA PO 3. TEDNU NORMIRANI NA NETRETIRANE KONTROLE

Preglednica XVI: Relativna aktivnost CAT v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.

BIOLOŠKA PONOVIŠTEV	NTC	DMSO	CBZ	VPA	TOP	LEV	PRG	CBZ LEV	CBZ PRG	CBZ TOP	CBZ VPA	VPA LEV	VPA PRG	VPA TOP
A	104,06	92,62	106,97	88,61	103,03	90,21	91,16	85,26	92,68	79,85	86,76	89,42	107,23	88,40
B	100,37	105,99	102,09	103,00	116,25	90,28	108,35	99,46	76,41	91,63	113,48	88,66	112,40	112,50
C	95,57	103,87	106,87	98,37	91,61	107,50	99,97	85,62	113,40	101,87	123,14	115,34	103,39	111,78
POVPREČJE (%)	100,00	100,83	105,31	96,66	103,63	96,00	99,83	90,12	94,16	91,12	107,79	97,81	107,68	104,23
SD	3,47	5,87	2,28	6,00	10,07	8,14	7,02	6,61	15,13	9,00	15,39	12,40	3,69	11,20
RSD	3,47	5,82	2,16	6,21	9,72	8,47	7,03	7,34	16,07	9,88	14,27	12,68	3,43	10,74

Preglednica XVII: Relativna aktivnost SOD v celicah v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.

BIOLOŠKA PONOVIŠTEV	NTC	DMSO	CBZ	VPA	TOP	LEV	PRG	CBZ LEV	CBZ PRG	CBZ TOP	CBZ VPA	VPA LEV	VPA PRG	VPA TOP
A	76,36	124,01	128,18	129,75	73,72	118,90	97,14	89,15	137,83	192,61	161,51	273,93	218,72	182,70
B	62,50	125,35	111,58	99,14	114,30	116,97	111,58	174,75	111,58	171,83	144,18	115,89	135,95	137,83
C	161,14	179,51	175,70	68,14	95,22	125,11	284,46	113,68	150,52	145,65	150,94	161,86	203,06	118,29
POVPREČJE (%)	100,00	142,96	138,49	99,01	94,41	120,33	164,39	125,86	133,31	170,03	152,21	183,89	185,91	146,27
SD	53,40	31,66	33,28	30,80	20,30	4,26	104,23	44,08	19,86	23,53	8,73	81,29	43,97	33,02
RSD	53,40	22,15	24,03	31,11	21,51	3,54	63,40	35,02	14,90	13,84	5,74	44,21	23,65	22,58

Preglednica XVIII Relativna aktivnost GPx v celicah v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.

BIOLOŠKA PONOVIŠTEV	NTC	DMSO	CBZ	VPA	TOP	LEV	PRG	CBZ LEV	CBZ PRG	CBZ TOP	CBZ VPA	VPA LEV	VPA PRG	VPA TOP
A	112,76	94,15	-	112,76	116,78	133,07	89,07	119,75	143,02	139,63	248,59	289,84	346,33	300,00
B	60,51	88,01	113,40	134,56	111,07	86,53	119,96	136,67	137,09	151,90	282,02	210,72	192,31	225,74
C	126,73	129,48	130,11	165,44	54,37	74,47	123,55	82,72	153,39	201,83	259,17	174,75	290,69	264,67
POVPREČJE (%)	100,00	103,88	112,76	137,59	94,08	98,03	110,86	113,05	144,50	164,46	263,26	225,11	276,45	263,47
SD	34,91	22,38	11,82	26,47	34,50	30,95	18,96	27,59	8,25	32,95	17,08	58,88	77,99	37,14
RSD	34,91	21,55	9,71	19,24	36,68	31,57	17,10	24,41	5,71	20,03	6,49	26,16	28,21	14,10

Preglednica XIX: Relativna koncentracija MDA v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.

BIOLOŠKA PONOVIŠTEV	NTC	DMSO	CBZ	VPA	TOP	LEV	PRG	CBZ LEV	CBZ PRG	CBZ TOP	CBZ VPA	VPA LEV	VPA PRG	VPA TOP
A	91,59	141,56	140,53	140,40	105,75	136,61	101,55	89,89	115,28	-	165,90	111,56	202,18	177,83
B	92,52	108,80	140,47	106,29	109,86	128,69	123,48	97,32	90,48	102,45	149,59	152,18	158,43	152,47
C	115,89	105,46	152,45	126,68	119,23	125,82	154,32	62,86	133,53	134,25	146,02	153,22	232,93	158,82
POVPREČJE (%)	100,00	118,61	144,48	124,46	111,61	130,37	126,45	83,36	113,10	118,35	153,84	138,99	197,84	163,04
SD	13,77	19,95	6,90	17,16	6,91	5,59	26,51	18,13	21,60	22,48	10,60	23,76	37,44	13,20
RSD	13,77	16,82	4,78	13,79	6,19	4,29	20,97	21,75	19,10	19,00	6,89	17,09	18,92	8,09

Preglednica XX: Relativna koncentracija GSH v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.

BIOLOŠKA PONOVIŠTEV	NTC	DMSO	CBZ	VPA	TOP	LEV	PRG	CBZ LEV	CBZ PRG	CBZ TOP	CBZ VPA	VPA LEV	VPA PRG	VPA TOP
A	91,60	116,21	124,34	190,01	90,02	132,70	90,60	104,78	135,51	149,92	199,41	184,50	118,63	142,71
B	104,29	107,07	197,95	169,66	111,47	111,06	142,99	128,12	103,48	124,89	189,81	210,82	150,56	157,77
C	104,11	73,59	207,93	134,29	102,24	120,84	131,92	64,38	116,75	127,21	180,73	218,54	122,85	170,92
POVPREČJE (%)	100,00	98,95	176,74	164,65	101,24	121,53	121,84	99,10	118,58	134,01	189,98	204,62	130,68	157,14
SD	7,27	22,44	45,65	28,20	10,76	10,83	27,61	32,25	16,09	13,83	9,34	17,85	17,35	14,11
RSD	7,27	22,68	25,83	17,13	10,63	8,91	22,67	32,55	13,57	10,32	4,92	8,72	13,27	8,98

Preglednica XXI: Relativna koncentracija GSSG v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.

BIOLOŠKA PONOVIŠTEV	NTC	DMSO	CBZ	VPA	TOP	LEV	PRG	CBZ LEV	CBZ PRG	CBZ TOP	CBZ VPA	VPA LEV	VPA PRG	VPA TOP
A	84,19	148,49	-	127,96	108,25	192,74	79,92	193,92	160,11	267,32	346,93	278,34	124,67	232,06
B	115,88	107,15	306,55	153,50	160,12	144,15	138,04	205,20	141,71	215,93	357,15	232,88	144,28	217,53
C	99,92	87,65	433,60	160,92	133,32	147,36	172,14	117,00	177,90	267,62	298,04	224,90	104,02	279,19
POVPREČJE (%)	100,00	114,43	370,08	147,46	133,90	161,42	130,03	172,04	159,91	250,29	334,04	245,38	124,32	242,93
SD	15,84	31,07	89,84	17,29	25,94	27,17	46,63	48,00	18,10	29,76	31,60	28,83	20,13	32,24
RSD	15,84	27,15	24,28	11,72	19,37	16,83	35,86	27,90	11,32	11,89	9,46	11,75	16,19	13,27

Preglednica XXII: Relativna vrednost razmerja GSH/GSSG v celicah izpostavljenih različnim medijem po treh tednih tretiranja.

BIOLOŠKA PONOVIŠTEV	NTC	DMSO	CBZ	VPA	TOP	LEV	PRG	CBZ LEV	CBZ PRG	CBZ TOP	CBZ VPA	VPA LEV	VPA PRG	VPA TOP
A	107,73	77,49	86,64	147,03	82,34	68,17	112,25	53,50	83,80	55,53	56,91	65,63	94,22	60,89
B	89,11	98,94	63,94	109,43	68,93	76,29	102,57	61,82	72,30	57,27	52,62	89,63	103,33	71,81
C	103,16	-	47,48	82,63	75,93	81,19	75,88	54,48	64,98	47,07	60,04	96,22	116,94	60,62
POVPREČJE (%)	100,00	88,22	66,02	113,03	75,73	75,22	96,90	56,60	73,69	53,29	56,53	83,83	104,83	64,44
SD	9,70	15,17	19,66	32,35	6,71	6,58	18,83	4,55	9,49	5,46	3,73	16,10	11,43	6,39
RSD	9,70	17,19	29,78	28,62	8,85	8,75	19,44	8,03	12,87	10,24	6,59	19,20	10,91	9,91