

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽKA PIBERNIK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽKA PIBERNIK

**SPREMLJANJE OKSIDATIVNEGA STRESA V PERIFERNIH
MONONUKLEARNIH CELICAH, IZPOSTAVLJENIH
PROTIEPILEPTIČNIM UČINKOVINAM PRVE IN DRUGE
GENERACIJE**

**OXIDATIVE STRESS IN PERIPHERAL BLOOD
MONONUCLEAR CELLS EXPOSED TO ANTIEPILEPTIC
DRUGS OF FIRST AND SECOND GENERATION**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Matevža Prijatelja, mag. farm.

Stvari, za katere bi morali biti hvaležni, prepogosto vzamemo za samoumevne. Zato bi se rada za vso strokovno pomoč in usmerjanje med diplomsko nalogo zahvalila mentorju doc. dr. Tomažu Vovku, mag. farm. Prav tako se za pomoč in nasvete pri kliničnem delu diplomske naloge zahvaljujem somentorju asist. dr. Matevžu Prijatelju, mag. farm.

Tijani Markovič, mag. farm., gre velika zahvala za vse ure, ki jih je z menoj preživela v laboratoriju in mi pomagala pri delu s celicami.

Zahvaljujem se vsem prijateljicam in prijateljem, ki so mojo študijsko pot naredili veliko lažjo in zabavnejšo. Prav iskrena zahvala pa gre mojim domačim in fantu Marku, ki niso nikoli skoparili s pohvalami in so mi vedno stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm., in somentorja asist. dr. Matevža Prijatelja, mag. farm.

Nežka Pibernik

Ljubljana, september 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Rok Dreu, mag. farm.

KAZALO

1. UVOD	1
1.1. EPILEPSIJA	1
1.2. PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA	3
1.2.1. Prva generacija protiepileptičnih zdravil	5
1.2.2. Druga generacija protiepileptičnih zdravil	6
1.2.3. Tretja generacija protiepileptičnih zdravil.....	8
1.3. OKSIDATIVNI STRES	9
1.3.1. Reaktivne zvrsti	9
1.3.2. Vir reaktivnih kisikovih zvrsti.....	10
1.3.3. Oksidativne poškodbe	11
1.3.4. Zaščita pred oksidativnimi poškodbami	14
1.4. EPILEPSIJA IN OKSIDATIVNI STRES.....	16
1.5. PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA IN OKSIDATIVNI STRES.....	17
2. NAMEN DELA	18
3. MATERIALI IN METODE	19
3.1. MATERIALI.....	19
3.1.1. Standardi	19
3.1.2. Reagenti in topila	19
3.1.3. Mediji za delo s celicami.....	20
3.1.4. Pufri in raztopine	20
3.1.5. Kompleti za analize.....	21
3.1.6. Laboratorijska oprema	21
3.1.7. Biološki material.....	23
3.2. METODE DELA S CELICAMI	24
3.3. DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA (MDA) V CELICAH S HPLC/MS Z DNPH METODO	32

3.4.	DOLOČANJE GLUTATIONA S HPLC (Chromsystems).....	35
4.	REZULTATI.....	37
4.1.	ODSTOTEK PREŽIVELIH CELIC.....	37
4.1.1.	Pozitivna kontrola.....	37
4.1.2.	Netretirana kontrola	37
4.1.3.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur	38
4.1.4.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur	39
4.1.5.	Primerjava PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 24 in 48 ur	40
4.2.	MERITVE MDA V PBMC.....	40
4.2.1.	Pozitivna kontrola.....	41
4.2.2.	Netretirana kontrola	41
4.2.3.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur	42
4.2.4.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur	43
4.3.	MERITVE GSH V PBMC	44
4.3.1.	Pozitivna kontrola.....	44
4.3.2.	Netretirana kontrola	45
4.3.3.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur	46
4.3.4.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur	46
4.3.5.	Primerjava PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 24 in 48 ur	47
5.	RAZPRAVA.....	48
5.1.	PREŽIVETJE CELIC	48
5.1.1.	Pozitivna kontrola.....	48
5.1.2.	Netretirana kontrola	49
5.1.3.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur	49
5.1.4.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur	49
5.2.	MERITVE MDA V PBMC.....	49
5.2.1.	Pozitivna kontrola.....	50
5.2.2.	Netretirana kontrola	51
5.2.3.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur	51

5.2.4.	PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur	52
5.3.	MERITVE GSH V PBMC	52
5.3.1.	Pozitivna kontrola.....	53
5.3.2.	Netretirana kontrola	53
5.3.3.	PBMC, ki so bile PEZ izpostavljene 72 ur	53
5.3.4.	PBMC, ki so bile PEZ izpostavljene 48 ur	54
5.3.5.	PBMC, ki so bile PEZ izpostavljene 24 in 48 ur	54
5.4.	IZVAJANJE EKSPERIMENTA IN MERITEV	54
6.	SKLEPI.....	57
7.	LITERATURA.....	59

KAZALO SLIK

SLIKA 1: KARBAMAZEPIN (11).....	5
SLIKA 2: TOPIRAMAT (11).	7
SLIKA 3: LEVETIRACETAM (11).	8
SLIKA 4: SHEMA KOMPLEKSOV MITOHONDRIJSKE OKSIDATIVNE FOSFORILACIJE V MITOHONDRIJSKI NOTRANJ MEMBRANI (21).	11
SLIKA 5: POTI LIPIDNE PEROKSIDACIJE (24).	13
SLIKA 6: STRUKTURA REDUCIRANE OBLIKE GLUTATIONA.	16
SLIKA 7: PBMC, OBARVANE S TRIPANSKIM MODRILOM.	24
SLIKA 8: USEDANJE ERITROCITOV IN GRANULOCITOV IZ RAZREDČENEGA BC (ZGORNJA PLAST) SKOZI FIKOL (PROZORNA PLAST). V LEVI CENTRIFUGIRKI SE JE DEL ERITROCITOV IN GRANULOCITOV ŽE USEDEL NA DNO.....	25
SLIKA 9: RAZREDČEN BC PRED CENTRIFUGIRANJEM (LEVO) IN PO CENTRIFUGIRANJU (DESNO).	26
SLIKA 10: POZITIVNA KONTROLA: SHEMA IZPOSTAVLJANJA CELIC H_2O_2 V MIKROTITRSKI PLOŠČICI S 6 VDOLBINAMI.	29
SLIKA 11: NETRETIRANA KONTROLA: SHEMA IZPOSTAVLJANJA CELIC DMSO V MIKROTITRSKI PLOŠČICI Z 6 VDOLBINAMI.	30
SLIKA 12: SHEMA IZPOSTAVLJANJA CELIC PEZ V MIKROTITRSKI PLOŠČICI S 6 VDOLBINAMI. CELICAM V LEVI MIKROTITRSKI PLOŠČICI SMO DODALI 4 ML OSNOVNE RAZTOPINE PEZ S KONCENTRACIJO 1 MG/ML, CELICAM V DESNI MIKROTITRSKI PLOŠČICI PA 4 ML OSNOVNE RAZTOPINE PEZ S KONCENTRACIJO 50 MG/ML.....	31
SLIKA 13: GRAFIČNI PRIKAZ POVPREČNIH KONCENTRACIJ MDA V CELICAH RAMOS, KI SO BILI 4 URE IZPOSTAVLJENI GOJIŠČU (CTRL) IN 5 MM VODIKOVEMU PEROKSIDU. ANALIZA VZORCEV Z DNPH METODO ZA DOLOČANJE CELOKUPNEGA MDA.....	41
SLIKA 14: GRAFIČNI PRIKAZ KONCENTRACIJ MDA V PBMC, KI SO BILE IZPOSTAVLJENE 0,1% DMSO IN INKUBIRANE 0, 24, 48 IN 72 UR. ANALIZA VZORCEV Z DNPH METODO ZA DOLOČANJE CELOKUPNEGA MDA.	42
SLIKA 15: GRAFIČNI PRIKAZ KONCENTRACIJ MDA V PBMC, KI SO BILE 72 UR IZPOSTAVLJENE 0,1% DMSO (CTRL 1 IN CTRL 50) OZIROMA PEZ V KONCENTRACIJAH 1 MG/ML (CBZ 1, TOP 1, LEV 1) IN 50 MG/ML (CBZ 50, TOP 50, LEV 50). ANALIZA VZORCEV Z DNPH METODO ZA DOLOČANJE CELOKUPNEGA MDA.	43
SLIKA 16: GRAFIČNI PRIKAZ KONCENTRACIJ MDA V PBMC, KI SO BILE 48 UR IZPOSTAVLJENE 0,1% DMSO (CTRL 1 IN CTRL 50) OZIROMA PEZ V KONCENTRACIJAH 1 MG/ML (CBZ 1, TOP 1, LEV 1) IN 50 MG/ML (CBZ 50, TOP 50, LEV 50). ANALIZA VZORCEV Z DNPH METODO ZA DOLOČANJE CELOKUPNEGA MDA.	44

SLIKA 17: GRAFIČNI PRIKAZ POVPREČNIH KONCENTRACIJ GSH V CELICAH RAMOS, KI SO BILE 4 URE IZPOSTAVLJENE GOJIŠČU (CTRL) OZIROMA 5 MM VODIKOVEMU PEROKSIDU.	45
SLIKA 18: GRAFIČNI PRIKAZ POVPREČNIH KONCENTRACIJ GSH V PBMC, KI SO BILE IZPOSTAVLJENE 0,1 % DMSO IN VZORČENE PO 0-, 24-, 48- IN 72-IH URAH.	45
SLIKA 19: GRAFIČNI PRIKAZ KONCENTRACIJ GSH V PBMC, KI SO BILE 72 UR IZPOSTAVLJENE 0,1% DMSO (CTRL 1 IN CTRL 50) OZIROMA PEZ V KONCENTRACIJAH 1 MG/ML (CBZ 1, TOP 1, LEV 1) IN 50 MG/ML (CBZ 50, TOP 50, LEV 50).	46
SLIKA 20: GRAFIČNI PRIKAZ KONCENTRACIJ GSH V PBMC, KI SO BILE 48 UR IZPOSTAVLJENE 0,1% DMSO (CTRL 1 IN CTRL 50) OZIROMA PEZ V KONCENTRACIJAH 1 MG/ML (CBZ 1, TOP 1 IN LEV 1) IN 50 MG/ML (CBZ 50, TOP 50 IN LEV 50).	47
SLIKA 21: GRAFIČNI PRIKAZ KONCENTRACIJ GSH V PBMC, KI SO BILE 24 IN 48 UR IZPOSTAVLJENE 0,1 % DMSO (CTRL 1 IN CTRL 50) OZIROMA PEZ V KONCENTRACIJAH 1 MG/ML (CBZ 1, TOP 1 IN LEV 1) IN 50 MG/ML (CBZ 50, TOP 50 IN LEV 50). PBMC SMO VZORČILI IZ ISTEGA VZORCA.	47

POVZETEK

Epilepsija je ena najpogostejših nevroloških bolezni, za katero trpi približno 50 milijonov ljudi po vsem svetu. Protiepileptične učinkovine prve generacije so zelo učinkovite pri preprečevanju epileptičnih napadov, vendar pa se jih veliko presnavlja do reaktivnih metabolitov, ki so lahko odgovorni za nastanek oksidativnega stresa. Protiepileptične učinkovine naj bi imele različne učinke na antioksidativne sisteme in posledično tudi na nastanek oksidativnih poškodb bioloških makromolekul. V zadnjem desetletju so na tržišče prišle učinkovine druge generacije, ki imajo primerljivo učinkovitost s prvo generacijo, vendar so bistveno bolj varne.

Kot eksperimentalni model za določanje vpliva protiepileptičnih učinkovin na oksidativni stres smo izbrali periferne mononuklearne celice. Ugotoviti smo hoteli vpliv časa izpostavljenosti, koncentracije in vrste protiepileptičnih učinkovin na nastanek oksidativnega stresa v perifernih mononuklearnih celicah. Periferne mononuklearne celice smo izpostavili karbamazepinu (predstavnik prve generacije), topiramatu in levetiracetamu (predstavnik druge generacije) v koncentracijah 1 in 50 $\mu\text{g/ml}$ in jih inkubirali 48 oziroma 72 ur. Za negativno kontrolo smo celice 72 ur inkubirali v 0,1% dimetilsulfoksidu, za pozitivno kontrolo pa smo celice celične linije Ramos izpostavili 5 mM vodikovemu peroksidu. Spremembe oksidativnega stresa smo merili preko malondialdehida, ki je označevalec lipidne peroksidacije, in reducirane oblike glutationa, ki je glavni intracelularni neencimski antioksidant.

Opazili smo, da s časom inkubacije celic v 0,1% dimetilsulfoksidu narašča koncentracija malondialdehida in pada koncentracija reduciranega glutationa. V celicah, izpostavljenih protiepileptičnim učinkovinam, so bile koncentracije označevalcev oksidativnega stresa zelo variabilne, zato nismo mogli govoriti o povečanju malondialdehida oziroma zmanjšanju reduciranega glutationa. Opazili nismo niti bistvenih razlik v povzročanju oksidativnega stresa med prvo in drugo generacijo protiepileptičnih učinkovin.

Imeli smo zelo slabo ponovljivost rezultatov, ki pa bi se jo dalo z optimizacijo gojenja celic in analiznih metod, s katerimi smo spremljali oksidativni stres, bistveno izboljšati. To bi omogočilo pridobitev bolj zanesljivih rezultatov.

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common chronic brain disorders, affecting around 50 million people worldwide. The first generation of antiepileptic drugs is very efficient in preventing epileptic seizures, but a lot of them generate reactive metabolites which can cause oxidative stress. Antiepileptic drugs can have different effects on antioxidative systems and consequently causing oxidative damage to biological macromolecules. In last decade several novel antiepileptic agents have been registered. Second generation of antiepileptic drugs has comparable efficacy as first generation, but has far less side effects.

Our experimental model for determination of the influence of antiepileptic drugs on oxidative stress was peripheral blood mononuclear cells. The aim of this work was to evaluate the influence of the time of exposure, the concentration and type of antiepileptic agents on oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells. Cells were exposed to carbamazepine (first generation), topiramate and levetiracetam (second generation) at concentrations of 1 and 50 µg/ml and then incubated for 48 or 72 hours. Peripheral blood mononuclear cells were also exposed to 0,1% dimethylsulfoxide for 72 hours as untreated control. Ramos cells were exposed to hydrogen peroxide at concentration of 5 mM as positive control. We measured malondialdehyde, biomarker of lipid peroxidation, and reduced glutathione as main intracellular non-enzymatic antioxidant.

We noticed the concentration of malondialdehyde increases and the concentration of reduced glutathione decreases with increasing time of incubation in untreated control. Peripheral blood mononuclear cells, exposed to antiepileptic agents, gave confusing results that were difficult to evaluate. We could not conclude that malondialdehyde is increasing and reduced glutathione is decreasing with exposure to both concentrations of antiepileptic agents. Furthermore, we did not notice any differences in oxidative stress between antiepileptic agents of first and second generation.

Our reproducibility of experimental data was poor but it could be significantly improved by optimisation of both cell treatment and analytical methods, used for evaluation of oxidative stress. This would help obtain more reliable results.

SEZNAM OKRAJŠAV

BC	Trombocitno-levkocitna plast krvi (angl. buffy coat)
CBZ	Karbamazepin
CTRL	Netretirana kontrola
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
GSH	Reduciran glutation
GSSG	Oksidiran glutation
ILAE	International League Against Epilepsy
LAF	Laminarni pretok zraka (laminar air flow)
LEV	Levetiracetam
MDA	Malondialdehid
OR	Osnovna raztopina
PBMC	Periferne mononuklearne celice
PBS	Fosfatni pufer
PEZ	Protiepileptična zdravila
PMK	Polinenasičene maščobne kislin
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti
RS	Reaktivne zvrsti
SOD	Superoksid dismutaza
TEP	1,1,3,3-tetraetoksipropan
TOP	Topiramat

1. UVOD

1.1. EPILEPSIJA

Epilepsija je skupina možganskih okvar, za katero so značilni trajna nagnjenost k nastajanju epileptičnih napadov ter nevrobiološke, kognitivne, fiziološke in socialne posledice napadov. Za postavitev diagnoze morajo biti prisotni trije dejavniki: priti mora do vsaj enega epileptičnega napada, trajnih sprememb v možganih, ki povečajo verjetnost za nadaljnje napade, in z epilepsijo povezanih psiholoških posledic. Epileptični napad je prehodno stanje z jasno vidnim začetkom in koncem ter izrazitimi znaki in simptomi, ki so posledica nenormalno velike sinhronije živčne aktivnosti v možganih. Vpliva lahko na senzorične, motorične in avtonomne funkcije, zavest, čustveno stanje, spomin, zaznavanje in vedenje (1). Hitro ponavljajoče se epileptične napade, ki si sledijo praktično brez prestanka, imenujemo epileptični status (2), ki zahteva nujno medicinsko pomoč (3).

Epilepsijo ima približno 50 milijonov ljudi na svetu (4, 5), kar jo uvršča med najpogostejše nevrološke bolezni (5). Incidenca epileptičnih napadov ima dva vrha. Prvega doseže v prvih dveh desetletjih življenja, drugega, višjega, pa pri starejših ljudeh (po 65. letu starosti), kamor sodi četrtina vseh primerov novoodkrite epilepsije (6).

Obstajata dve glavni kategoriji epileptičnih napadov: generalizirani in žariščni napadi (Preglednica 1). Vsaka od oblik se naprej deli na lažje napade(če ne pride do izgube zavesti) in kompleksne napade(če pride do izgube zavesti) (3). Generaliziran napad nastane v določeni točki znotraj živčne mreže, od koder se hitro prenese po obeh možganskih poloblah. Napad lahko vključi kortikalne in subkortikalne strukture, ne pa nujno celotnega korteksa. Področje in možganska polobla, na katerih se napadi začnejo, večinoma niso enaka. Žariščni napadi nastanejo in so omejeni na eno možgansko poloblo. Začetek napada je pri enakih tipih epileptičnih napadov enak.

Preglednica I: *Razdelitev epileptičnih napadov po organizaciji ILAE (7).***Razdelitev epileptičnih napadov**

-
- ❖ Generalizirani napadi
 - Tonično-klonični (v vsaki kombinaciji)
 - Absenčni
 - ✓ Tipični
 - ✓ Atipični
 - ✓ Absenčni napadi s posebnimi lastnostmi
 - Mioklonične absence
 - Mioklonija očesne veke
 - Mioklonični
 - ✓ Mioklonični
 - ✓ Mioklonični atonični
 - ✓ Mioklonični tonični
 - Klonični
 - Tonični
 - Atonični
 - ❖ Žariščni napadi
 - ❖ Neznani
 - Epileptični krči
-

Dva pomembna tipa generaliziranih napadov sta tonično-klonični napad (imenovan tudi grand mal) in absenčni napad (imenovan tudi petit mal). Tonično-klonični napad se začne z močnim krčenjem celotnega telesnega mišičja, kar vodi v otrdelost mišic iztegovalk. Dihanje se ustavi, pogosto pride tudi do iztrebljanja, uriniranja in slinjenja. To je tonična faza napada in traja približno 1 minuto. Temu sledi serija hudih in sinhronih trzajočih gibov celotnega telesa (klonična faza), ki počasi izzveni po 2-4 minutah. Absenčni napadi se pojavljajo pri otrocih. Bolnik nenadoma preneha s tistim, kar je počel do tedaj, in nekaj sekund strmi v prazno. Motoričnih motenj ni ali pa so redke. Bolniki se ne zavedajo okolice in si nenadoma opomore brez kasnejših učinkov. Najpogostejši simptomi žariščne epilepsije so neprosto voljno krčenje mišic, nenormalne čutne zaznave ali vpliv na vedenje in razpoloženje. Jacksonski napadi so epileptični napadi z žariščem v motoričnem korteksu. Za njih so značilni ponavljajoči se trzajoči gibi določene mišične skupine. V nekaterih primerih se lahko žariščni napad tekom napada razvije v generaliziran napad, kar je posledica širjenja nenormalne živčne aktivnosti po celotnih možganih. Ta pojav imenujemo žariščni napad s sekundarno generalizacijo (3).

Organizacija ILAE etiološko razdeli epileptične napade na genetske (epilepsija je neposreden rezultat znane ali predpostavljene genetske okvare), strukturno/presnovne (obstajajo strukturna ali presnovna stanja ali bolezni, pri katerih je bila dokazana povezava s povečanim tveganjem za razvoj epilepsije) in neznane (vzrok zaenkrat še ni znan) (7).

1.2. PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA

Protiepileptična zdravila (PEZ) se uporabljajo za zdravljenje epilepsije, poleg tega z njimi zdravimo tudi neepileptične konvulzivne motnje (3). Osnovni cilj zdravljenja je preprečevanje epileptičnih napadov z enim samim PEZ (monoterapija), v enem ali dveh dnevni odmerkih, brez neželenih učinkov zdravila in ohraneno kakovostjo življenja. Odločitev o izbiri zdravljenja je individualna, upoštevati je treba starost bolnika, rodno obdobje pri ženskah in sočasno jemanje drugih zdravil. Približno 50% bolnikov z novodiagnosticirano epilepsijo po uvedbi prvega PEZ ne bo imelo več napadov. Monoterapija je varnejša od politerapije zaradi boljšega prenašanja in lažjega uvajanja zdravila. Zdravilo uvajamo postopno, pričnemo z nizkim odmerkom in ga v naslednjih tednih postopno povečujemo. Levetiracetam lahko uvajamo znatno hitreje. Če se pri bolniku pokažejo znaki preobčutljivosti, če se že pri nizkih odmerkih pokažejo nevarni neželeni učinki ali če zdravilo ne preprečuje epileptičnih napadov, ga moramo postopno ukiniti in zamenjati z drugim. Po uvedbi drugega zdravila obstaja 60% verjetnost, da bolnik ne bo imel več napadov. Če tudi drugo in tretje PEZ kot monoterapija ali racionalna duoterapija ne preprečijo nadaljnjih epileptičnih napadov, govorimo o trdovratni epilepsiji, kar opazimo pri okoli 35% bolnikov. V tem primeru se politerapiji pogosto ne moremo izogniti.

Idealno PEZ bi moralo imeti popolno absorpcijo, linearno kinetiko in dolg eliminacijski razpolovni čas, kar bi omogočalo 1- do 2-krat dnevno odmerjanje zdravila. Zaželena je čim šibkejša vezava na serumske proteine, odsotnost aktivnih metabolitov in izločanje skozi ledvice, saj to omogoča lažje titriranje PEZ (8). Učinkovitost posameznih PEZ pri določenem tipu napada prikazujeta preglednici II in III.

Preglednica II: Učinkovitost starejših PEZ pri določenem tipu napada oziroma epileptičnemu sindromu: + učinkovit; ?+ verjetno učinkovit; 0 neučinkovit; - škodljiv; ? neznan učinek (8, 9, 10, 11).

	Žariščni napad	Sekundarno generaliziran napad	Tonično- klonični napad	Absence	Mioklonični napad
Karbamazepin	+	+	+	-	-
Klobazam	+	+	+	?	+
Etosukcimid	0	0	0	+	0
Fenobarbital	+	+	+	0	?+
Fenitoin	+	+	+	-	-
Valprojska k.	+	+	+	+	+

Preglednica III: Učinkovitost novejših PEZ pri določenem tipu napada oziroma epileptičnemu sindromu; + učinkovit; ?+ verjetno učinkovit; 0 neučinkovit; - škodljiv; * lamotrigin lahko v določenih primerih poslabša mioklonične napade (8, 9, 10, 11).

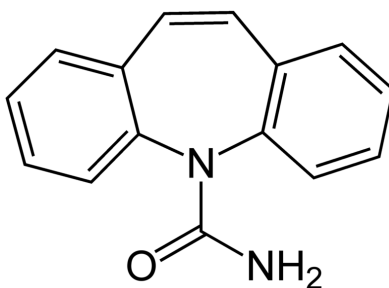
	Žariščni napad	Sekundarno generaliziran napad	Tonično- klonični napad	Absence	Mioklonični napad
Topiramat	+	+	+	?	+
Levetiracetam	+	+	+	?+	+
Lamotrigin	+	+	+	+	+*
Pregabalin	+	+	?	?	?
Tiagabin	+	+	?	-	?
Okskarbazepin	+	+	+	-	-
Vigabatrin	+	+	?+	-	-
Zonisamid	+	+	+	?+	+
Felbamat	+	+	?+	?+	?

1.2.1. Prva generacija protiepileptičnih zdravil

Začetek moderne protiepileptične terapije sega v leto 1912, ko so odkrili antikonvulzivno delovanje fenobarbitala, ki so ga do tedaj uporabljali kot uspavalno. Temu so v presledku parih desetletij sledili fenitoin, etosukcimid, karbamazepin in valprojska kislina. Za zelo pomembne pri zdravljenju epilepsije so se izkazali tudi benzodiazepini. Diazepam je izredno učinkovit pri prekinitvi epileptičnega statusa, klobazam pa je bil najbolj uporabljan peroralni benzodiazepin za zdravljenje neodzivnih epilepsij (9). Glavni mehanizem delovanja prve generacije PEZ so blokada napetostno odvisnih natrijevih kanalčkov (karbamazepin), blokada kalcijevih kanalčkov (etosukcimid, valprojska kislina) in selektivno ojačenje z GABA_A posredovanega odgovora (benzodiazepini) (3, 8, 10).

1.2.1.1. Karbamazepin

Karbamazepin (slika 1) je še vedno najpogosteje uporabljano zdravilo za zdravljenje žariščnih epileptičnih napadov s sekundarno generalizacijo ali brez nje (8, 10). Uporablja se tudi pri drugih stanjih, kot sta nevropatska bolečina in manično-depresivna motnja (3). Ima precej neželenih učinkov, povzroča lahko kognitivne motnje, pri 10-20% bolnikov pride do preobčutljivostne reakcije (8). Njegov glavni mehanizem delovanja je preprečevanje ponavljajočega se proženja od natrija odvisnih akcijskih potencialov v depolariziranih nevronih z blokado napetostno odvisnih natrijevih kanalčkov (9, 10).



Slika 1: Karbamazepin (11).

Karbamazepin je praktično netopen v vodi (12). Biološka uporabnost karbamazepina je 75-80%. Vezava na serumske proteine je 70-80%. Podvržen je obsežnemu metabolizmu, manj kot 2% zaužitega odmerka se izloči nespremenjenega z urinom. Glavna presnovna pot vključuje oksidacijo, primarno preko citokroma P450 (CYP) 3A4, do karbamazepin-10,11-

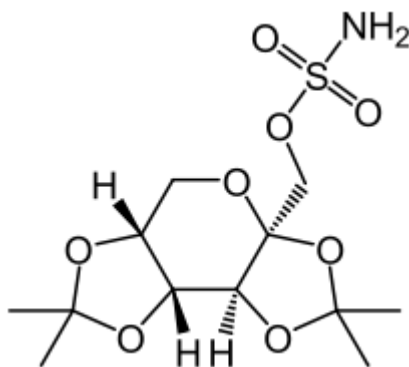
epoksida. Mikrosomalna epoksidna hidrolaza je odgovorna za nastanek farmakološko neaktivnega 10,11-transdiolnega metabolita iz karbamazepin-10,11-epoksida. Razpolovni čas karbamazepina v plazmi je 30 ur po zaužitju enega odmerka, vendar pa je močan induktor jetrnih encimov, zato se pri rednem jemanju karbamazepina razpolovni čas skrajša do 15 ur (3, 13, 14). Serumske vrednosti karbamazepina, ki zagotavljajo optimalno kontrolo nad epileptičnimi napadi, so med 4 in 12 mg/l (17-51 $\mu\text{mol/l}$). Serumska koncentracija karbamazepin-10,11-epoksida, farmakološko aktivnega in potencialno toksičnega metabolita, naj bi bila okoli 8 mg/l (34 $\mu\text{mol/l}$). Pri višjih koncentracijah so poročali o prehodnih neželenih učinkih centralnega živčnega sistema (14). Odgovoren naj bi bil za kongenitalne nenormalnosti, ki so povezane z uporabo karbamazepina med zgodnjo nosečnostjo. Pojavili so se tudi primeri hudih poslabšanj epileptičnih napadov ob povečanju serumskih koncentracij epoksida (15).

1.2.2. Druga generacija protiepileptičnih zdravil

Drugo generacijo PEZ predstavljajo topiramat, levetiracetam, pregabalin, vigabatrin, gabapentin, lamotrigin, felbamat, tiagabin, okskarbazepin in zonisamid (3). Ta zdravila delujejo preko več mehanizmov. Večina jih deluje prek blokade napetostno odvisnih natrijevih kanalčkov, nekatera pa tudi prek zavore oz. moduliranja delovanja kalcijevih kanalčkov in selektivnega spodbujanja GABA-ergičnih mehanizmov. Na ta način preprečujejo širši spekter epileptičnih napadov (8, 9). Tudi s farmakokinetičnega vidika imajo novejša PEZ veliko prednosti. Vsa izkazujejo linearno farmakokinetiko, aktivne metabolite tvori samo okskarbazepin. Večina novejših PEZ se v pomembnem obsegu izloča iz telesa preko ne-oksидativnega metabolizma (10). Na splošno so pri novejših zdravilih manjše možnosti za farmakokinetične interakcije in imajo manj neželenih učinkov (3).

1.2.2.1. Topiramat

Topiramat (slika 2) je učinkovito zdravilo za preprečevanje žariščnih napadov, tonično-kloničnih napadov in napadov pri miokloni epilepsiji. Uporabljamo ga lahko tudi kot začetno monoterapijo pri novodiagnosticirani epilepsiji, vendar ni zanemarljiv njegov vpliv na kognitivne funkcije in upad telesne teže (8). Indiciran je tudi za profilakso migrenskih glavobolov (13).



Slika 2: *Topiramate (11).*

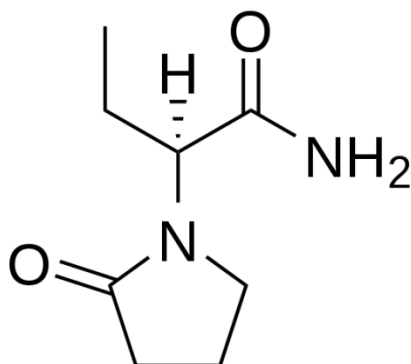
Njegov točen mehanizem delovanja je še neznan. Deloval naj bi kot blokator natrijevih in kalcijevih kanalčkov, povečeval delovanje GABA-e, blokiral AMPA receptorje (receptorji za glutamat, ekscitatorni nevrottransmitter) in šibko inhibiral karboanhidrazo (3, 9, 10).

Topiramate je dobro topen v vodi (9,8 mg/ml) in zelo dobro topen v dimetilsulfoksidu (DMSO) (12). Biološka uporabnost topiramata po zaužitju je med 81 in 95%. Na serumske proteine se ga veže 15%. Odmerek in serumska koncentracija sta v linearnem razmerju. Pri zdravih prostovoljcih se topiramate le malo presnavlja (~20%). Pri bolnikih, ki prejemajo sočasno protiepileptično terapijo z znanimi induktorji encimov za presnovo zdravil, se ga presnovi do 50%. Identificirali so šest različnih metabolitov, ki nastanejo s hidrosilacijo, hidrolizo in glukuronidacijo topiramata. Noben od metabolitov naj ne bi imel antikonvulzivnega delovanja (3, 13, 14). Referenčne serumske koncentracije topiramata pri bolnikih, ki prejemajo terapevtske odmerke, so med 5 in 20 mg/l (15-59 $\mu\text{mol/l}$) (14).

1.2.2.2. Levetiracetam

Levetiracetam (slika 3) uporabljamo v kombiniranem zdravljenju zaradi njegove hitre možnosti titriranja in ugodne kinetike. Učinkovit je pri zdravljenju trdovratnih žariščnih in generaliziranih napadov, vključno z mioklonimi napadi in absencami (3, 8, 13). Najpogostejša neželena stranska učinka sta zaspanost in omotica, lahko pride tudi do motenj razpoloženja (8). Mehanizem delovanja levetiracetama še vedno ni popolnoma pojasnjen. Najverjetneje deluje preko blokade kalcijevih kanalčkov tipa N in modulacije odgovorov na GABA_A

receptorjih. Veže se tudi na sinaptični vezikularni protein 2A (SV 2A) ter na ta način moti obnavljanje sinaptičnih veziklov in sproščanje živčnih prenašalcev (3, 9, 13).



Slika 3: *Levetiracetam (11).*

Levetiracetam je zelo dobro topen v vodi (1,04 g/ml) (12). Hitro in skoraj v celoti se absorbira iz prebavnega trakta. Ne veže se na serumske proteine in izkazuje linearno farmakokinetiko. Izloča se večinoma z urinom, 66% odmerka v nespremenjeni obliki in 27% v obliki neaktivnih metabolitov. Glavna presnovna pot (24% odmerka) je encimska hidroliza acetamidne skupine do farmakološko neaktivnega metabolita L057 in drugih manj pomembnih metabolitov (13, 14). Referenčne serumske koncentracije pri bolnikih s terapevtskimi odmerki so med 12 in 46 mg/l (70-270 $\mu\text{mol/l}$) (14).

1.2.3. Tretja generacija protiepileptičnih zdravil

Tretjo generacijo PEZ predstavlja dvajset novih učinkovin. Sem spadajo brivaracetam, lakozamid, retigabin in rufinamid. Ta zdravila delujejo prek več različnih mehanizmov in ponujajo nove in naprednejše pristope k zdravljenju epilepsij, predvsem pri bolnikih s trdovratnimi epileptičnimi napadi. Omogočajo boljše prenašanje, šibkejša neželena učinka, manj interakcij z ostalimi zdravili ali hormoni in izboljšane farmakokinetične lastnosti glede na PEZ prve in druge generacije. Vendar so potrebne še nadaljnje študije, preden lahko govorimo o njihovi učinkovitosti pri zdravljenju trdovratnih epilepsij (16).

1.3. OKSIDATIVNI STRES

V zdravih aerobnih organizmih je produkcija reaktivnih zvrsti (RS) uravnotežena z antioksidantnim obrambnim sistemom. Vendar ravnotežje ni popolno, saj se nekatere poškodbe, povzročene z reaktivnimi zvrstmi, dogajajo redno. Oksidativni stres je definiran kot motnja v oksidantnem/antioksidantnem ravnotežju v prid prvega, ki vodi v potencialne poškodbe. V osnovi oksidativni stres nastaja bodisi zaradi zmanjšane antioksidantne zaščite ali povečane produkcije RS (17). Oksidativen stres vodi do oksidativnih poškodb celičnih lipidov, proteinov, encimov, ogljikovih hidratov in DNK (18). Oksidativni stres je močno povezan s staranjem celice in degenerativnimi boleznimi (19).

1.3.1. Reaktivne zvrsti

Najpomembnejše RS so reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Izraz reaktivne zvrsti je bil razširjen in vsebuje tudi reaktivne dušikove, kloridne, bromidne in žveplove zvrsti. Med reaktivnimi spojinami samega kisika so najpomembnejše radikali (atmosferski tripletni kisik $^3\text{O}_2$ in superoksidni radikal $\text{O}_2^{\bullet}$), singletni kisik $^1\text{O}_2$ in peroksidni ion O_2^{2-} .

Večina kisika (O_2), ki se nahaja v našem telesu in okoli nas, je v osnovnem stanju, ki je razmeroma nereaktivno. Pri redukciji O_2 gre za enoelektronski prenos, pri katerem nastane superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet}$). $\text{O}_2^{\bullet}$ je slabo reaktiven v vodi. Bolj reaktiven je v hidrogenerani obliki ($\text{HO}_2^{\bullet}$), ki lahko povzroči peroksidacijo lipidov (2). Po adiciji še enega elektrona na $\text{O}_2^{\bullet}$ nastane peroksidni ion (O_2^{2-}) (17).

Vodikov peroksid (H_2O_2) je produkt dvoelektronske redukcije kisika (17) in nastaja predvsem kot posledica encimskega odstranjevanja $\text{O}_2^{\bullet}$ (dismutaza, peroksidaza). Neposredno lahko inaktivira encime s skupinami $-\text{SH}$ in oksidira nekatere ketokislino (npr. piruvično). Lahko prehaja celične membrane in zaradi razmeroma majhne reaktivnosti reagira z molekulami daleč od mesta nastanka (2). H_2O_2 lahko ob prisotnosti kovin prehoda (Fe^{2+}) razpade na hidroksilni radikal ($\text{HO}^{\bullet}$) in hidroksilni ion (HO^-). $\text{HO}^{\bullet}$ je izjemno toksičen (17, 20). Je zelo reaktiven in lahko reagira s skoraj vsako biološko molekulo. Ima zelo kratek razpolovni čas (tipične hitrostne konstante za reakcije z biomolekulami so 10^8 do $10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), ki mu ne dovoljuje difuzije daleč od kraja nastanka (2).

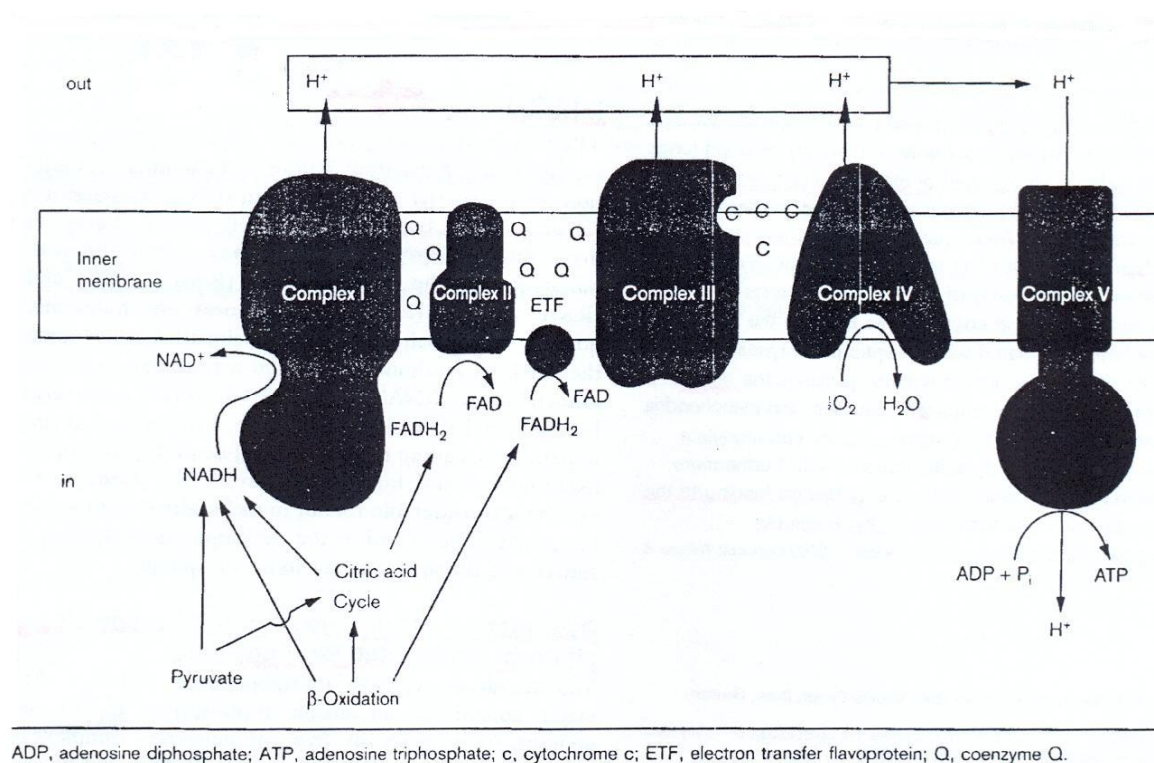
Preglednica IV: Reaktivne kisikov zvrsti (17).

Kisikovi radikali	Ne-radikalske reaktivne zvrsti
Superoksidni, $\text{O}_2^{\bullet -}$	Vodikov peroksid, H_2O_2
Hidroperoksilni, $\text{HO}_2^{\bullet}$	Peroksinitrit, $\text{ONOO}^{\bullet -}$
Hidroksilni, $\text{HO}^{\bullet}$	Peroksidušikova kislina, ONOOH
Peroksilni, $\text{RO}_2^{\bullet}$	Hipoklorna kislina, HOCl
Alkoksilni, $\text{RO}^{\bullet}$	Hipobromova kislina, HOBr
	Ozon, O_3
	Singletni $^1\text{O}_2$

1.3.2. Vir reaktivnih kisikovih zvrsti

Dva najpomembnejša in najbolj učinkovita vira ROS sta elektronska transportna veriga oksidativne fosforilacije v mitohondrijih in NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) oksidaza v fagocitih, poleg tega nastajajo ROS v številnih drugih reakcijah (19).

Mitohondrijska dihalna veriga je eden glavnih virov škodljivih reaktivnih zvrsti (predvsem superoksidnega radikala) v človeškem organizmu (20). Sestavlja jo pet multiencimskih kompleksov, ki se nahajajo na mitohondrijski notranji membrani. Kompleksi I – IV so oksidoreduktaze in sodelujejo pri prenosu elektronov od NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) ali FADH_2 (reducirana oblika flavin adenin dinukleotid) do kisika in s tem proizvajajo elektrokemijski protonski gradient preko mitohondrijske notranje membrane. Kompleks V (F_0F_1 -ATP-aza) uporabi protonski gradient za sintezo adenozin trifosfata (ATP) (21).



Slika 4: Shema kompleksov mitohondrijske oksidativne fosforilacije v mitohondrijski notranji membrani (21).

Preko kompleksov I-III lahko elektroni uhajajo neposredno do kisika, čeprav kompleksi večinoma prenašajo elektrone na naslednji kompleks v verigi. Nekontroliran prenos elektronov vodi v nastanek $O_2^{\bullet-}$. Večina se ga sprosti v matriks, določen delež pa se lahko sprosti tudi v znotrajmembranski prostor. Večina $O_2^{\bullet-}$ dismutira v H_2O_2 preko encima superoksid dismutaza (SOD) v obeh prostorih (17).

$O_2^{\bullet-}$ proizvajajo tudi fagociti in druge celice, ki vsebujejo NADPH oksidazne encime. Najbolj preučevan encim je ksantin oksidaza (XO), ki reducira O_2 do $O_2^{\bullet-}$, hkrati pa oksidira hipoksantin do ksantina (17). Ostali encimi, ki sodelujejo pri tvorbi $O_2^{\bullet-}$, so monoaminska oksidaza (MAO), CYP 450, NO sintaza (NOS) in mieloperoksidaza (20).

1.3.3. Oksidativne poškodbe

Oksidativne poškodbe so biomolekularne poškodbe, povzročene s strani reaktivnih zvrsti nad gradniki živih organizmov. Povečanje oksidativnih poškodb ne povzroči samo povečanje

oksidativnega stresa, temveč tudi napake popravljalnih in zamenjevalnih sistemov. Na celični ravni se oksidativni stres kaže kot:

- povečana proliferacija celic;
- adaptacija celic na blago oziroma zmerno povečanje oksidativnega stresa. Posledica adaptacije je pogosto povečana antioksidantna obramba;
- celične poškodbe ene ali vseh molekularnih tarč: lipidov, DNK, proteinov, ogljikovih hidratov;
- staranje celic, kjer celice preživijo poškodbe, vendar izgubijo zmožnost delitve. Gre za trajno stanje nedelitve. To stanje izzovejo visoke koncentracije reaktivnih zvrsti;
- celična smrt. Če so poškodbe DNK v celici preveč obsežne, lahko celica naredi 'samomor' v dobro organizma in se s tem izogne tveganju, da bi postala kancerogena (17).

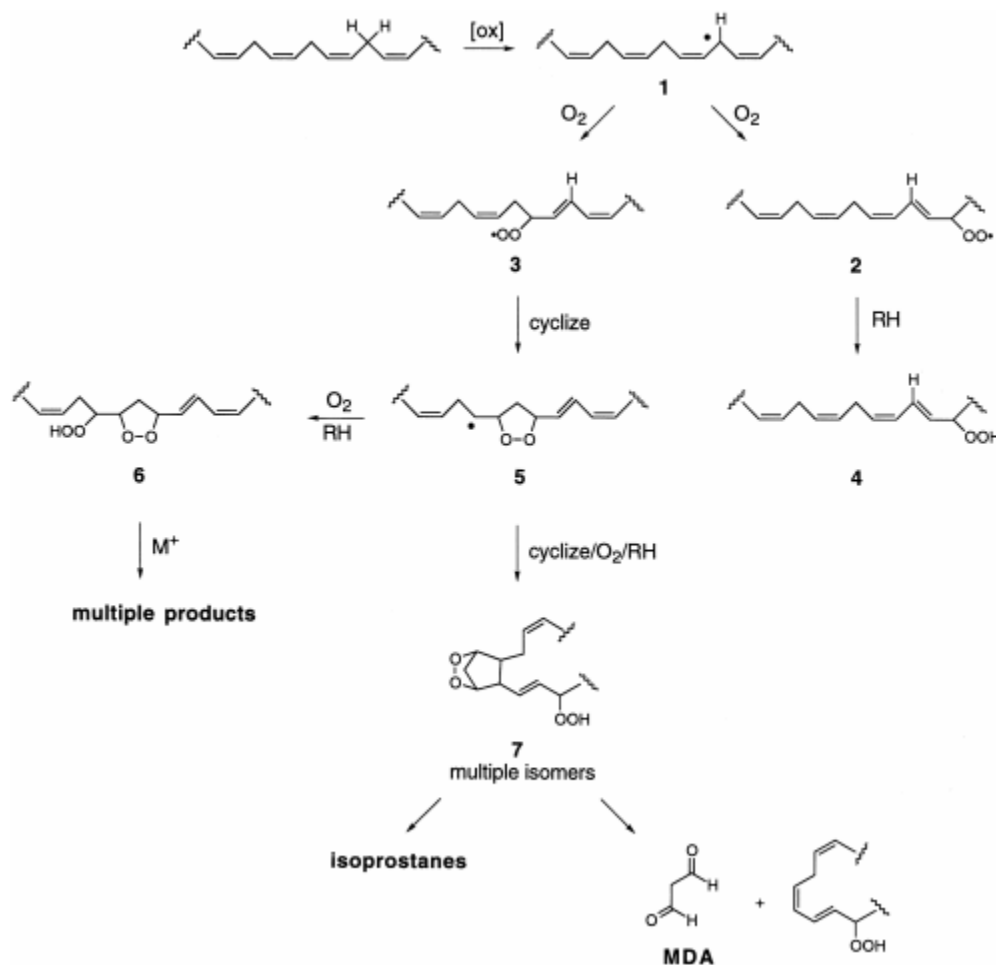
Na molekularni ravni se oksidativni stres kaže preko poškodb vitalnih molekul, kot so DNK, proteini in lipidi (22).

Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je ena najpomembnejših bioloških radikalskih reakcij. Brez obrambe z učinkovitim lokalnim antioksidantnim sistemom lahko oksidativne poškodbe plazemskih fosfolipidov vodijo do resnih celičnih poškodb (23). Definirana je kot oksidativna okvara polinenasičenih lipidov. Polinenasičene maščobne kisline (PMK) so tiste, ki vsebujejo dve ali več dvojnih ogljikovih vezi. Tudi mononenasičeni ali nasičeni lipidi se lahko oksidirajo, vendar težje. Od kisika odvisne poškodovanje lipidov vodi v žarkost maščob (17).

Glavni gradniki bioloških membran so fosfolipidi, ki predstavljajo 10-30% membrane, in proteini. Fosfolipidi so lipidi, ki imajo hidroksilno skupino na mestu 1 v glicerolu zaestreno s fosforno kislino. Stranske verige maščobnih kislin membranskih lipidov so nerazvejane in vsebujejo sodo število ogljikovih atomov, navadno 14 do 24. Dvojne vezi so v *cis* konfiguraciji. Z naraščanjem dvojnih vezi v maščobni kislini pada temperatura tališča. Membranski fosfolipidi so amfifilni, v vodi se organizirajo v skupke, katerih notranjost je hidrofobna, hidrofilna zunanost pa je v kontaktu z molekulami vode. Z večanjem števila

fosfolipidov se skupki preoblikujejo v liposome. To so žepki vodne raztopine, ujete v fosfolipidni dvosloj. Fosfolipidni dvosloj je osnovna struktura celične membrane. Fluidnost te membrane je zelo odvisna od prisotnosti stranskih verig PMK. Poškodbe PMK fluidnost zmanjšajo in onemogočajo normalno delovanje membrane (17).



Slika 5: Poti lipidne peroksidacije (24).

Lipidna peroksidacija poteka v treh fazah. V prvi fazi pride do iniciacije lipidne peroksidacije, ki jo povzroči adicija reaktivne zvrsti, še pogosteje pa odstranitev vodikovega atoma z metilenske ($-CH_2-$) skupine. V obeh primerih nastane ogljikov radikal (17). PMK vsebujejo eno ali več metilenskih skupin, ki se nahajajo med *cis* dvojnimi vezmi. Te metilenske skupine so zelo reaktivne, v prisotnosti oksidirajočih reagentov lahko oddajo vodikov atom in tvorijo ogljikov radikal (slika 5, spojina **1**) (24). Sledi propagacijska faza, v kateri nastajajo novi

ogljikovi radikali. Najverjetnejša usoda ogljikovega radikala pod aerobnimi pogoji je združitev s O_2 , še posebej če se O_2 kopiči v membrani. Reakcija s O_2 da peroksilni radikal ($ROO^\bullet$) (slika 5, spojina **2**). Pri zelo nizkih koncentracijah je favorizirana reakcija med dvema ogljikovima radikaloma ali reakcija ogljikovega radikala z drugimi membranskimi komponentami, kot je $-SH$ skupina na proteinih (17). Usoda $ROO^\bullet$ je odvisna od njegovega položaja na ogljikovodikovi verigi PMK. Če se nahaja na koncu konjugiranega sistema dvojnih vezi, se reducira do lipidnega hidroperoksida (slika 5, spojina **4**). V nasprotnem primeru nastane spekter kompleksnih epoksidov, hidroperoksidov in ogljikovih spojin (24). Zadnja je faza terminacije (17).

Glavni učinki lipidne peroksidacije so zmanjšanje membranske fluidnosti, olajšanje zamenjave fosfolipidov med dvema stranema lipidnega dvosloja, povečanje propustnosti membrane za snovi, ki normalno ne prehajajo membrane drugače kot s specifičnimi kanali, ter poškodbe membranskih proteinov, inaktivacija encimov in ionskih kanalov (17).

Malondialdehid (MDA) je eden izmed končnih produktov lipidne peroksidacije in ima lahko nevarne učinke na okoliška in oddaljena tkiva (25). Nastaja predvsem pri lipidni peroksidaciji PMK z več kot dvema dvojnima vezema, kot so linolenska, arahidonska in dokozaheksaenojska kislina. Obstaja lahko v različnih oblikah, ki so odvisne od pH (17). Prizadene normalne funkcije membranskih proteinov s tem, da jih prečno poveže ali pa inhibira njihove funkcionalne skupine, npr. $-NH_2$ ali $-SH$. V membranah lahko nastanejo veliki agregati nefunkcionalnih proteinov in celična membrana propada (2). MDA lahko reagira tudi z bazami DNK in povzroči nastanke mutagenih lezij. V človeški DNK lahko povzroči večje insercije in delecije, pride lahko tudi do zamenjave baznega para (17). Sicer se MDA že vrsto let uporablja kot označevalec lipidne peroksidacije (24).

1.3.4. Zaščita pred oksidativnimi poškodbami

Brez kisika ni aerobnega življenja, kisik pa lahko povzroči nastanek oksidativnega stresa. Zato se je med evolucijo aerobnega življenja razvila zaščita celic pred reaktivnimi zvrstmi. Temeljna zaščita celice je v prvi vrsti njena strukturna in funkcijska integriteta. V tem smislu pomenijo tudi reparacijski sistemi, ki so sposobni obnavljanja oksidativno poškodovanih bioloških makromolekul poškodovane DNA, zaščito pred radikali. Bolj specifično zaščito

predstavljajo posamezni encimi, ki odstranjujejo radikale in druge reaktivne kisikove zvrsti, ter neencimski antioksidanti, ki preprečujejo, zmanjšujejo ali ustavljajo verižne oksidacije, sprožene z radikali (2). Avtorji knjige *Free Radicals in Biology and Medicine* definirajo antioksidante kot vsako snov, ki v nizkih koncentracijah v primerjavi s koncentracijami oksidirajočega substrata signifikantno zakasni ali prepreči oksidacijo substrata in odstrani oksidativne poškodbe na tarčnih molekulah. Antioksidativna zaščita mora znižati nivo RS na minimalne vrednosti, hkrati pa mora dopuščati dovolj RS, saj so za določene naloge bistvene (17).

1.3.4.1. Encimski antioksidanti

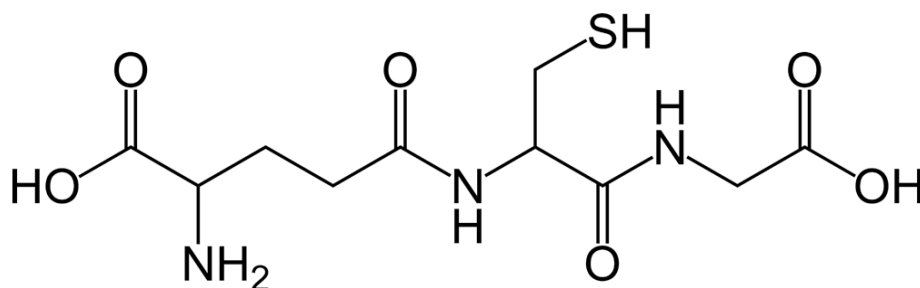
Encimski antioksidantni sistem vključuje encime superoksid dismutazo (SOD), glutation peroksidazo (GPx) in katalazo (CAT). Ti encimi preprečujejo iniciacijo verižne reakcije, povzročene z reaktivnimi zvrstmi. Zaradi svoje specifičnosti in afinitete, možnosti samoobrambe z redoks elementi v njihovem aktivnem mestu in možnostjo podvojevanja so antioksidantni encimi najpomembnejša obramba pred reaktivnimi zvrstmi (18).

1.3.4.2. Ne-encimski antioksidanti

Ne-encimski antioksidanti so nizkomolekularne spojine, ki reagirajo z radikali in z njimi tvorijo nove radikalske spojine, ki so manj nevarne in reaktivne. Reduciran glutation (GSH), askorbat in α -tokoferol delujejo kot celični antioksidanti (26).

Glutation

GSH (slika 6) je prevladujoči znotrajcelični neproteinski tiol v večini celic, tako prokariontskih kot evkariontskih. Gre za tripeptid γ -glutamylcisteinilglicin (27).



Slika 6: *Struktura reducirane oblike glutationa.*

V sesalskih celicah obstaja GSH v najmanj treh dinamično izmenjujočih si oblikah. Pod normalnimi pogoji večina GSH obstaja v reducirani obliki (0,5 do 10 mM). Pri oksidaciji reduciranega GSH, bodisi ne-encimski ali encimski preko GPx, nastane GSSG (oksidirana oblika glutationa). Od NADPH odvisna redukcija GSSG, katalizirana z glutathion reduktazo (GR), učinkovito vzdržuje znotrajcelično koncentracijo GSSG na zelo nizkem nivoju (5 – 50 μ M). Tretja oblika GSH so mešani disulfidi, ki jih tvori s proteinskimi in neproteinskimi tioli (27).

GSH ima pomembno vlogo v celični obrambi proti različnim škodljivim snovem. Preko oksidacijsko-redukcijskega cikla GSH pomaga vzdrževati strukturno in funkcionalno sposobnost celic endogeni produkciji ROS navkljub (27). Ker je GSH prisoten v mM intracelularnih koncentracijah, je lovljenje naštetih reaktivnih zvrsti *in vivo* enostavno. Reakcije z reaktivnimi zvrstmi pogosto generirajo tiilne radikale ($GS^{\bullet}$) in $O_2^{\bullet-}$ (17).

1.4. EPILEPSIJA IN OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres in mitohondrijska disfunkcija se vedno bolj uveljavljata kot pomembna dejavnika v patofiziologiji nevroloških bolezni, kot je epilepsija (20). Oksidativni stres ima zelo pomembno vlogo v živčnem sistemu, saj so možgani velik vir RS, kot tudi njihovih tarč. Možgani so edinstveno občutljivi na oksidativne poškodbe zaradi visokih aerobnih metabolnih potreb, visoke vsebnosti polinenasičenih maščobnih kislin, slabe popravljalne kapacitete in velikih zalog železa. Vse to doprinese k visoki občutljivosti za poškodbe radikalov (20, 28).

Učinkovitost antioksidantov pri varovanju pred izražanjem napadov kažejo na vlogo radikalov pri epileptičnih napadih (20). *Aycicek in Iscan* sta dokazala, da je celotna antioksidantna kapaciteta pri nezdravljenih epileptičnih bolnikih značilno nižja kot pri zdravih kontrolah (29).

1.5. PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA IN OKSIDATIVNI STRES

Veliko konvencionalnih PEZ (npr. karbamazepin, valprojska kislina) se metabolizira do reaktivnih metabolitov s sposobnostjo kovalentne vezave na makromolekule. PEZ prispevajo k sistemski toksičnosti preko kovalentne vezave njihovih intermediatov na proteine in druge vitalne biomolekule. Predhodno narejene študije so pokazale, da imajo PEZ različne učinke na antioksidativne sisteme. Ta zdravila (predvsem valprojska kislina) lahko sprožijo od kisika odvisne poškodbe tkiva preko več mehanizmov. Oksidativne poškodbe imajo pomembno vlogo pri začetku in napredovanju epilepsije (29). Predvidevajo, da naj bi novejša PEZ povzročala manj neželenih učinkov v oksidantno-antioksidantnem sistemu, vendar je bilo do sedaj na to temo narejenih bolj malo raziskav (25).

2. NAMEN DELA

Veliko protiepileptičnih učinkovin (PEZ) starejše generacije se presnavljajo do reaktivnih metabolitov, ki so lahko odgovorni za nastanek oksidativnega stresa. PEZ naj bi imele različne učinke na antioksidativne sisteme in posledično tudi nastanek oksidativnih poškodb bioloških makromolekul.

Cilj naloge je opredeliti vpliv časa izpostavljenosti, koncentracije in vrste PEZ na nastanek oksidativnega stresa v perifernih mononuklearnih celicah (PBMC).

PBMC bomo s postopkom ekstrakcije s fikorom izolirali iz trombocitno-levkocitne plasti krvi (angleško buffy coat – BC), ki jo bomo dobili na Zavodu za transfuzijsko medicino. Izolirane celice bomo suspendirali v mediju za zamrzovanje v koncentraciji 10^7 celic/ml in jih zamrznili v tekočem dušiku. Odtalili jih bomo sproti tik pred eksperimentom in jih suspendirali v gojišču v koncentraciji $2,5 \times 10^6$ celic/ml.

PBMC bomo nato izpostavili trem PEZ: karbamazepinu (predstavnik prve generacije) ter topiramatu in levetiracetamu (predstavnik druge generacije) v dveh koncentracijah (1 $\mu\text{g/ml}$ in 50 $\mu\text{g/ml}$). Celice bomo s PEZ inkubirali različno dolgo (0h, 24h, 48h, 72h). Izvedli bomo tudi netretirano kontrolo, kjer bomo PBMC izpostavili samo topilu DMSO v koncentraciji 0,1% in vzorčili ob času 0, 24, 48 in 72 ur. Ustreznost naše metode bomo preverili s pozitivno kontrolo, kjer bomo celice celične linije Ramos izpostavili vodikovemu peroksidu v koncentraciji 5 mM. Celice bomo v vseh poskusih vsak dan prešteli in preverjali njihovo živost z barvilom Trypan Blue Solution. Po končani inkubaciji bomo celice sprali s fosfatnim pufrom (PBS) in jih zamrznili v obliki pelet pri -80°C .

V tako tretiranih PBMC bomo na koncu določali koncentracijo malondialdehida (MDA) in reduciranega glutationa (GSH). MDA je najpogosteje uporabljen kazalec lipidne peroksidacije v bioloških vzorcih, GSH pa je eden izmed glavnih neencimskih intracelularnih antioksidantov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Standardi

Standardi	Proizvajalec
1,1,3,3-tetraetoksipropan	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Karbamazepin	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Topiramat	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
Levetiracetam	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA

3.1.2. Reagenti in topila

Reagenti in topila	Proizvajalec
2,4-dinitrofenilhidrazin 97%	Sigma-Aldrich Chemie; Steinheim, Nemčija
70% etanol	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Acetonitril	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Antibiotik/antimikotik 100×	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Fetalni goveji serum (FBS)	Invitrogen; Auckland, Nova Zelandija
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare Bio-Science AB; Uppsala, Švedska
Gojišče RPMI 1640, HEPES Modification	Sigma-Aldrich; Ayrshire, Združeno Kraljestvo
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Klorovodikova kislina, 37% kadeča	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Natrijev hidroksid	Fluka Analytical; St. Louis, ZDA
n-heksan	Carlo Erba Reagents; Rodano, Italija Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Ocetna kislina, 100% (Ledocet)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija

Perklorna kislina, 70%, 99,999% čistost	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Raztopina tripanskega modrila (angl. Trypan Blue Solution)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Ultračista voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10; specifična upornost 18,2 MΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) 5 µg/l	Millipore Corp., Billerica, MA
Vodikov peroksid, 30% wt. vodna raztopina	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Žveplova kislina, 98%	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA

3.1.3. Mediji za delo s celicami

Mediji za delo s celicami	Sestava
Gojišče	500 ml medija RPMI 1649, HEPES Modification 50 ml FBS 5,5 ml L-glutamin 5,5 ml antibiotik/antimikotik 100× (10 000 enot penicilina, 10 mg streptomocina in 25 µg amfotericina B na ml)
Medij za zamrzovanje	10% DMSO 40% FBS 50% medija RPMI 1640, HEPES Modification

3.1.4. Pufri in raztopine

Pufri in raztopine	Sestava
10 × PBS (10-kratni fosfatni pufer s soljo, pH 7,4)	NaCl 80 g KCl 2 g Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O 36,3g KH ₂ PO ₄ 2,4 g

	Ultračista H ₂ O dopolnimo do 1,0 l
<i>Natehtamo sestavine, raztopimo v vodi uravnamo pH in avtoklaviramo.</i>	
1 × PBS	10 × PBS redčimo 1:10 z avtoklavirano vodo, uravnamo pH 7,4

3.1.5. Kompleti za analize

Komplet za analize	Proizvajalec
Reagent kit for HPLC analysis of Glutathione in whole blood	Chromsystems Instrumens & Chemicals; Munich, Nemčija

3.1.6. Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Analitična tehnika	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Avtoklav A-21	Kambič laboratorijska oprema; Semič, Slovenija
Avtomatske pipete:	Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija
0,1 – 2,5 µl	
0,5 – 10 µl	
20 – 200 µl	
100 – 1000 µl	
Avtomatski števec celic COUNTESS	Invitrogen; Auckland, Nova Zelandija
Centrifuga	CENTRIC 322 A Tehnica; Železniki, Slovenija.
	5415 R Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija.
	Heraeus MEGAFUGE 16R; Langenselbond, Nemčija
Centrifugirke (15 in 50 ml)	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija

Grelnik in stresalnik VORTEMP 56 EVC	Tehtnica; Železniki, Slovenija
Hemocitometer	Brand Neubauer (Blau Brand)
Hladilnik (+5 °C)	LTH; Škofja Loka, Slovenija
Injekcijske igle FINE-JECT	Henke Sass Wolf; Tuttlingen, Nemčija
Inkubator	HERAUS Holding GmbH; Hanau, Nemčija
Inserti za vialo 0,1 ml	Machrey-Nagel; Düren, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop OLYMPUS CK40	Olympus Optical Co.; Hamburg, Nemčija
Komora z laminarnim pretokom zraka	Waldner Electronics FAZ 3; Wangen, Nemčija
Komora za zamrzovanje s tekočim dušikom ARPEGE 70	VWR International; Radnor, PE, ZDA
Krioviale (2 ml)	Nalgene Thermo Scientific; Rochester, ZDA
Mešalo	LAB DANCER, IKA; Staufen, Nemčija VIBROMIX 10, Tehtnica; Železniki, Slovenija
Mikrotitrski čitalec Safire ² TM Genios	Tecan, Genios; Zürich, Švica
Mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (z 6 vdolbinami)	TPP; Trasadingen, Švica
Multikanalne pipete (300 µl)	Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija
Nastavki za pipete (do 10, 200, 300 in 1000 µl)	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Plastična brizga 5 ml	Becton Dickinson, Madrid, Španija
Plastična posoda z mikrofiltrom, 250 ml	TPP; Trasadingen, Švica
Plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke: 0,5 ml 1,5 ml 2 ml	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Serološke pipete za enkratno uporabo (za 5, 10, 25 in 50 ml)	TPP; Trasadingen, Švica

Steklovina (steklene čaše za 25 in 250 ml;
steklene bučke za 5, 10, 50, 100 in 250 ml)

Stresalnik VIBROMIX 403 EVIT	Tehtnica; Železniki, Slovenija
Škatle za zamrzovanje vzorcev	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Tehtnica AG 245	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
TURBOVAP®LV	Caliper; Hopkinton, ZDA
Ultrasonični homogenizator 4710	Call-Raner Instrument Co.; Chicago, ZDA
Ultrazvočna kadička: Sonis 4	Iskra; Kranj, Slovenija
Vodna kopel	Memmert; Schwabach, Nemčija
Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje; Velenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80 °C)	Forma Scientific; Midland, ON, Kanada Sanyo Electric Co., Ltd.; Japonska

3.1.7. Biološki material

RAMOS (ACC 603)

Humane celične linije izvirajo iz malignih človeških tkiv. So ustaljene oz. nesmrtnne, kar pomeni, da so se sposobne deliti nešteto krat (30).

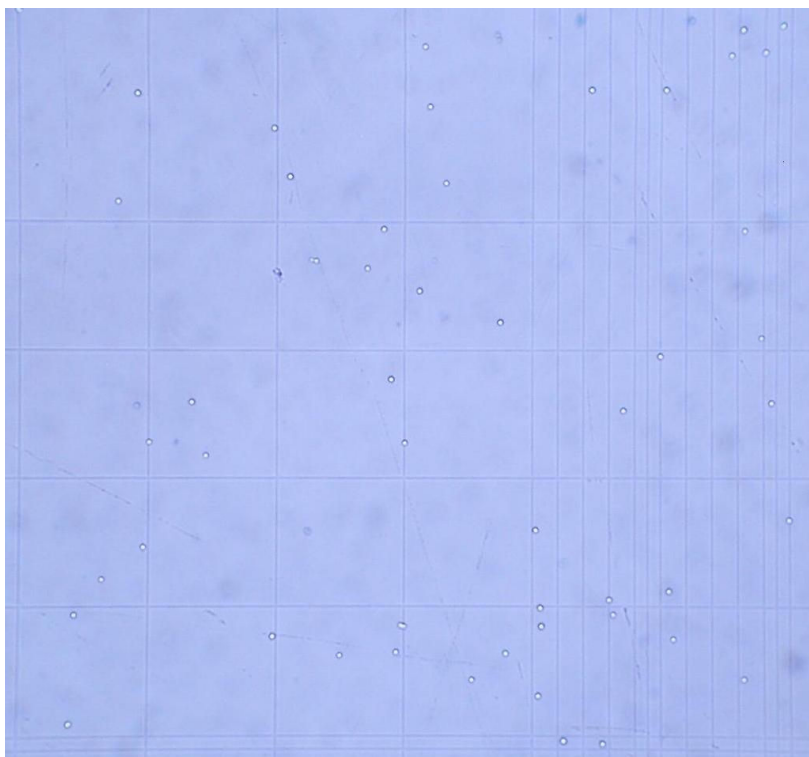
Celična linija humanega Burkittovega limfoma, pridobljena iz peritonealne tekočine 3-letnega dečka z Burkittovim limfomom leta 1972. Celice so bile EBV negativne in izražajo nezreli fenotip limfocitov B. So okrogle celice, ki rastejo v suspenziji. (30).

PERIFERNE MONONUKLEARNE CELICE (PBMC; angleško: peripheral blood mononuclear cells)

PBMC so zdravi levkociti z negranuliranim okroglim jedrom. Pridobljene so iz polne krvi zdravega darovalca s postopkom ekstrakcije s fikorom.

PBMC so primarna celična kultura. Vsebujejo limfocite B in T, monocite ter naravne celice ubijalke. Od celičnih linij se razlikujejo v tem, da niso nesmrtnne in da se ne delijo v

neskončnost. Ravno nasprotno, so zelo občutljive in v nekaj dneh odmrejo, zato jih odmrznemo tik pred eksperimentom. Dobro oponašajo *in vivo* pogoje.



Slika 7: PBMC, obarvane s tripanskim modrilom.

3.2. METODE DELA S CELICAMI

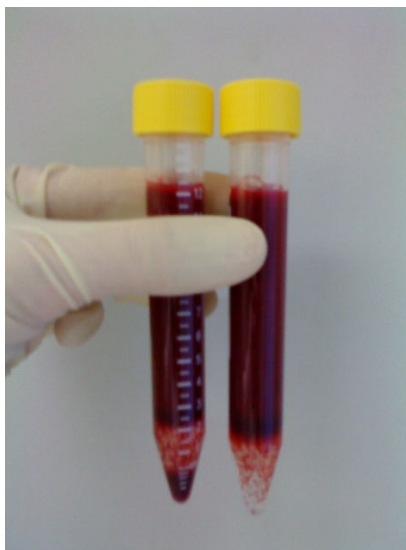
Pri vsakem delu s celicami je treba zagotoviti aseptične pogoje. Delo s celicami smo zato opravljali v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komora), ki je vgrajena v prostorih, v katerih velja poseben režim čistoče (ustrezna oblačila in obutev). LAF komora zagotavlja aseptične pogoje z omejenim dostopom ter stalnim pretokom filtriranega zraka na delovno površino. Da smo zagotovili aseptičnost v LAF komori, smo pol ure pred pričetkom dela v komori prižgali ultravijolično svetlobo, ki deluje baktericidno, tik pred začetkom dela pa smo komoro razkužili z 70-odstotnim etanolom. Pri delu smo uporabljali zaščitne rokavice, ki smo jih razkužili z 70-odstotnim etanolom. Tudi vse reagente, topila in opremo, ki smo jih potrebovali pri delu (pipete, nastavke za pipete, serološke pipete, centrifugirke,

mikrocentrifugirke), smo razkužili z 70-odstotnim etanolom. Nastavke za pipete in mikrocentrifugirke predhodno avtoklaviramo.

Izolacija perifernih mononuklearnih celic iz BC

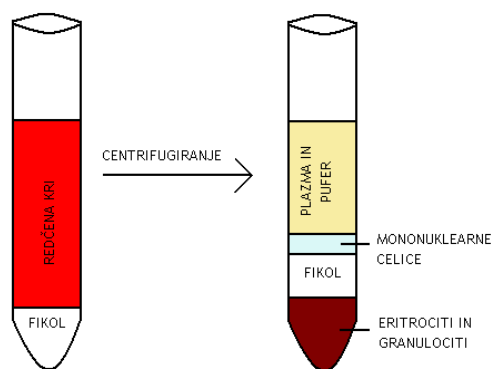
Izhajali smo iz protokola Izolacija mononuklearnih celic s fikolom, ki je bil pripravljen za potrebe izolacije na Katedri za klinično biokemijo.

Vrečko s 50 ml BC smo dobro očistili s 70-odstotnim etanolom. S sterilnimi škarjami smo prerezali prednjo steno plastične vrečke pod zgornjim robom. S pipeto smo prenesli BC v 250 ml stekleničko. Pazili smo, da se nismo dotikali zunanjih površin vrečke. BC smo redčili do 150 ml z gojiščem in temeljito premešali. V 6 konusnih centrifugirk (50 ml) smo odpipetirali po 12,5 ml fikola (12,5 ml fikola se uporabi za 25 ml razredčenega BC). Po 25 ml razredčenega BC smo s 25 ml serološko pipeto počasi in previdno nanegli na plast fikola. Plast fikola in plast razredčenega BC se med seboj nista smela premešati.



Slika 8: *Usedanje eritrocitov in granulocitov iz razredčenega BC (zgornja plast) skozi fikol (prozorna plast). V levi centrifugirki se je del eritrocitov in granulocitov že usedel na dno.*

Dobro zaprte centrifugirke smo centrifugirali 15 minut pri 2300 obratih/min brez zavore. Plast PBMC, ki se nahaja neposredno nad plastjo fikola, smo s sterilno pipeto prenesli v nove centrifugirke (15 ml).



Slika 9: Razredčen BC pred centrifugiranjem (levo) in po centrifugiranju (desno).

V eno centrifugirko smo prenesli dva obročka PBMC. Celično suspenzijo smo takoj redčili z gojiščem do oznake (do 15 ml) in centrifugirali 7 minut pri 1700 obratih/min z zavoro. Supernatant smo previdno odstranili in sedimentirane celice iz vseh treh centrifugirk združili v eno centrifugirko. To smo naredili tako, da smo celice v centrifugirkah najprej razredčili z nekaj ml gojišča in jih prenesli v svežo centrifugirko, izhodno centrifugirko pa smo sprali z nekaj svežega medija in ga prenesli v centrifugirko, kamor smo v prejšnjem koraku že prenesli celice. Celicam v novi centrifugirki smo dodali gojišče do oznake 30 ml. Celice smo nato prešteli, jih resuspendirali v mediju za zamrzovanje v koncentraciji 10^7 celic/ml in po 1 ml suspenzije prenesli v krioviale. Krioviale smo zamrzili tako, da smo jih potopili v 2-propilenglikol in jih za 24 ur zamrzovali pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, nato pa smo jih prenesli v tekoči dušik.

Štetje celic

Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra pod invertnim mikroskopom. Ta metoda omogoča štetje v znanem volumnu in izračunanje koncentracije celic (št. celic/ml). Pod sterilnimi pogoji smo 10 μl celične suspenzije prenesla v mikrocenrifugirko. Dodali smo 10 μl tripanskega modrila, ki obarva poškodovane in mrtve celice modro. Zmes smo dobro premešala s pipeto in 10 μl odpipetirali na hemocitometer. Nato smo prešteli žive in mrtve celice v štirih poljih, določili povprečno število živih in mrtvih celic na mililiter ter izračunali odstotek mrtvih celic. Število celic na mililiter smo izračunali po enačbi:

$$\text{št. celic}/_{ml} = \frac{A + B + C + D}{4} \times FR \times 10^4$$

A, B, C, D – število živih/mrtvih celic v posameznem polju hemocitometra

FR – faktor redčenja

Odstotek živih celic smo izračunali pri vsakodnevni kontroli živosti celic po enačbi:

$$\%_{\text{živih celic}} = \frac{\text{št. živih celic}}{\text{št. živih in mrtvih celic}} \times 100\%$$

Odstotek preživetja celic od začetka do konca inkubacije smo izračunali po enačbi:

$$\%_{\text{preživelih celic}} = \frac{\text{št. živih celic na koncu inkubacije}}{\text{št. živih celic na začetku inkubacije}} \times 100\%$$

Odmrzovanje celic

Celične kulture shranjujemo v kriovialah pri -180 °C v tekočem dušiku. Celice so shranjene v 10-odstotnem DMSO, ki je pri temperaturi nad 4 °C citotoksičen, zato se mora postopek odmrzovanja izvesti hitro. Krioviale smo iz tekočega dušika prenesli v vodno kopel, segreto na 37 °C in jih med segrevanjem stresali, da se je vsebina hitreje odtajala. Odmrznjeno celično suspenzijo smo nato takoj prenesli v 15 ml centrifugirko in jo razredčili z 10 ml gojišča, predhodno segretega na 37 °C. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/min. Supernatant smo odstranili, sedimentirane PBMC pa smo resuspendirali z ustreznim volumnom gojišča, da smo dobili celično suspenzijo s koncentracijo okoli $2,5 \times 10^6$ celic/ml. To smo nato prenesli v mikrotitrsko ploščico za gojenje celičnih kultur in jih inkubirali v inkubatorju. Pred izpostavitvijo PEZ smo celice inkubirali 12 ur, da so si opomogle. Za en eksperiment smo odmrznili 8 kriovial in celice prenesli v dve mikrotitrski ploščici.

Gojenje in subkultiviranje celic

Celice smo gojili v mediju RPMI 1640 z dodatki v inkubatorju, ki zagotavlja ustrezne pogoje za rast celic (temperatura 37 °C, 100-odstotna vlažnost in atmosfera s 5-odstotnim CO₂). Gojili smo jih v mikrotitrski ploščici s šestimi vdolbinami.

Celice celične linije RAMOS rastejo v suspenziji, njihovo število se podvoji v 48-ih urah. Za zagotavljanje ustreznega števila celic smo jih morali subkultivirati. Optimalno rast dosegajo pri koncentraciji $0,5\text{--}1,5 \times 10^6$ celic/ml. Ustrezno količino celične suspenzije smo razredčili z medijem RPMI, segretim na 37°C .

Priprava osnovne raztopine protiepileptičnih učinkovin

Pripravili smo osnovne raztopine PEZ. Ker je karbamazepin slabo topen v vodi, smo za topilo izbrali DMSO, v katerem se dobro raztapljata tudi topiramat in levetiracetam. Ker je DMSO za celice v koncentracijah nad 0,1% toksičen, je moral predstavljati volumen dodane osnovne raztopine 1/1000 volumna celične suspenzije.

Osnovne raztopine PEZ smo pripravili v aseptičnih pogojih. Najprej smo naredili osnovno raztopino s koncentracijo 50 mg/ml. Sterilne zaprte 0,5 ml mikrocentrifugirke smo stehali na analitski tehtnici, jih prenesli v komoro z laminarnim pretokom zraka (LAF komora) in v njih vnesli približno 2,5 mg PEZ. Mikrocentrifugirko smo zaprli in jo še enkrat stehali na analitski tehtnici. Iz razlike mas smo izračunali maso PEZ. Polno mikrocentrifugirko smo nato prenesli v LAF komoro in dodali ustrezen volumen DMSO, da smo dobili raztopino PEZ s koncentracijo 50 mg/ml. Volumen DMSO smo izračunali po formuli:

$$V = m \times \frac{10 \mu\text{l}}{0,5 \text{ mg}}$$

V = volumen DMSO (μl)

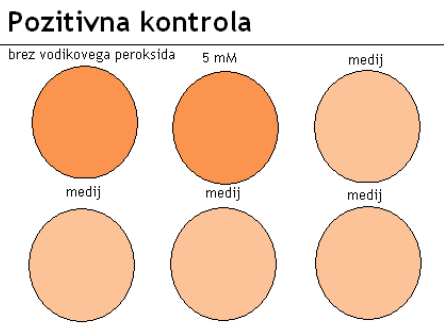
m = masa zatehte PEZ (mg)

Iz osnovne raztopine PEZ s koncentracijo 50 mg/ml smo pripravili še osnovno raztopino s koncentracijo 1 mg/ml. V novo 0,5 ml mikrocentrifugirko smo prenesli 1 μl osnovne raztopine s koncentracijo 50 mg/ml in dopolnili z 49 μl DMSO.

Osnovne raztopine smo shranjevali pri -20°C .

Priprava celične kulture Ramos za izvedbo pozitivne kontrole

Pozitivno kontrolo smo opravili zato, da bi dokazali ustreznost metode za določanje označevalcev oksidativnega stresa na celicah, izpostavljenih oksidacijskih dejavnikom. Izvajali smo jo na celični liniji RAMOS v štirih paralelkah. V prvih dveh paralelkah smo uporabili nesterilen H_2O_2 , v drugih dveh pa sterilnega. Posamezne paralelke smo izvajali na različnih mikrotitrskih ploščicah. Celice smo izpostavili vodikovemu peroksidu v koncentraciji 5 mM (slika 10).

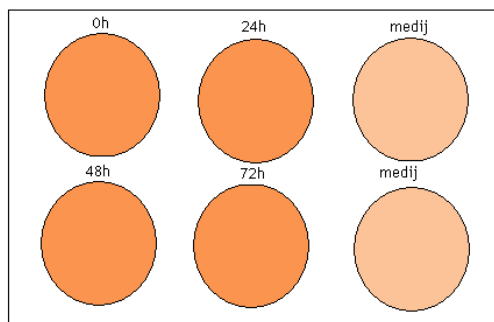


Slika 10: Pozitivna kontrola: shema izpostavljanja celic H_2O_2 v mikrotitrski ploščici s 6 vdolbinami.

Kontrolo brez H_2O_2 in pozitivno kontrolo s koncentracijo 5 mM smo inkubirali 4h. Celice smo pred vzorčenjem prešteli, nato pa zamrznili v obliki pelete.

Priprava celičnih kultur za netretirano kontrolo

Ker smo želeli ugotoviti, kako čas inkubacije PBMC vpliva na oksidativni stres, smo izvedli netretirano kontrolo. Netretirano kontrolo smo izvajali v dveh paralelkah. PBMC smo odmrznili, jih suspendirali v mediju v koncentraciji $2,5 \times 10^6$ celic/ml in po 4 ml suspenzije prenesli v štiri vdolbine v vsaki mikrotitrski ploščici, dve vdolbini pa smo napolnili samo z medijem. Po 12 urah inkubacije smo v vse vdolbine s celično suspenzijo dodali 4 μ l DMSO. Celice smo vzorčili vsak dan ob istem času. Prvi vzorec (0 ur) smo vzeli takoj po dodatku DMSO, naslednje vzorce (24, 48 in 72 ur) pa smo vzeli v naslednjih dneh (slika 11).

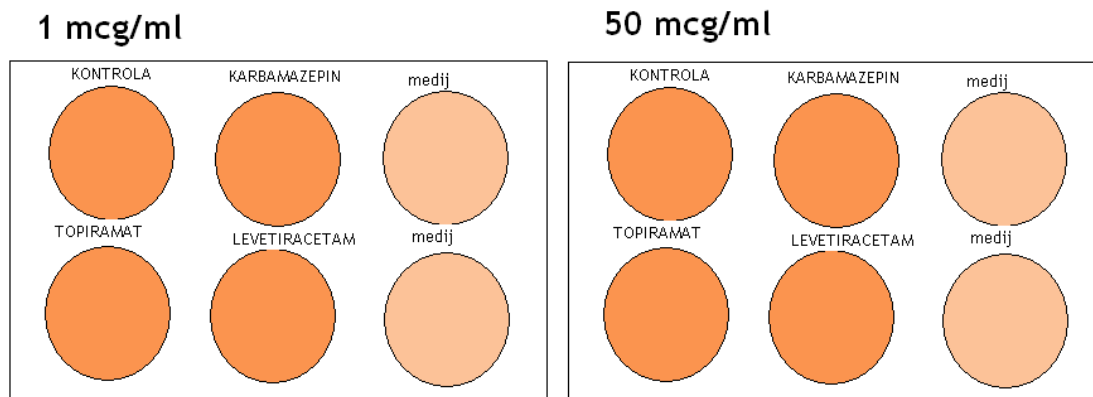
Netretirana kontrola

Slika 11: *Netretirana kontrola: shema izpostavljanja celic DMSO v mikrotitrski ploščici z 6 vdolbinami.*

Celice smo pred vzorčenjem vedno prešteli. Vzorčene celice smo na koncu inkubacije zamrznili v obliki pelete.

Priprava celičnih kultur za izpostavljanje celic protiepileptičnim učinkovinam

Celično suspenzijo PBMC v gojišču smo po odmrznitvi prenesli v mikrotitrsko ploščico s šestimi vdolbinami. Suspenzijo smo dodali v štiri vdolbine, dve vdolbini pa smo napolnili samo z medijem, da smo zagotovili 100-odstotno vlažnost tudi znotraj mikrotitrške ploščice. Volumen celične suspenzije v vdolbini je bil 4 ml, njena koncentracija pa približno $2,5 \times 10^6$ celic/ml. Za en eksperiment smo porabili dve mikrotitrski ploščici. Celicam v prvi mikrotitrski ploščici smo dodali 4 μ l osnovne raztopine PEZ s koncentracijo 1 mg/ml, tako da je bila koncentracija PEZ v celični suspenziji 1 μ g/ml. Celicam v drugi mikrotitrski ploščici smo dodali 4 μ l osnovne raztopine PEZ s koncentracijo 50 mg/ml, tako da je bila koncentracija PEZ v celični suspenziji 50 μ g/ml. V vsaki mikrotitrski ploščici smo imeli tudi netretirano kontrolo, kateri smo dodali 4 μ l DMSO (slika 12).



Slika 12: Shema izpostavljanja celic PEZ v mikrotitrski ploščici s 6 vdolbinami. Celicam v levi mikrotitrski ploščici smo dodali 4 μ l osnovne raztopine PEZ s koncentracijo 1 mg/ml, celicam v desni mikrotitrski ploščici pa 4 μ l osnovne raztopine PEZ s koncentracijo 50 mg/ml.

Vzorčene celice smo na koncu inkubacije zamrznili v obliki pelete.

Zamrzovanje celic v obliki pelete

Celično suspenzijo smo iz mikrotitrške ploščice prenesli v 15ml centrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 1500 obratih/min. Supernatant smo odstranili, sediment pa resuspendirali v PBS. Dodali smo toliko PBS, da je bila koncentracija celic približno 2×10^6 celic/ml. Volumen je bil zaokrožen na ml. Po 1 ml celične suspenzije smo prenesli v mikrocentrifugirke in znova centrifugirali 5 minut pri 1500 obratih/min, nato pa še 1 minuto pri 1800 obratih/min. Supernatant smo odstranili, sedimentirane celice (peleto) pa smo zamrznili v zamrzovalniku na -80°C in jih tam shranjevali do analize MDA oz. GSH.

Priprava celic za analizo

Celice smo odtalili pri sobni temperaturi in jim dodali 50 μ l bidestilirane vode. Lizirali smo jih z zamrzovanjem v tekočem dušiku, čemur je sledilo takojšnje odmrzovanje v vroči vodi. Ta postopek smo ponovili trikrat. Odtaljene celice smo lizirali še z ultrasoničnim homogenizatorjem. Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali 30 minut pri temperaturi 4°C in 15000 obratih/min. Naprej smo delali s supernatantom.

3.3. DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA (MDA) V CELICAH S HPLC/MS Z DNPH METODO

Priprava 1 % (v/v) žveplove(VI) kisline (H_2SO_4)

V 100 ml bučko smo odmerili 1 ml 95-97% H_2SO_4 in dopolnili do oznake z vodo. 1% H_2SO_4 pripravimo sproti svežo.

Priprava standardov MDA

62 μl 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP) smo odpipetirali v 100 ml bučko in z vodo dopolnili do oznake. Dobili smo 2,5 mM osnovno raztopino (ORI). 998 μl ORI smo nato odpipetirali v 50 ml bučko in dopolnili do oznake z 1% H_2SO_4 . Nastalo raztopino smo inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi, da je potekla hidroliza TEP do MDA. Dobili smo standard MDA s koncentracijo 50 $\mu\text{mol/l}$ (ORII). Ta standard smo nato ustrezno redčili z 1% H_2SO_4 , da smo dobili standard s koncentracijo 1,25 $\mu\text{mol/l}$. Tega smo še naprej redčili z 1% H_2SO_4 , da smo dobili standarde s koncentracijo 0,625, 0,469, 0,313, 0,235, 0,156, 0,078 in 0,039 $\mu\text{mol/l}$. Vse standarde smo pripravili v 1,5 ml mikrocentrifugirkah po 1 ml. Naredili smo tudi slepi standard, ki je vseboval le 1 ml 1% H_2SO_4 . Priprava standardov z redčitvijo 50 $\mu\text{mol/l}$ ORII je prikazana v preglednici:

Preglednica V: Priprava standardov MDA.

C_{ST} ($\mu\text{mol/l}$)	50 μM ORII (μl)	1.25 μM ST (μl)	1 % H_2SO_4 (μl)
1,25	25	-	975
0,625	-	500	500
0,469	-	375	625
0,313	-	250	750
0,235	-	188	812
0,156	-	125	875
0,078	-	63	937
0,039	-	31	969
0	-	-	1000

Priprava 6M natrijevega hidroksida (NaOH)

0,48 g trdnega NaOH (v obliki granul) smo raztopili v 2 ml vode. To raztopino smo pripravili vsakič svežo.

Priprava 2M klorovodikove kisline

V 5 ml bučko smo odpipetirali 0,829 ml 37% HCl in dopolnili z vodo do oznake. To raztopino smo pripravili vsakič svežo.

Priprava 5,25M perklorne kisline (HClO₄)

V 5 ml bučko smo odpipetirali 2,257 ml 70% HClO₄ in dopolnili z vodo do oznake. To raztopino smo pripravili vsakič svežo.

Priprava 5 mM raztopine 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)

V 2 ml mikrocentrifugirko smo natehtali 2,04 mg DNPH in mu dodali 2 ml 2 M HCl. Raztopino smo mešali na mešalniku VIBROMIX, po potrebi smo uporabili tudi ultrazvočno kadičko. To raztopino smo pripravili eno uro pred uporabo.

Priprava vzorca za določanje celokupnega MDA

Izhajali smo iz postopka, ki so ga razvili v diplomskih nalogah Razvoj metode HPLC za vrednotenje lipidne peroksidacije z določanjem malondialdehida v plazmi (31) in Določanje malondialdehida v plazmi konj z derivatizacijskimi metodami in tekočinsko kromatografijo (32).

30 µl supernatanta celičnega lizata smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke in dodali 220 µl 1% H₂SO₄. V 1,5 ml plastičnih epruvetkah smo k 250 µl vzorca (razredčeni celični lizat, standard) dodali 50 µl 6 M NaOH, premešali in inkubirali 30 minut v termostatisanem stresalniku pri 60 °C in 20 obratih/min (alkalna hidroliza na proteine vezanega MDA). Vzorce smo nato ohlajali 10 minut pri sobni temperaturi, jih nakisali s 125 µl 5,25 M HClO₄, jih premešali in centrifugirali 10 minut pri 5 °C in 15000 obratih/min (obarjanje proteinov). Po 250 µl supernatanta smo prenesli v 2 ml mikrocentrifugirke, dodali 25 µl 5 mM raztopine

DNPH, premešali in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo (derivatizacija MDA). Nastali produkt MDA-DNPH ni stabilen v prisotnosti svetlobe, zato smo morali vse nadaljnje faze izvajati tako, da so bili vzorci zaščiteni pred svetlobo. Po inkubaciji je sledila faza ekstrakcije. Derivatiziranim vzorcem v 2 ml mikrocentrifugirkah smo dodali 1,2 ml n-heksana, jih stresali na stresalniku 5 minut pri hitrosti 250 obratov/min in nato po 1 ml heksanske frakcije prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke. Te smo zložili v aparaturu TURBOVAP in jih sušili s tokom dušika pri temperaturi 40 °C in tlaku dušika 0,5-1 psi (3,45-6,89 kPa) prvo minuto in 2,5 psi (17,2 kPa) dokler niso bile mikrocentrifugirke suhe. Derivatiziranim vzorcem v 2 ml mikrocentrifugirki smo nato še enkrat dodali po 1,2 ml n-heksana, jih stresali na stresalniku 5 minut pri hitrosti 250 obratov/min in odvzeli po 1,1 ml heksanske frakcije. Te smo združili s posušenimi heksanskimi frakcijami v 1,5 ml mikrocentrifugirkah in jih posušili v aparaturi TURBOVAP. Pogoji sušenja s tokom dušika so bili enaki kot pri prvem sušenju. Dobljenim suhim ekstraktom smo dodali 100 µl mobilne faze (acetonitril/voda/ocetna kislina = 38:62:0,2% v/v/v), jih mešali na mešalniku VIBROMIX eno minuto (rekonstitucija) in odpipetirali po 90 µl raztopine v inserte, te pa smo nato postavili v vialo. Vialo smo vstavili v avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema.

Metoda tekočinske kromatografije (LC)

Uporabili smo LC sistem Agilent 1290 Infinity. Analizo smo izvajali na koloni Kinetex C18 (50 × 2,1 mm, velikost delcev 5 µm). Injicirali smo 5 µl vzorca, avtomatski vzorčevalnik je bil ohlajen na 4 °C. Mobilna faza (MF) je bila sestavljena iz 0,1% mravljične kisline (topilo A) in acetonitrila (topilo B). Obe topili smo pred analizo razplinjevali v ultrazvočni kadički. Čas analize je znašal 2,6 minute. Pretok MF je bil 0,5 ml/min, imeli smo gradientno elucijo po shemi:

Preglednica VI: Shema gradientne elucije.

t (min)	delež topila B (%)
0	30
2	50
2,05	30

Metoda MS/MS

Uporabili smo masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim 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 jemali odziv ionov 159,2. Nastavitve masnega analizatorja so podane v preglednici VII.

Preglednica VII: *Nastavitve masnega analizatorja.*

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
MDA:SRM prehod	235,1→159,2
Kolizijska energija (CE)	20 eV
Fragmentor (FR)	100 V

SRM prehod: spremljanje zgolj starševskega in hčerinskega iona (angl. selected reaction monitoring)

3.4. DOLOČANJE GLUTATIONA S HPLC (Chromsystems)

Uporabili smo reagentni kit Chromsystems Reagent kit for the HPLC analysis of Glutathione in whole blood, Cat. no. 66000 (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München, Nemčija).

Priprava kalibracijskega standarda polne krvi

Za rekonstitucijo kalibracijskega standarda liofilizirane polne krvi smo v vialo odpipetirali točno 0,5 ml ultračiste vode (Milli-Q). Vialo smo občasno pretresli in pustili stati na sobni temperaturi 10-15 minut. Viale nismo izpostavljali neposredni sončni svetlobi. Po 50 µl suspenzije smo razdelili v 0,5 ml mikrocentrifugirke in jih zamrznili na -20 °C in jih odtalili po potrebi.

Priprava derivatizacijske zmesi

Liofiliziranemu derivatizacijskemu reagentu 1 smo dodali točno 2,0 ml derivatizacijskega reagenta 2 in pretresli. Derivatizacijska zmes je pripravljena za uporabo po 10 minutah.

Priprava vzorca

V 1,5 ml mikrocentrifugirke, zaščitene pred svetlobo z aluminijasto folijo, smo dodali 30 µl internega standarda in 30 µl vzorca oz. 10 µl kalibracijskega standarda ter vsebino premešali s pipeto. Vzorce smo premešali na mešalniku VIBROMIX, jim dodali 400 µl precipitacijskega reagenta in mešali še 30 sekund. Vzorce smo nato centrifugirali 7 minut pri pospešku 9000×g. 25 µl supernatanta smo prenesli v nove 1.5 ml mikrocentrifugirko, dodali 50 µl derivatizacijske mešanice in premešali. Vzorce smo inkubirali 10 minut pri 55 °C in 20 obratih/min, nato pa jih takoj ohladili na sobno temperaturo. Celotno vsebino mikrocentrifugirk smo prenesli v inserte, te pa vstavili v vialo. V HPLC sistem smo injicirali 20 µl vzorca.

Analitski pogoji

Kit za določanje glutationa v polni krvi vsebuje mobilno fazo, HPLC kolono, predkolono in nosilec za predkolono. Analiza poteka z izokratsko elucijo. Kolono smo termostatirali pri sobni temperaturi (približno 25°C). Volumen injiciranja je bil 20 µl, pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1.3 ml/min, pritisk na koloni pa okoli 132 bar. Čas analize vzorca je bil 5 minut, retencijski čas glutationa je bil približno 1.7 min, retencijski čas internega standarda pa približno 2.5 min. Uporabili smo fluorescentni detektor (FLD). Mobilna faza se po kalibraciji sistema reciklira.

4. REZULTATI

4.1. ODSOTOK PREŽIVELIH CELIC

Preživetje celic je osnoven parameter, ki nam veliko pove o dogajanju v celicah. V primeru poškodb se preživetje celic lahko bistveno zniža. Nam je odstotek preživetja celic služil za prikaz resnosti oksidativnih poškodb, pri celicah z več poškodbami je bil namreč nižji.

Med inkubacijo celic v H_2O_2 (pozitivna kontrola), DMSO (netretirana kontrola) in raztopini PEZ smo dnevno spremljali njihovo živost. V nadaljevanju so podani odstotki preživelih celic od začetka do konca inkubacije (glej enačbo $\%_{\text{preživelih celic}}$ v poglavju 3.3.2.).

4.1.1. Pozitivna kontrola

Preglednica VIII prikazuje odstotek preživetja celic v netretirani kontroli in celic, ki so bile izpostavljene H_2O_2 v koncentraciji 5 mM 4 ure. Pozitivno kontrolo smo izvajali na celični liniji Ramos.

Preglednica VIII: Odstotek preživelih celic, ki so bile izpostavljene vodikovemu peroksidu.

	kontrola	5 mM H_2O_2
1. paralelka	98,70%	99,10%
2. paralelka	99,70%	98,60%
3. paralelka	97,00%	100,00%
4. paralelka	100,00%	98,60%
povprečje	98,85%	99,08%
SD	1,35%	0,66%

4.1.2. Netretirana kontrola

V preglednici IX je predstavljeno preživetje PBMC, ki smo jih inkubirali v 0,1% DMSO v gojišču in jih vzorčili ob različnih časih.

Preglednica IX: Odstotek preživelih PBMC, ki so bile izpostavljene 0,1% DMSO in bile vzorčene ob času 0, 24, 48 in 72 ur.

	0h	24h	48h	72h
1. paralelka	91,70%	80,42%	76,86%	62,24%
2. paralelka	91,70%	87,12%	80,85%	76,02%
povprečje	91,70%	83,77%	78,86%	69,13%
SD	0%	4,74%	2,82%	9,74%

4.1.3. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur

Preglednici X in XI prikazujeta odstotek preživetja PBMC, ki so bile 72 ur izpostavljene PEZ v koncentracijah 1 µg/ml in 50 µg/ml.

Preglednica X: Odstotek preživelih PBMC, ki so bile 72 ur izpostavljene PEZ v koncentraciji 1 µg/ml

1 µg/ml	kontrola	CBZ	TOP	LEV
1. paralelka	81,45%	62,26%	58,55%	55,66%
2. paralelka	56,83%	53,11%	59,63%	75,47%
povprečje	69,14%	57,69%	59,09%	65,57%
SD	17,41%	6,47%	0,76%	14,01%

Preglednica XI: Odstotek preživelih PBMC, ki so bile 72 ur izpostavljene PEZ v koncentraciji 50 µg/ml (v tretji paralelki nismo izvedli netretirane kontrole).

50 µg/ml	kontrola	CBZ	TOP	LEV
1. paralelka	55,00%	47,00%	48,00%	54,00%
2. paralelka	90,66%	86,42%	58,70%	59,38%
3. paralelka		55,90%	74,53%	32,61%
povprečje	72,83%	63,11%	60,41%	48,66%
SD	25,22%	20,68%	13,35%	14,16%

4.1.4. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur

Preglednici XII in XIII prikazujeta odstotek preživetja PBMC, ki so bile 48 ur izpostavljene PEZ v koncentracijah 1 µg/ml in 50 µg/ml.

Preglednica XII: Odstotek preživelih PBMC, ki so bile 48 ur izpostavljene PEZ v koncentraciji 1 µg/ml.

1 µg/ml	kontrola	CBZ	TOP	LEV
1. paralelka	62,44%	68,24%	57,39%	47,48%
2. paralelka	72,08%	71,73%	59,01%	66,78%
3. paralelka	73,41%	66,76%	70,61%	65,00%
4. paralelka	74,91%	85,62%	58,23%	62,50%
5. paralelka	64,26%	42,86%	56,62%	53,99%
Povprečje	69,42%	67,04%	60,37%	59,15%
SD	5,67%	15,44%	5,79%	8,16%

Preglednica XIII: Odstotek preživelih PBMC, ki so bile 48 ur izpostavljene PEZ v koncentraciji 50 µg/ml.

50 µg/ml	kontrola	CBZ	TOP	LEV
1. paralelka	37,82%	37,14%	31,85%	31,51%
2. paralelka	83,82%	71,10%	71,29%	68,40%
3. paralelka	101,90%	80,00%	62,37%	83,36%
4. paralelka	95,00%	91,46%	51,40%	64,71%
5. paralelka	82,89%	97,07%	65,71%	67,04%
Povprečje	80,29%	75,35%	56,52%	63,00%
SD	25,03%	23,62%	15,59%	19,07%

4.1.5. Primerjava PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 24 in 48 ur

Preglednici XVI in XVII prikazujeta odstotek preživetja PBMC istega vzorca po 24 in 48 urah inkubacije v raztopini PEZ v koncentracijah 1 $\mu\text{g/ml}$ in 50 $\mu\text{g/ml}$.

***Preglednica XIV:** Odstotek preživelih PBMC po 24 in 48 urah inkubacije v raztopini PEZ v koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$.*

1 $\mu\text{g/ml}$	kontrola	CBZ	TOP	LEV
% živih 24h	78,70%	74,40%	81,20%	78,20%
% živih 48h	62,44%	68,24%	57,39%	47,48%

***Preglednica XV:** Odstotek preživelih PBMC po 24 in 48 urah inkubacije v raztopini PEZ v koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$.*

50 $\mu\text{g/ml}$	kontrola	CBZ	TOP	LEV
% živih 24h	78,50%	77,40%	77,00%	72,30%
% živih 48h	37,82%	37,14%	31,85%	31,51%

Na podlagi odstotka preživetja celic smo se odločili, da bomo celice izpostavili PEZ 48 in 72 ur. Preživetje netretiranih celic se je s časom inkubacije sicer slabšalo, vseeno pa nas je zanimal vpliv časa izpostavljenosti PEZ.

4.2. MERITVE MDA V PBMC

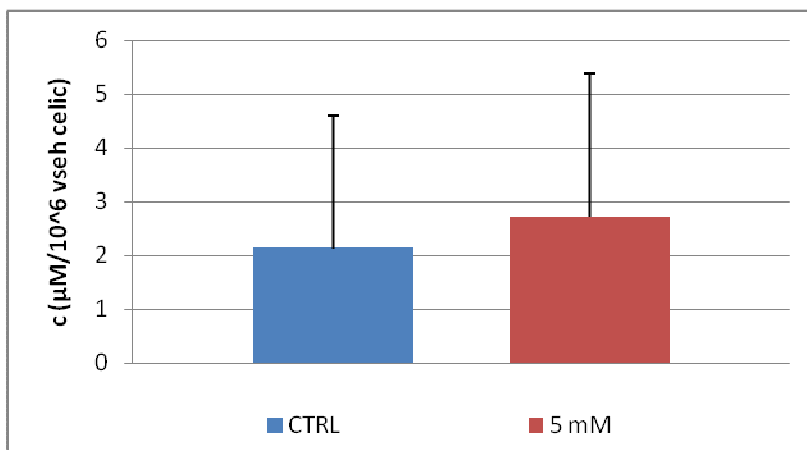
MDA je stranski produkt lipidne peroksidacije. Preko določanja njegove koncentracije smo lahko ocenili obseg lipidne peroksidacije, ki so jo povzročila PEZ.

V celicah, ki so bile izpostavljene vodikovemu peroksidu, 0,1% DMSO in PEZ, smo določili naslednje koncentracije MDA.

4.2.1. Pozitivna kontrola

Rezultat meritev MDA pozitivne kontrole je povprečje štirih paralelek. Merjenje koncentracije MDA smo izvajali ob različnem času, in sicer posebej prvi in drugo ter tretjo in četrto paralelko. Umeritvena krivulja prve meritve (prvi dve paralelki): $y=20227x+158,2$; $R^2 = 0,996$. Umeritvena krivulja druge meritve (drugi dve paralelki): $y=4316x+84,24$; $R^2=0,996$.

Slika 13 prikazuje povprečje koncentracij štirih paralelek MDA v celicah celične kulture Ramos v netretirani kontroli in 5 mM vodikovemu peroksidu (slika 13). Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili. Na grafu so prikazane tudi standardne deviacije.

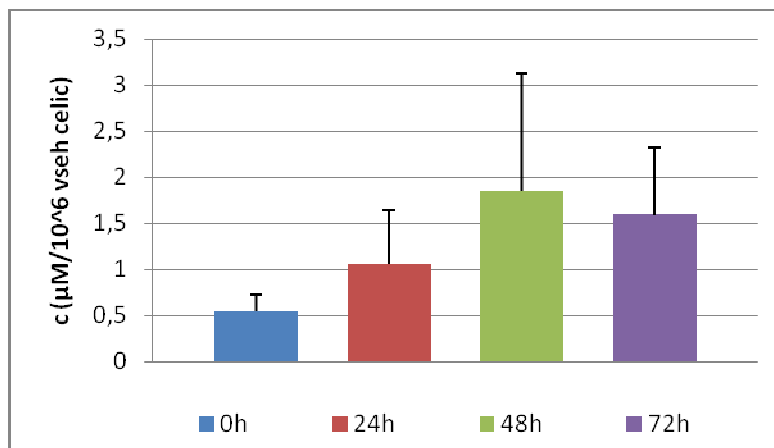


Slika 13: Grafični prikaz povprečnih koncentracij MDA v celicah RAMOS, ki so bili 4 ure izpostavljeni gojišču (CTRL) in 5 mM vodikovemu peroksidu. Analiza vzorcev z DNPH metodo za določanje celokupnega MDA.

4.2.2. Netretirana kontrola

Rezultat meritev MDA netretirane kontrole je povprečje štirih paralelek. Merjenje koncentracije MDA smo izvajali ob različnem času, in sicer posebej prvi in drugo ter tretjo in četrto paralelko. Umeritvena krivulja prve meritve (prvi dve paralelki): $y=5289x+64,60$; $R^2 = 0,991$. Umeritvena krivulja druge meritve (drugi dve paralelki): $y=4316x+84,24$; $R^2=0,996$.

Slika 14 prikazuje povprečje koncentracij MDA štirih paralelek v PBMC. Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili. Na grafu so prikazani tudi standardni odstopi.

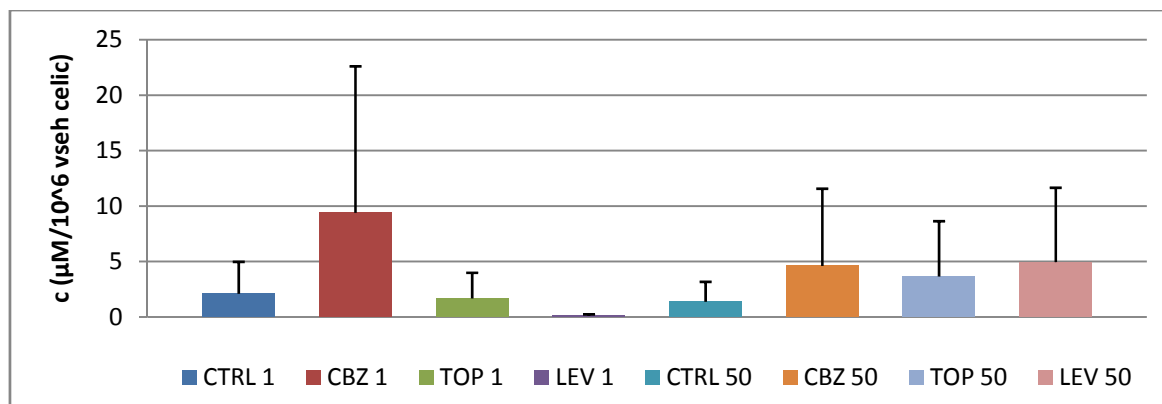


Slika 14: Grafični prikaz koncentracij MDA v PBMC, ki so bile izpostavljene 0,1% DMSO in inkubirane 0, 24, 48 in 72 ur. Analiza vzorcev z DNPH metodo za določanje celokupnega MDA.

4.2.3. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur

Rezultat meritev MDA v PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur, je povprečje treh paralelek. Merjenje koncentracije MDA smo izvajali ob različnem času, in sicer posebej prvo, drugo in tretjo paralelko. V prvi paralelki smo celice izpostavili samo 50 μg/ml koncentraciji PEZ. Umeritvena krivulja prve meritve (1. paralelke): $y=4316x+84,24$; $R^2 = 0,996$. Umeritvena krivulja druge meritve (2. paralelke): $y=7166,3x+1121$; $R^2=0,989$. Umeritvena krivulja tretje meritve (3. paralelke): $y=599,9x+66,74$; $R^2=0,984$.

Slika 15 prikazuje povprečje koncentracij MDA treh paralelek v PBMC. Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili. Na grafu so prikazani tudi standardni odstopi.

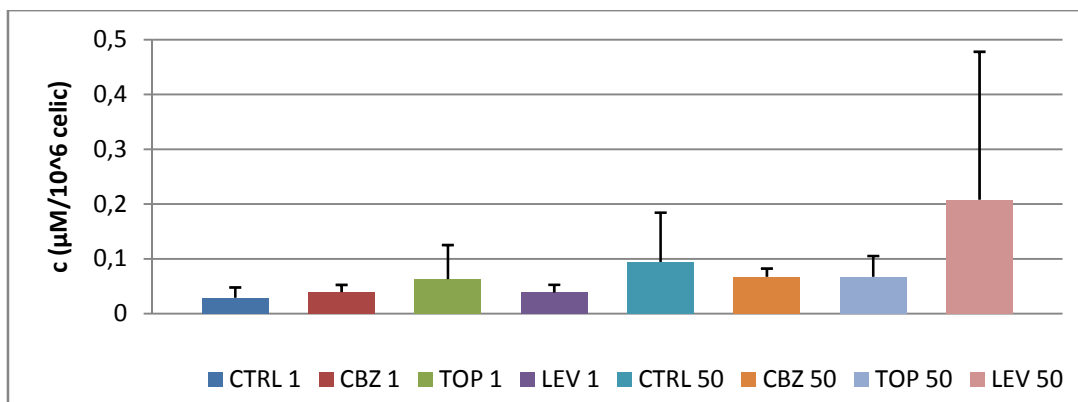


Slika 15: Grafični prikaz koncentracij MDA v PBMC, ki so bile 72 ur izpostavljene 0,1% DMSO (CTRL 1 in CTRL 50) oziroma PEZ v koncentracijah 1 μg/ml (CBZ 1, TOP 1, LEV 1) in 50 μg/ml (CBZ 50, TOP 50, LEV 50). Analiza vzorcev z DNPH metodo za določanje celokupnega MDA.

4.2.4. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur

Rezultat meritev MDA v celicah, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur, je povprečje treh paralelk. Merjenje koncentracije MDA smo izvajali ob različnem času, in sicer posebej prvi dve paralelki in tretjo paralelko. Umeritvena krivulja prve meritve (prvi dve paralelki): $y=4316x+84,24$; $R^2 = 0,996$. Umeritvena krivulja druge meritve: $y=11261x+2626$; $R^2=0,994$.

Slika 16 prikazuje povprečje koncentracij MDA treh paralelk v PBMC. Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili. Na grafu so prikazani tudi standardni odstopi.



Slika 16: Grafični prikaz koncentracij MDA v PBMC, ki so bile 48 ur izpostavljene 0,1% DMSO (CTRL 1 in CTRL 50) oziroma PEZ v koncentracijah 1 μg/ml (CBZ 1, TOP 1, LEV 1) in 50 μg/ml (CBZ 50, TOP 50, LEV 50). Analiza vzorcev z DNPH metodo za določanje celokupnega MDA.

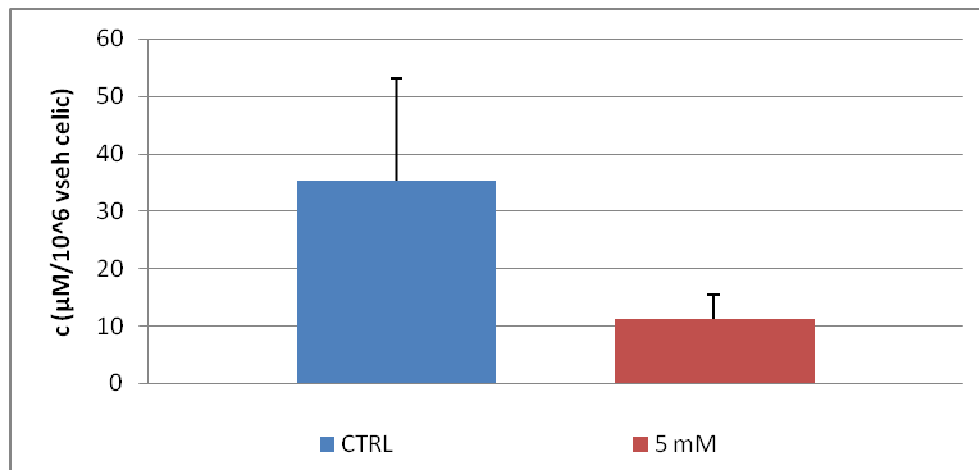
4.3. MERITVE GSH V PBMC

GSH je eden najpomembnejših neencimskih antioksidantov v našem telesu. Uporabili smo ga kot občutljiv pokazatelj sprememb v oksidativnem stresu.

V celicah, ki so bile izpostavljene vodikovemu peroksidu, 0,1% DMSO in PEZ, smo določili naslednje koncentracije GSH.

4.3.1. Pozitivna kontrola

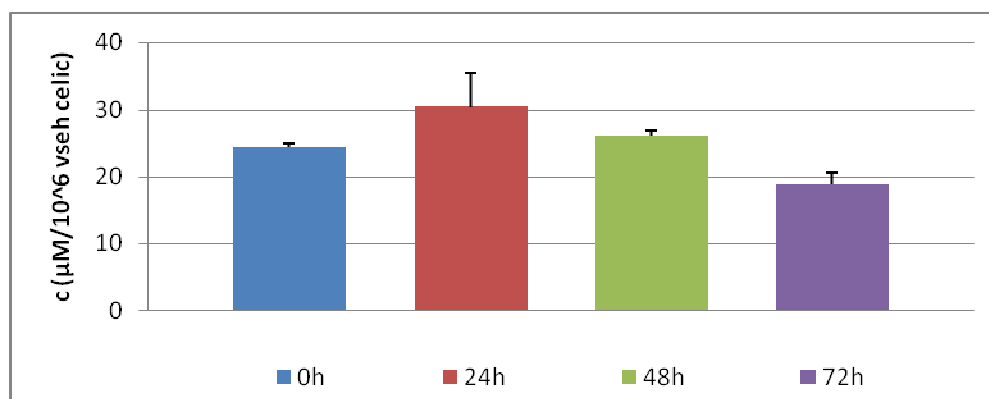
Rezultat meritev GSH pozitivne kontrole je povprečje dveh paralelk. Slika 17 prikazuje koncentracije GSH v celicah, ki so bile 5 mM vodikovemu peroksidu izpostavljene 4h. Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili. Na grafu so prikazani tudi standardni odstopi. Pozitivno kontrolo smo izvajali na celični liniji Ramos.



Slika 17: Grafični prikaz povprečnih koncentracij GSH v celicah RAMOS, ki so bile 4 ure izpostavljene gojišču (CTRL) oziroma 5 mM vodikovemu peroksidu.

4.3.2. Netretirana kontrola

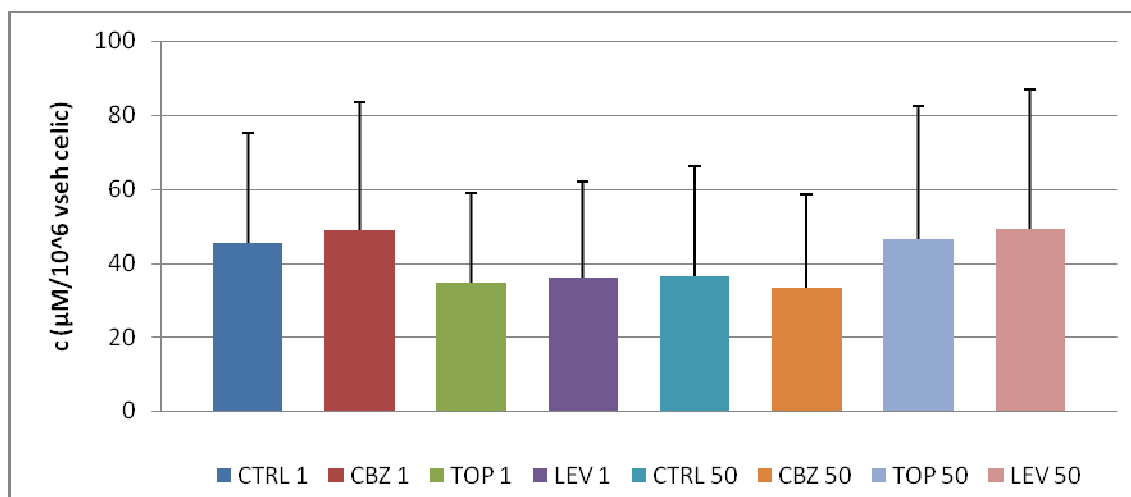
Rezultat meritev GSH netretirane kontrole je povprečje dveh paralelek. Slika 18 prikazuje koncentracije GSH v PBMC, ki so bile izpostavljene 0,1 % DMSO in vzorčene ob času 0, 24, 48 in 72 ur. Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili. Na grafu so prikazani tudi standardni odstopi.



Slika 18: Grafični prikaz povprečnih koncentracij GSH v PBMC, ki so bile izpostavljene 0,1 % DMSO in vzorčene po 0-, 24-, 48- in 72-ih urah.

4.3.3. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur

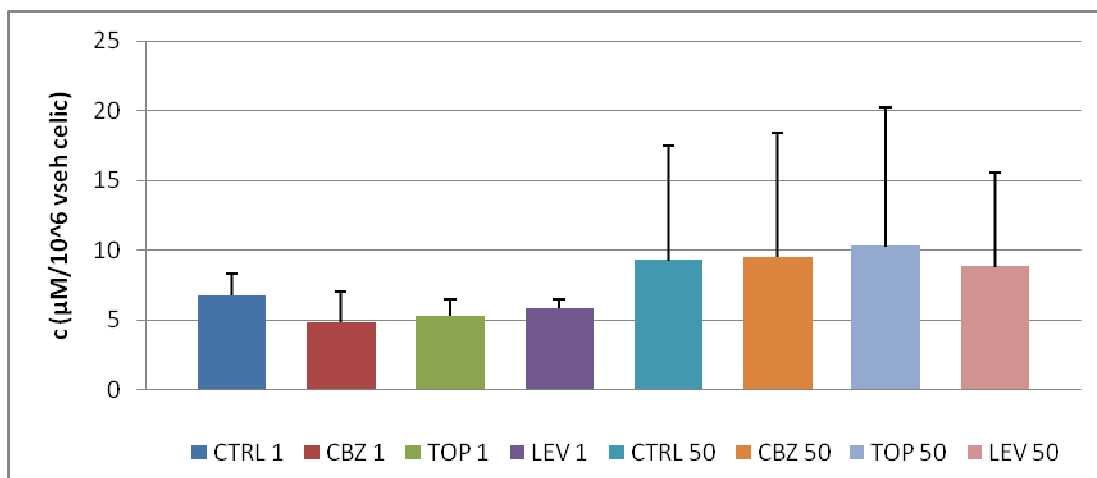
Rezultat meritev GSH v PBMC, izpostavljenih PEZ 72 ur, je povprečje treh paralelk. Slika 19 prikazuje koncentracije GSH v PBMC. Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili. Na grafu so prikazani tudi standardni odstopi.



Slika 19: Grafični prikaz koncentracij GSH v PBMC, ki so bile 72 ur izpostavljene 0,1% DMSO (CTRL 1 in CTRL 50) oziroma PEZ v koncentracijah 1 μg/ml (CBZ 1, TOP 1, LEV 1) in 50 μg/ml (CBZ 50, TOP 50, LEV 50).

4.3.4. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur

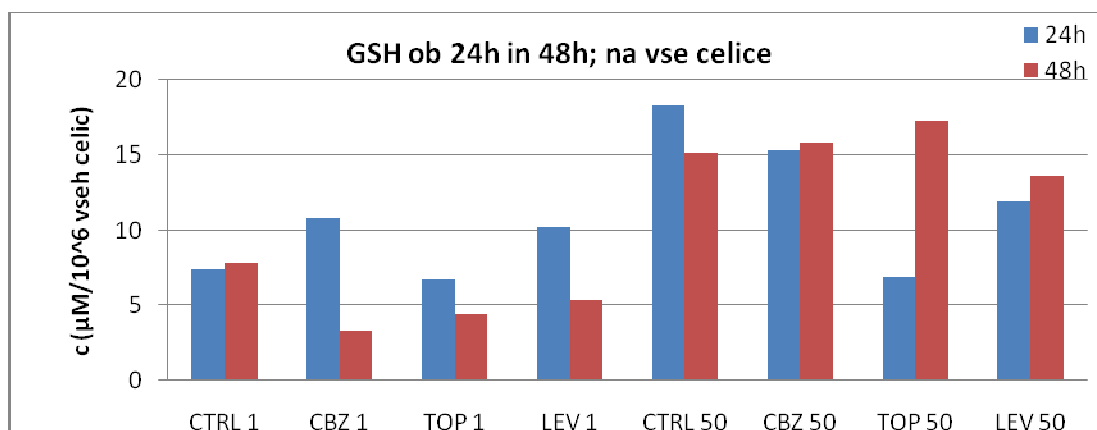
Rezultat meritev GSH v PBMC, izpostavljenih PEZ 48 ur, je povprečje dveh paralelk. Slika 20 prikazuje koncentracije GSH v PBMC. Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili. Na grafu so prikazani tudi standardni odstopi.



Slika 20: Grafični prikaz koncentracij GSH v PBMC, ki so bile 48 ur izpostavljene 0,1% DMSO (CTRL 1 in CTRL 50) oziroma PEZ v koncentracijah 1 μg/ml (CBZ 1, TOP 1 in LEV 1) in 50 μg/ml (CBZ 50, TOP 50 in LEV 50).

4.3.5. Primerjava PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 24 in 48 ur

Vzorke celic, ki si bile izpostavljene PEZ in vzorčene iz istega gojišča po 24h in 48h, smo pripravili v eni paralelki. Rezultate meritev GSH prikazuje slika 21. Rezultati so normirani na št. vseh celic, ki smo jih po končani inkubaciji zamrznili.



Slika 21: Grafični prikaz koncentracij GSH v PBMC, ki so bile 24 in 48 ur izpostavljene 0,1 % DMSO (CTRL 1 in CTRL 50) oziroma PEZ v koncentracijah 1 μg/ml (CBZ 1, TOP 1 in LEV 1) in 50 μg/ml (CBZ 50, TOP 50 in LEV 50). PBMC smo vzorčili iz istega vzorca.

5. RAZPRAVA

Dokazi, da PEZ povzročajo neravnovesja v oksidativnem metabolizmu in zvišujejo nastajanje kazalnikov oksidativnega stresa, se kopičijo (33, 34, 35). Številni članki, ki so bili objavljeni pred kratkim, prikazujejo različne učinke PEZ na oksidativni status. Predvidevajo, da naj bi imela novejša PEZ manj izraženih neželenih učinkov na oksidantno-antioksidantno ravnotežje (25). V diplomskem delu smo hoteli pokazati, da PEZ v terapevtskih koncentracijah oz. višjih od terapevtskih, povzročajo oksidativni stres. Predvsem nas je zanimalo delovanje karbamazepina, za katerega je znano, da se metabolizira do farmakološko aktivnega metabolita. *Santos in sod.* so v raziskavi potrdili domnevo, da je toksičnost karbamazepina in drugih aromatskih PEZ posledica oksidativnega stresa, povzročenega preko njihovih metabolitov (36).

Naj na začetku razprave poudarim, da zaradi zelo slabe ponovljivosti statistična analiza rezultatov ni bila mogoča. Standardni odkloni so zelo veliki, zato ne moremo govoriti o povečanju oziroma zmanjšanju koncentracij označevalcev oksidativnih poškodb in oksidativnega stresa. Rezultate predstavljamo kot trende, ki nakazujejo dogajanje v oksidativnem ravnovesju.

5.1. PREŽIVETJE CELIC

Preživetje celic je najbolj osnoven parameter, ki nam grobo prikaže dogajanje v celicah med izpostavljenostjo različnim dejavnikom. Celice so zelo občutljive na zunanje dejavnike, zato smo morali biti pri delu z njimi izjemno natančni in previdni, ker je velika variabilnost med celičnimi kulturami vplivala tudi na meritve analitov.

5.1.1. Pozitivna kontrola

Pri izvajanju pozitivne kontrole smo celice izpostavili 5 mM H₂O₂ in inkubirali samo 4h. Po štirih urah se preživetje celic ni bistveno razlikovalo od kontrolnega vzorca. Tudi variabilnost med paralelkami je bila nizka. Pozitivno kontrolo smo izvajali na celicah celične linije Ramos, ki so manj občutljive na dejavnike med inkubacijo kot PBMC.

5.1.2. Netretirana kontrola

Netretirano kontrolo smo izvedli, da bi ugotovili, kakšen vpliv ima inkubacija na preživetje celic in na oksidativno dogajanje v njih. Tako smo se lažje odločili za čas inkubacije PBMC v raztopini PEZ. Ugotovili smo, da integriteta membrane in s tem tudi preživetje celic pada s trajanjem inkubacije skoraj linearno, kar pomeni, da že inkubacija sama celicam predstavlja določen stres. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo PBMC izpostavili PEZ 48 in 72 ur.

5.1.3. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur

Preživetje PBMC se med posameznimi PEZ ne razlikuje bistveno. Celice so se odzivale zelo podobno na izpostavljenost PEZ. Opazna pa je razlika v preživetju PBMC med kontrolnim vzorcem in vzorci, ki so bili izpostavljeni PEZ. Preživetje slednjih je nižja. Preživetje celic v raztopini PEZ s koncentracijo 50 $\mu\text{g/ml}$ je manjše kot pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$, kar nakazuje na večjo toksičnost višje koncentracije.

5.1.4. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur

Razlike v preživetju PBMC med kontrolnimi vzorci in vzorci, ki so bili izpostavljeni PEZ, so manjše. Najverjetnejši vzrok za to je krajša doba inkubacije (48 ur v primerjavi z 72 urami iz prejšnjega poglavja). Tudi razlike med posameznimi PEZ so majhne. Pri PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ v koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$, je preživetje manjše kot pri celicah, izpostavljenih koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$. To je spet najverjetneje posledica večje toksičnosti višje koncentracije.

5.2. MERITVE MDA V PBMC

Namen naše diplomske naloge je bil spremljanje oksidativnega stresa v PBMC, izpostavljenih PEZ. Oksidativne poškodbe lipidov smo spremljali preko merjenja MDA, ki je najpogosteje uporabljen kazalec lipidne peroksidacije v bioloških vzorcih.

Mnogi raziskovalci so se že ukvarjali z vplivom PEZ na oksidantno/antioksidantno ravnotežje. *Santos in sod.* so v lizatu jeter podgan, ki so jih predhodno tretirali s karbamazepinom, dokazali statistično značilen porast MDA šele pri serumski koncentraciji 500 $\mu\text{mol/l}$ (terapevtska koncentracija karbamazepina je 4-12 mg/l oz. 17-51 $\mu\text{mol/l}$) (36). *Pavone in*

Cardile sta v študiji dokazala, da so nekatera PEZ zmožna iniciacije oksidativnih procesov v astrocitih. Primarno kulturo podganjih astrocitov so *in vitro* izpostavili karbamazepinu, topiramatu in levetiracetamu. Ugotovili so, da karbamazepin in topiramat značilno povečata koncentracijo MDA v astrocitih, medtem ko v astrocitih, izpostavljenih levetiracetamu, ne pride do značilnih razlik (38, 39). *Oliveira in sod.* so v homogenatu hipokampusa miši, ki so jim dajali levetiracetam, ugotovili, da v primerjavi s kontrolo levetiracetam ne povzroči povečanja koncentracije MDA. Če so mišim pred induciranjem epileptičnega napada s pilokarpinom injicirali levetiracetam, je bil MDA v primerjavi z mišmi z induciranim epileptičnim napadom, ki niso dobile levetiracetama, statistično značilno nižji (40). Podobne rezultate so dobili tudi *Marini in sod.* Podganam, ki so jim injicirali levetiracetam, se koncentracija MDA v možganski skorji in diencefalonu v primerjavi z netretirano kontrolo ni značilno spremenila. Pri podganah, katerim so inducirali epileptični napad s kainsko kislino, pa se je z dodanim levetiracetamom koncentracija MDA v možganski skorji in diencefalonu značilno znižala (37).

5.2.1. Pozitivna kontrola

H₂O₂ smo uporabili z namenom, da bi inducirali lipidno peroksidacijo v celicah in ugotovili, kako se ob oksidativnem stresu poveča MDA. To nam je služilo za primerjavo rezultatov MDA v PBMC, ki smo jih izpostavili PEZ. Pozitivno kontrolo smo izvajali na celicah celične linije Ramos. Te celice so nesmrtni in niso zelo občutljive na zunanje dejavnike. Tako smo zagotovili, da so spremembe v označevalcih oksidativnih poškodb res posledica izpostavljenosti H₂O₂ in ne drugih dejavnikov (npr. časa inkubacije).

Marini in sod. navajajo, da je bilo že štiriurno izpostavljanje podganjih peritonealnih makrofagov v raztopini H₂O₂ s koncentracijo 0,05 mM dovolj, da se je koncentracija MDA v primerjavi z netretirano kontrolo povečala za stokrat (37). Mi smo celice izpostavili 5 mM H₂O₂ in jih inkubirali 4 ure. Opazili smo povečano koncentracijo MDA v primerjavi z netretirano kontrolo, vendar statistično gledano razlik ni. Iz rezultatov smo vseeno sklepali, da obstaja trend naraščanja MDA z naraščajočim oksidativnim stresom. Da bi povzročili večje oksidativne poškodbe, bi lahko poleg H₂O₂ celicam dodali še kovinske ione (npr. Fe³⁺). Ob prisotnosti kovinskih ionov bi potekla Fentonova reakcija in H₂O₂ bi razpadel na OH[•], ki pa so bistveno bolj reaktivni in reagirajo praktično z vsako molekulo, ki se ji približajo.

5.2.2. Netretirana kontrola

Izvedli smo še netretirano kontrolo, s katero smo hoteli ugotoviti tudi vpliv časa inkubiranja na oksidativne spremembe v celicah. Izpostavljanje PEZ smo namreč izvajali na primarni celični kulturi, ki je v primerjavi z celičnimi linijami smrtna in veliko bolj občutljiva na zunanje dejavnike.

Ugotovili smo, da se oksidativni stres na celice s časom povečuje in da se ujema z odstotkom preživetja celic. Po 48-ih urah inkubacije je bila koncentracija MDA skoraj štirikrat večja kot na začetku (0h). Koncentracija MDA po 72-ih urah inkubacije je celo rahlo padla. Predvidevali smo, da je celična membrana po 72-ih urah že močno poškodovana in da so produkti oksidativnih poškodb dosegli maksimum. Možno je tudi, da smo zaradi večjega umiranja PBMC med inkubacijo s centrifugiranjem izgubili več celic, z njimi pa tudi MDA. Zaradi tako velikega vpliva časa inkubacije na oksidativne poškodbe smo morali poleg PBMC, ki smo jih izpostavili PEZ, vedno pripraviti tudi netretirano kontrolo, kateri smo dodali le medij (DMSO), v katerem smo raztapljali PEZ.

5.2.3. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 72 ur

V prvem delu eksperimenta smo PBMC, izpostavljene PEZ, inkubirali 72 ur. Celice smo izpostavili dvema različnima koncentracijama: koncentracija 1 $\mu\text{g/ml}$ je nižja od terapevtske koncentracije pri vseh treh PEZ, 50 $\mu\text{g/ml}$ pa pri karbamazepinu in topiramatu predstavlja že toksično koncentracijo, pri levetiracetamu pa je še vedno znotraj terapevtskih koncentracij. Na podlagi terapevtskih koncentracij smo pričakovali, da bo največ oksidativnih poškodb pri višji koncentraciji povzročal karbamazepin zaradi nizke terapevtske koncentracije, ki smo jo presegli, in zaradi reaktivnih intermediatov, ki nastajajo pri oksidativnem metabolizmu. Topiramat in levetiracetam sta predstavnika druge generacije in naj ne bi povzročala oksidativnega stresa v tolikšni meri.

Pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$ večjih razlik med netretiranimi celicami in celicami, izpostavljenimi PEZ, ne bi smelo biti. Vseeno pa je koncentracija MDA pri karbamazepinu močno narasla, medtem ko je bila pri topiramatu zelo podobna netretirani kontroli, pri levetiracetamu pa celo nižja.

Pri koncentraciji 50 µg/ml smo opazili porast MDA v PBMC glede na netretirano kontrolo pri vseh treh PEZ, razlike med posameznimi PEZ pa so bile majhne. Trend naraščanja koncentracije MDA s koncentracijo PEZ v gojišču obstaja, razlik med prvo in drugo generacijo PEZ pa nismo opazili.

5.2.4. PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ 48 ur

Čas inkubacije PBMC v gojišču s PEZ smo kasneje skrajšali na 48 ur. Tudi v tem primeru smo PBMC izpostavili dvema koncentracijama PEZ, 1 µg/ml in 50 µg/ml. Pri koncentraciji 1 µg/ml smo opazili rahel porast koncentracije MDA pri karbamazepinu in levetiracetamu ter malo večji porast pri topiramatu glede na netretirano kontrolo. Razlike v koncentraciji sicer niso bile velike. Pri koncentraciji 50 µg/ml je bila koncentracija MDA pri karbamazepinu in topiramatu nižja kot pri netretirani kontroli, pri levetiracetamu pa je močno narasla. Zakaj je koncentracija MDA pri levetiracetamu tako močno narasla, nam ni znano. Levetiracetam naj bi imel med vsemi uporabljenimi PEZ najmanjši vpliv na oksidativno ravnotežje.

5.3. MERITVE GSH V PBMC

GSH je eden najpomembnejših ne-encimskih antioksidantov v našem telesu. Njegovo koncentracijo smo določali zato, da bi ocenili endogene obrambne mehanizme proti oksidativnem stresu.

Santos in sod. so v jetrni mitohondrijski frakciji podgan, ki so jim predhodno dajali karbamazepin, določili statistično značilno znižanje koncentracije GSH šele pri koncentraciji 200 µmol/l karbamazepina (terapevtsko območje je 17-51 µmol/l) (36). *Oliveira in sod.* so v homogenatu hipokampusa miši, ki so jim predhodno dajali levetiracetam, ugotovili, da v primerjavi s kontrolo ne povzroči padca koncentracije GSH. Pri miših, ki so jim levetiracetam vbrizgali pred umetno indukcijo epileptičnega napada s pilokarpinom, so ugotovili, da levetiracetam prepreči izgubo GSH v hipokampusu (40). Tudi *Marini in sod.* so izvedli podoben eksperiment in ugotovili, da levetiracetam v primerjavi s kontrolo ne povzroči izgube GSH v možganski skorji in diencefalonu podgan. Pri podganah, ki so jim umetno inducirali

epileptični napad s kainsko kislino, je levetiracetam preprečil padec koncentracije GSH v možganski skorji in diencefalonu (37).

5.3.1. Pozitivna kontrola

V vzorcu celic, ki smo jih izpostavili 5 mM H_2O_2 in jih inkubirali 4 ure, smo opazili izrazit padec GSH. Kljub visoki standardni deviaciji pri višji koncentraciji H_2O_2 obstaja trend nižanja koncentracije GSH v celicah. Rezultati vsebnosti GSH so se ujemali z rezultati vsebnosti MDA. Prišlo je do porasta MDA in padca GSH, kar je bilo v skladu s pričakovanji. H_2O_2 je v celicah povzročil oksidativni stres.

5.3.2. Netretirana kontrola

Pri netretirani kontroli smo po 24-ih urah opazili porast GSH, ki pa je v naslednjih 48-ih urah padel na isto raven kot je bil na začetku, po 72-ih urah pa je še dodatno padel. Ugotavljali smo, da je za povečanje koncentracije GSH po 24-ih urah kriva inkubacija, ki celicam na začetku najverjetneje predstavlja stres. Predvidevamo, da je prišlo do prilagoditve celic na oksidativni stres s povečano obrambo z antioksidanti. To pomeni, da stresa ne povzroča le izpostavljanje H_2O_2 oziroma PEZ, temveč je za celice izredno stresna že inkubacija. Po 72-ih urah namreč s padcem GSH pride tudi do porasta MDA.

5.3.3. PBMC, ki so bile PEZ izpostavljene 72 ur

V vzorcih PBMC, ki smo jih izpostavili PEZ v koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$, je bila koncentracija GSH pri vseh treh PEZ primerljiva z netretirano kontrolo. Opazili smo trend upadanja koncentracije GSH pri topiramatu in levetiracetamu, vendar so rezultati statistično neznačilni in o znižanih vrednostih ne moremo govoriti.

Pri koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$ so se nakazovali pričakovani rezultati. GSH v vzorcih, ki so bili izpostavljeni karbamazepinu, je bil nižji od netretirane kontrole, pri topiramatu in levetiracetamu pa je koncentracija GSH celo malo višja. Spet lahko govorimo samo o trendu padanja koncentracije GSH pri karbamazepinu, saj je v primerjavi z netretirano kontrolo razlika neznačilna.

5.3.4. PBMC, ki so bile PEZ izpostavljene 48 ur

Rezultati vzorcev PBMC, ki so bili izpostavljeni PEZ v koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$, so bili pričakovani. Pri vseh PEZ smo opazili trend padanja koncentracije GSH v PBMC. Ta trend je bil najbolj očiten pri karbamazepinu, za katerega je znano, da povzroča oksidativni stres. Padec koncentracije GSH pri topiramatu in levetiracetamu je bil nižji.

Pri PEZ s koncentracijo 50 $\mu\text{g/ml}$ smo zabeležili zelo podobne rezultate koncentracije GSH med vzorci, izpostavljenimi PEZ, in netretirano kontrolo, čeprav smo pri višji koncentraciji PEZ pričakovali večje razlike.

5.3.5. PBMC, ki so bile PEZ izpostavljene 24 in 48 ur

Ker nas je zanimal hkratni vpliv trajanja inkubacije in izpostavljenost PEZ na oksidativni stres, smo naredili še eksperiment, kjer smo iz istega vzorca vzorčili celice po 24-ih in 48-ih urah inkubacije in oba vzorca hkrati analizirali na GSH. Netretirani kontroli pri obeh koncentracijah (1 $\mu\text{g/ml}$ in 50 $\mu\text{g/ml}$) imata po 24- in 48-i uri zelo podobne koncentracije GSH, zato lahko sklepamo, da čas inkubacije nima vpliva na GSH.

Pri vzorcih, ki smo jih izpostavili PEZ s koncentracijo 1 $\mu\text{g/ml}$, je med 24- in 48-o uro prišlo do očitnega padca koncentracije GSH pri vseh treh PEZ. Sklepali smo, da je padec posledica daljšega časa izpostavljenosti PEZ.

Nasprotno pa so pri vzorcih, ki so bili PEZ s koncentracijo 50 $\mu\text{g/ml}$, koncentracije GSH med 24- in 48-o uro zelo podobni. Pri višjih koncentracijah sklepamo, da čas izpostavljenosti nima takega vpliva na oksidativni stres oziroma da PEZ zdravila že po 24-ih urah povzročijo spremembe v koncentraciji GSH.

5.4. IZVAJANJE EKSPERIMENTA IN MERITEV

Čeprav smo eksperiment pred začetkom izvajanja skrbno načrtovali, smo med samo izvedbo naleteli na precej pomanjkljivosti, ki so nam povzročale težave tako pri pripravi vzorcev kot pri izvedbi analiz.

Prvi problem nam je predstavljala liza celic, ki je nismo izvajali pri vseh vzorcih. V zgodnejših fazah eksperimenta smo namreč predvidevali, da so bili pogoji priprave vzorca dovolj ostri, da bi v zadostni meri poškodovali celice in bi le-te v supernatant sprostile MDA in GSH. Po bolj podrobnem posvetu s kolegi s Katedre za klinično biokemijo pa smo ugotovili, da bi večjo ponovljivost rezultatov analize zagotovili z postopkom lize celic, ki je opisan v poglavju 3.2.10. Vzorce smo nato lizirali po tem postopku, vendar smo po tej spremembi začeli opazati, da pri HPLC analizi GSH v vzorcih nismo dobili nobenega odziva. Ker smo sumili, da je za odsotnost odzivov kriva liza celic, smo za potrditev še enkrat izvedli GSH analizo drugega vzorca, ki ga predhodno nismo lizirali, in dobili odzive. Predvidevali smo, da je za odsotnost odziva GSH najverjetneje kriva ultrasonična homogenizacija celičnega lizata, zato predlagamo, da se v prihodnjih analizah temu koraku izognejo. Pri analizi MDA nismo opazili podobne korelacije.

Pri pripravi vzorca se nam je nekajkrat zgodilo, da odtajanega vzorca v obliki pelete nismo mogli resuspendirati v bidestilirani vodi, čeprav smo si pomagali z mešanjem na mešalih, uporabo ultrazvočne kadičke in centrifugiranjem. Analizo smo v supernatantu vseeno opravili, vendar odzivov pri analizi MDA sploh nismo dobili, odzivi pri analizi GSH pa so bili zelo nizki. Da bi se izognili problemom z resuspendiranjem vzorca, smo celice pred zamrzovanjem suspendirali v 50 μ l destilirane vode in jih v taki obliki zamrznili na -80°C .

Problemov z odzivi analitov pa nismo imeli samo zaradi lize celic z ultrasoničnim homogenizatorjem. Tudi v neliziranih vzorcih se nam je nekajkrat zgodilo, da odziva nismo dobili ali pa so bili le-ti zelo nizki in neponovljivi. Zaradi neponovljivosti rezultatov smo imeli velika odstopanja med posameznimi paralelkami, kar se vidi v standardnih odklonih. Vzrok za tako nizke odzive je bila najverjetneje premajhna količina vzorca in prenizka koncentracija analitov v vzorcu, s katerimi smo komaj presegali limbo kvantifikacije in se nahajali na robu območja linearnosti. Ker smo bili s PBMC zelo omejeni in si nismo mogli privoščiti večjega števila celic, smo pri analizi MDA UV/VIS detektor zamenjali z masnim spektrometrom, ki je bil bistveno bolj občutljiv in smo z njim lahko določali nižje koncentracije MDA. V primeru analize GSH si tega nismo mogli privoščiti, ker smo delali z reagentnim kitom in smo imeli pogoje analize že vnaprej določene, zato smo se morali zadovoljiti z rezultati, ki smo jih

dobili. Nadalnjim raziskovalcem, ki bodo določali koncentracijo GSH v PBMC, priporočamo, da povečajo količino vzorca in se s tem izognejo težavam s prenizkimi odzivi.

Na koncu bi poudarila še, da smo vse naše rezultate preračunali na število vseh celic, da bi jim med seboj lažje primerjali. Način normiranja ni najbolj idealen, saj smo število celic določili še pred spiranjem s pufrom in centrifugiranjem. S temi postopki smo določen odstotek celic izgubili. V našem primeru bi bilo boljše, če bi rezultate preračunali na koncentracijo proteinov v celičnem lizatu, ki smo ga uporabili za analizo MDA in GSH. Merjenje koncentracije proteinov je namreč bolj natančno kot štetje celic s hemocitometrom, poleg tega bi proteine določali v že pripravljenem vzorcu, katerega bi naprej uporabili še za analizo MDA oziroma GSH. Tudi mi smo poskusili določati koncentracijo proteinov, vendar pa smo zaradi različnih načinov lize celic dobili preveč različne rezultate, da bi jih lahko uporabili.

6. SKLEPI

Čeprav nismo dobili takšnih rezultatov, kot smo jih pričakovali, smo s študijo vseeno dobili veliko podatkov, ki nam bodo pomagala pri nadaljnjem načrtovanju eksperimentov in izogibanju težavam, s katerimi smo se srečevali do sedaj. Rezultati nam podajajo okvirno sliko dogajanja v celicah med izpostavljenostjo oksidativnim dejavnikom.

Ugotovili smo, da že inkubacija v 0,1% DMSO (topilo, v katerem smo raztapljali PEZ) za celice predstavlja precejšen stres. Koncentracija MDA se je s časom inkubacije povečevala, koncentracija GSH pa zniževala. Da bi se izognili vplivu časa inkubacije, smo poleg PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ, vedno izvajali tudi netretirano kontrolo in rezultate vedno primerjali z rezultati kontrole.

Povprečje koncentracij MDA v PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ, je bilo sicer višje kot v netretirani kontroli, vendar pa zaradi slabe ponovljivosti ne moremo govoriti o statistično značilnih razlikah. Prav tako ne moremo postaviti zaključkov pri GSH analizi istih vzorcev. Opazili smo trend padanja koncentracije GSH v PBMC, ki so bile izpostavljene PEZ. PBMC smo PEZ izpostavljali 48 in 72 ur, vendar nismo opazili bistvenih razlik v koncentracijah MDA oziroma GSH. Čas izpostavljenosti PEZ ni tako pomemben kot je pomembno to, da poleg vsakega vzorca, izpostavljenega PEZ, pripravimo tudi netretirano kontrolo.

Imeli smo res slabo ponovljivost rezultatov, ki pa bi se jo dalo z določenimi koraki precej izboljšati. Dokler se metode gojenja celic in analize označevalcev oksidativnega stresa ne optimizirajo, predlagamo izvajanje vseh eksperimentov na celični liniji Ramos. V sklopu diplomske naloge smo sicer uporabljali primarne kulture levkocitov, ki v primerjavi s celično linijo veliko bolje oponašajo *in vivo* pogoje, vendar so bolj občutljivi na zunanje dejavnike. S celično linijo bi si zagotovili manjšo variabilnost med posameznimi vzorci, poleg tega bi imeli na voljo tudi več celic za izvajanje analiz, saj so celične linije sposobne razmnoževanja. S tem bi rešili tudi problem premajhne količine vzorcev, ki je tudi razlog za slabo ponovljivost rezultatov. V kasnejših fazah bi eksperiment lahko prenesli nazaj na PBMC.

V nadaljevanju študije bi predlagala, da se razišče še vpliv ostalih PEZ na oksidativni stres celic. Celice bi lahko izpostavili PEZ v koncentracijah, ki so dosti višje od terapevtskih, in jih

primerjali z rezultati celic, izpostavljenih terapevtskim koncentracijam istih učinkovin. Uporabili bi lahko tudi kombinacije PEZ, ki se navadno uporabljajo v racionalnih duoterapijah ali politerapijah. Poleg MDA in GSH bi lahko spremljali tudi druge analite, ki so soudeleženi v oksidativnih procesih v celicah. V študijah, ki so podobne naši, so določali različne encime, udeležene v obrambi celic proti oksidativnemu stresu, kot so superoksid dismutaza, glutathion peroksidaza, glutathion reduktaza. Zanimivo bi bilo določiti tudi produkte oksidativnih poškodb na proteinih, kot so karbonil proteini.

V sklopu študije se vzporedno s spremljanjem oksidativnega stresa na PBMC, izpostavljenih PEZ, izvaja tudi klinična študija v sodelovanju z Nevrološko kliniko Kliničnega centra Ljubljana. V okviru klinične študije smo prostovoljcem, ki se zdravijo za epilepsijo, odvzeli kri. Na krvnih vzorcih bodo kasneje določali označevalce oksidativnega stresa, med drugim tudi MDA in GSH, ter spremljali koncentracijo PEZ v krvni plazmi. To pa je že tema druge diplomske naloge.

7. LITERATURA

- 1 Fisher RS, Boas WE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, and Engel JJ: Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005, 46(4): 470-472.
- 2 Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, druga izdaja. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2009: 19-24, 291-307.
- 3 Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rand and Dale's Pharmacology, 6th edition. Elsevier limited 2007: 575-587.
- 4 Panayiotopoulos CP: A clinical guide to epileptic syndromes and their treatment. Springer-Verlag Ltd 2007: 14-15.
- 5 Perucca E, French J and Bailer M: Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives and recent advances. *Lancet Neurology* 2007, 6: 793-804.
- 6 Čebular B, Zgonc V: Posebnosti zdravljenja epilepsije pri starejših. *Zdravniški vestnik* 2007, 76: 473-479.
- 7 Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ et. al.: Revised terminology and concepts for organisation of seizures and epilepsies: Report of the ILAE commission on classification and terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010, 51(4): 676-685.
- 8 Zgonc V, Čebular B: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Zdravniški vestnik* 2006, 75: 379-388.
- 9 Brodie MJ: Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* 2010, 19: 650-655.
- 10 Perucca E: The new generation of antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1996, 42: 531-543.
- 11 <http://en.wikipedia.org> (dostopno: maj 2012)
- 12 www.rxlist.com (dostopno: maj 2012)
- 13 www.zdravila.net (dostopno: maj 2012)
- 14 Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, and Perucca E: Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE commission on therapeutic strategies. *Epilepsia* 2008, 49(7): 1239-1276.

- 15 Theodore WH, Narang PK, Holmes MD, et. al.: Carbamazepine and its epoxide: relation of plasma levels to toxicity and seizure control. *Annual Neurology* 1989, 25: 194-196.
- 16 Łuszczki JJ: Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacological Reports* 2009, 61: 197-216.
- 17 Halliwell B and Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*, 4th edition. Oxford University Press 2007: 21-23, 79-121, 187-260.
- 18 Bošković M, Vovk T, Kores Plesničar B, Grabnar I: Oxidative stress in schizophrenia. *Current Neuropharmacology* 2011, 9: 301-312.
- 19 Vitte J, Michel BF, Bongrand P, and Gastaut JL: Oxidative stress level in circulating neutrophils is linked to neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Immunology* 2004, Vol. 24, No. 6: 683-692.
- 20 Devi PU, Manocha A and Vohora D: Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert Opinion in Pharmacotherapy* 2008, 9(18): 3169-3177.
- 21 Kunz WS: The role of mitochondria in epileptogenesis. *Current Opinion in Neurology* 2002, 15: 179-184.
- 22 Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature (London)* 2000, 408: 239-247.
- 23 Schulpis KH, Lazaropoulou C, Regoutas S, Karikas GA, Margeli A, Tsakiris S, Papassotiriou I: Valproic acid monotherapy induces DNA oxidative stress. *Toxicology* 2006, 217: 228-232.
- 24 Marnett LJ: Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* 1999, 424: 83-95.
- 25 Arhan E, Serdaroglu A, Ozturk B, Ozturk HS, Ozcelik A, Kurt N, Kutsal E, Sevinc N: Effects of epilepsy and antiepileptic drugs on nitric oxide, lipid peroxidation and xanthine oxidase system in children with idiopathic epilepsy. *Seizure* 2011, 20: 138-142.
- 26 Bandyopadhyay U, Das D and Banerjee RK: Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current science* 1999, Vol. 77, No. 5: 658-666.
- 27 Arrick BA, Nathan CF: Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Research* 1984, 44: 4224-4232.

- 28 Patel MN: Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy. *Free Radical Research* 2002, Vol. 36(11): 1139-1146.
- 29 Aycicek A, Iscan A: The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. *European Neurology* 2007, 57: 65-69.
- 30 Andrejc D: indukcija apoptoze v humanih celičnih linijah limfocitov B s stimulacijo receptorja EP4, diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
- 31 Šparakl J: Razvoj metode HPLC za vrednotenje lipidne peroksidacije z določanjem malondialdehida v plazmi, diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
- 32 Titan A: Določanje malondialdehida v plazmi konj z derivatizacijskimi metodami in tekočinsko kromatografijo, diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011.
- 33 Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 2000, 408: 239-265.
- 34 Jeding I, Evans PJ, Akanmu D, Spencer JD, Arouma OI, et. al.: Characterization of the potential antioxidant and prooxidant actions of some neuroleptic drugs. *Biochemical Pharmacology* 1990, 40: 359-365.
- 35 Cotariu D, Evans S, Zaidman JL, Marcus O: Early changes in hepatic redox homeostasis following treatment with a single dose of valproic acid. *Biochemical Pharmacology* 1990, 40: 589-593.
- 36 Santos NAG, Medina WSG, Martins NM, Carvalho Rodrigues MA, Curti C, Santos AC: Involvement of oxidative stress in the hepatotoxicity induced by aromatic antiepileptic drugs. *Toxicology in Vitro* 2008, 22: 1820-1824.
- 37 Marini H, Costa C, Passaniti M, Esposito M, Campo GM, Ientile R, Adamo EB, Marini R, Calabresi P, Altavilla D, Minutoli L, Pisani F, Squadrito F: Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sciences* 2004, 74: 1253-1264.
- 38 Pavone A, Cardile V: An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia* 2003, 44 (Suppl. 10): 34-39.
- 39 Cardile V, Pavone A, Renis M, Maci T and Perciavalle V: Effects of gabapentin and topiramate in primary rat astrocyte cultures. *Neuroreport* 2001, Vol. 12, No. 8: 1705-1708.

- 40 Oliveira AA, Almeida JPC, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LMV, Júnior HVN, Fonseca FN, Viana GSB, Sousa FCF, and Fonteles MMF: Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpin-induced seizures. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2007, Vol. 27, No. 3: 395-404.