

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MITJA ČVAN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MITJA ČVAN

**VPLIV PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN NA
OKSIDATIVNI STRES V CELIČNI LINIJI LIMFOCITOV B**

**OXIDATIVE STRESS IN LYMPHOCYTE B CELL LINE
EXPOSED TO ANTI-EPILEPTIC DRUGS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

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

Na tem mestu bi se rad zahvalil doc. dr. Tomažu Vovku, za pomoč ter strokovno usmerjanje, prav tako se za nasvete in pomoč zahvaljujem somentorju asist. dr. Matevžu Prijatelju.

Tijani Markovič, mag farm., se zahvaljujem za prijazne nasvete in pomoč pri delu s celicami. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Robertu Roškarju za vse analize na MS ter celotni katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko.

Iskrena zahvala gre mojim domačim, ki so me ves čas študija spodbujali in podpirali, hvala tudi nečaku Marku za dani zagon čisto ob koncu. Seveda hvala tudi moji Katji, ki nikoli ni nehala verjeti vame.

Izjava

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

Mitja Čvan

Ljubljana, februar 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Alenka Zvonar, mag.farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1. EPILEPSIJA	1
1.2. PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE	3
1.2.1. Carbamazepin	5
1.2.2. Topiramat	6
1.2.3. Levetiracetam	7
1.3. OKSIDATIVNI STRES	7
1.3.1. Reaktivne zvrsti	8
1.3.2. Antioksidanti	12
1.4. EPILEPSIJA IN OKSIDATIVNI STRES	14
1.5. PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA IN OKSIDATIVNI STRES	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.1.1. Standardi	17
3.1.2. Reagenti in topila	17
3.1.3. Mediji za delo s celicami	18
3.1.4. Pufri in raztopine	19
3.1.5. Laboratorijska oprema	19
3.1.6. Humana celična linija Ramos	21
3.2. METODE DELA S CELICAMI	21
3.2.1. Izolacija perifernih mononuklearnih celic iz venske krvi	22
3.2.2. Štetje celic	22
3.2.3. Gojenje in subkultiviranje celic	23
3.2.4. Priprava osnovne raztopine protiepileptičnih učinkovin	23
3.2.5. Pozitivna kontrola	24
3.2.6. Izpostavljanje celic PEU	24
3.2.7. Zamrzovanje celic	25
3.2.8. Priprava celic za analizo	25
3.2.9. Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu	25

3.3. TEST ZA DOLOČANJE PRESNOVNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS .	26
3.4. DOLOČANJE MDA V CELICAH S LC-MS/MS Z METODO DNPH	27
3.4.1. Priprava vzorcev	27
3.4.2. Metoda tekočinske kromatografije (LC)	29
3.4.3. Metoda MS/MS	29
3.5. DOLOČANJE GSH IN GSSG V CELICAH S LC-MS/MS METODO.....	30
3.5.1. Priprava vzorcev	30
3.5.2. Metoda LC	31
3.5.3. Metoda MS/MS	32
3.6. OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA	32
4. REZULTATI.....	33
4.1. ODSTOTEK IN ŠTEVILO ŽIVIH CELIC.....	33
4.1.1. Pozitivna kontrola.....	33
4.1.2. Terapevtska in povišana koncentracija PEU	34
4.1.3. Terapevtska in povišana koncentracija kombinacije PEU.....	35
4.2. DOLOČANJE PRESNOVNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS	36
4.3. MERITVE MDA, GSH IN GSSG.....	37
4.3.1. Pozitivna kontrola 72 h.....	38
4.3.2. Pozitivna kontrola 1 h.....	39
4.3.3. Terapevtska in povišana koncentracija PEU	41
4.3.4. Terapevtska in povišana koncentracija kombinacije PEU.....	43
5. RAZPRAVA.....	46
5.1. ODSTOTEK IN ŠTEVILO ŽIVIH CELIC.....	46
5.2. PRESNOVNA AKTIVNOST CELIC MERJENIH Z REAGENTOM MTS	47
5.3. REZULTATI MERITEV MDA, GSH IN GSSG	48
6. SKLEPI	54
7. LITERATURA.....	56

POVZETEK

Nastanek epileptičnih napadov je verjetno povezan s spremembami v koncentraciji antioksidantov in oksidantov v nevronih. Poškodbe celic, ki so posledica oksidativnega stresa lahko igrajo pomembno vlogo pri začetku in napredovanju epilepsije, zato bi lahko zdravljenje, ki bi omililo oksidativni stres, spremenilo potek nastanka bolezni. Veliko protiepileptičnih učinkovin starejše generacije se presnavlja do reaktivnih presnovkov, ki imajo sposobnost kovalentne vezave na biološke makromolekule.

Vzpostavili smo eksperimentalni model za določanje vpliva protiepileptičnih učinkovin na oksidativni stres v celični liniji limfocitov B. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 0,05 in 0,1 mM vodikov peroksid. Celice smo izpostavili terapevtskim koncentracijam karbamazepina (CBZ), topiramata (TOP) in levetiracetama (LEV) (10, 10 in 25 mg/L) in povišanim koncentracijam (50, 50 in 100 mg/L) ter kombinacijam. Celice smo po 48 urni inkubaciji sprali in zamrznili v obliki pelet. V vzorcih smo nato izmerili koncentracijo malodialdehida (MDA), kazalnika lipidne peroksidacije, ter reducirano in oksidirano obliko glutationa (GSH in GSSG), ki je glavni znotrajcelični neencimski antioksidant.

Razvili smo nov postopek derivatizacije MDA z 2,4-dinitrofenilhidrazinom, ki je dobro ponovljiv in primeren za nadaljnjo analiziranje na masnem spektrometru. Razvili smo hitro in enostavno metodo hkratnega določanja GSH in GSSG s tekočinsko kromatografijo in detekcijo na masnem spektrometru.

CBZ je s povečanjem koncentracije zmanjšal proliferacijo celic, medtem ko v kombinaciji z TOP ali LEV razlik nismo opazili. Pri dodatku vodikovega peroksidu smo v odvisnosti od njegove koncentracije po 72 urah v primerjavi s kontrolo izmerili značilno povečanje MDA, prav tako se je koncentracija GSH povečala. CBZ je v terapevtski koncentraciji po 48 urni inkubaciji značilno povečal količino MDA v celicah. Pri TOP smo opazili koncentacijsko odvisno padanje količine nastalega MDA. Kombinacija terapevtskih koncentracij CBZ s TOP ali LEV v primerjavi s kontrolo ni povzročilo sprememb v količini MDA ali GSH.

Rezultati nakazujejo, da CBZ v terapevtski koncentraciji povzroča oksidativni stres, ki ga lahko zaznamo s spremljanjem kazalnikov kot je MDA. Kombinacija CBZ s TOP ali LEV ne povzroča oksidativnega stresa, kar bi lahko imelo pri zdravljenju epilepsije določene prednosti, vendar so za dokončno potrditev potrebni še dodatni *in vitro* ter *in vivo* poskusi.

ABSTRACT

The development of epileptic seizures is likely to be associated with changes in concentrations of antioxidants and oxidants in neurons. Cell damage resulting from oxidative stress can play a major role in development and progression of epilepsy. Treatment that would alleviate oxidative stress could change the course of development of epilepsy. Old generation of antiepileptic drugs (AED) are often metabolized to reactive metabolites, which have ability to bind to biological macromolecules.

We established an experimental model on lymphocyte B cell line to determine the influence of antiepileptic drugs on oxidative stress. We exposed cells to 0,05 and 0,1 mM hydrogen peroxide as positive control. We exposed cells to therapeutic concentrations of carbamazepine (CBZ), topiramate (TOP) and levetiracetam (LEV) (10, 10 and 25 mg/L). We also used higher concentrations (50, 50 and 100 mg/L) and combinations of AED. After 48 h of incubation cells were washed and frozen in the form of pellets. These samples were used for measurement of malondialdehyde concentrations (MDA), a known marker of lipid peroxidation and reduced and oxidized forms of glutathione (GSH and GSSG), the main non-enzymatic antioxidant.

We developed a new derivatization method for MDA determination with 2,4-dinitrofenylhydrazine. The method has good repeatability and is applicable for further analysis on mass spectrometer (MS). We also developed a quick and easy method for simultaneous determination of GSH and GSSG with liquid chromatography and MS detection.

Unlike combinations of CBZ with TOP or LEV, increasing concentration of CBZ reduced proliferation of cells. Hydrogen peroxide increased concentration of MDA after 72 h incubation in a concentration dependent manner. GSH concentration also increased. MDA formation was increased after 48 h of incubation with therapeutic concentration of CBZ. TOP reduced formation of MDA in a concentration dependent manner. Combinations of AED did not change concentrations of MDA or GSH.

Results suggest that therapeutic concentrations of CBZ induce oxidative stress which can be measured with markers such as MDA. Combinations of CBZ with TOP or LEV do not induce oxidative stress, which could be beneficial, although further *in vitro* and *in vivo* tests are required.

SEZNAM OKRAJŠAV

γ-GCS	γ-glutamilcistein sintetaza
AMPA	α-amino-3-hidroksi-4-izoksazol propanojska kislina
KAT	katalaza
CBZ	karbamazepin
CŽS	centralni živčni sistem
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DMSO	dimetilsulfoksid
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ESI	elektrorazprševalna ionizacija, ang. »electrospray ionization«
GABA	γ-aminomaslena kislina
GP	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	reducirani glutation
GSSG	oksidirani glutation
ILAE	mednarodna liga proti epilepsiji, ang. »International league against epilepsy«
LAF	laminarni pretok zraka, ang. »laminar air flow«
LEV	S-(-)-levetiracetam
LC	tekočinska kromatografija
MD	meja detekcije
MF	mobilna faza

MK	meja kvantifikacije
MS	masna spektrometrija
MTS	(3-(4,2-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
OR	osnovna raztopina
PBS	fosfatni pufer, pH = 7,4
PEU	protiepileptična učinkovina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RS	reaktivne zvrsti
SD	standardna deviacija
SOD	superoksid dismutaza
TOP	topiramat
VNMK	večkratnenasičene maščobne kisline

1. UVOD

1.1. EPILEPSIJA

Epilepsija je zelo pogosta nevrološka motnja, ki prizadene 0,5-1% svetovne populacije. (1, 2). Okoli 50 millionov ljudi po svetu ima epilepsijo (3). Incidenca je nekoliko višja pri moških ter višja pri afroameričanh kot pri kavkazijcih (4). 80 % ljudi, ki ima epilepsijo, živi v državah v razvoju (5). Otroci stari manj kot 5 let in osebe starejše od 65 let imajo večjo verjetnost za razvoj epilepsije. Kar 1 primer epilepsije od 4 se razvije pred 5 letom starosti (6).

Epilepsija je skupno ime za različne motnje v možganih, za katere je značilno nagnjenje do epileptičnih napadov (7). Te motnje so lahko posledica različnih dejavnikov, kot so mutacije genov, nenormalna migracija celic, tumorji, infekcije, degenerativne bolezni, kap, epileptični status, travmatične poškodbe možganov, v mnogih primerih pa vzrok motenj ni znan (4). Epileptični napadi, ki se izrazijo v različnih oblikah, so rezultat epizodičnih proženj nevronov v možganih, oblika napada pa je odvisna od mesta poškodovanih možganov (1). Napadi imajo jasen začetek, konec pa je pogosto manj očiten zaradi simptomov, ki se izrazijo ob koncu napada (7). Simptomi napada so odvisni od mesta pričetka proženj in morebitnih razširitev v druge dele možganov, kar se lahko izraža samo kot kratek padec pozornosti, sprememba vedenja ali občutkov, lahko pa pride do popolnega konvulzivnega napada, ki traja tudi nekaj minut (1).

Genetska predispozicija ter pridobljene poškodbe možganov sta močna neodvisna napovedovalca epilepsije (5). Za postavitev diagnoze mora priti do vsaj enega epileptičnega napada, trajnih sprememb v možganih, ki povečajo verjetnost za nadaljnje napade, in psiholoških posledic, ki so povezani z epilepsijo (7).

Klinično razvrščamo epilepsijo glede na lastnosti epileptičnih napadov in ne na podlagi vzroka za nastanek. Ločimo dve glavni skupini epileptičnih napadov: generalizirani in žariščni napadi. Med napadom oseba lahko ostane pri zavesti (lažji napad), lahko pa jo tudi izgubi (kompleksen napad). V žariščnem napadu se proženje nevronov začne lokalno in pogosto tudi ostane lokalizirano. Simptomi so odvisni od lokacij v možganih, ki so vpletene pri napadu (1). V generaliziranem napadu pa so udeleženi celotni možgani vključno z retikularnim sistemom, kjer pride do nenormalne električne aktivnosti v obeh

hemisferah. Za to vrsto napada je značilna takojšnja izguba zavesti. Poznamo dve pomembni skupini generaliziranih napadov, tonično-klonične ter absenčne, ostali napadi pa so mioklonični, tonični, atonični in klonični (1). V preglednici I je prikazana razdelitev epileptičnih napadov po organizaciji Mednarodna liga proti epilepsiji (Angl: International League Against Epilepsy - ILAE).

Tonično-klonični ali »grand mal« napad prepoznamo po začetni tonični fazi, ki vključuje močno krčenje celotne muskulature, prenehanje dihanja ter izgubo zavesti. Začetnemu krčenju sledi serija hudih in usklajenih trzajočih gibov telesa, ki počasi izzvenijo (1). Pri absenčnih ali »petit mal« napadih, ki so lahko tipični in atipični, pride do kratkotrajne izgube zavesti. Tipični absenčni napadi so bolj pogosti pri otrocih in se pogosto začnejo s spremembo obrazne mimike, ki ji sledi strmenje v prazno (okrog 10 sekund). Oseba po kratki izgubi zavesti nadaljuje z aktivnostjo, ki jo je izvajala pred napadom in se samega napada ne zaveda. Atipični absenčni napadi trajajo dlje (tudi nekaj minut) in lahko vključujejo klonične in avtomatične gibe. Pri miokloničnih napadih pride do nenadnih, kratkih trzljajev, ki so lahko prisotni po celotnem telesu ali pa so omejeni na določeno področje, kot sta obraz in vrat. Pri teh napadih zaradi kratkega trajanja ne pride do izgube zavesti (8).

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

- ❖ 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**

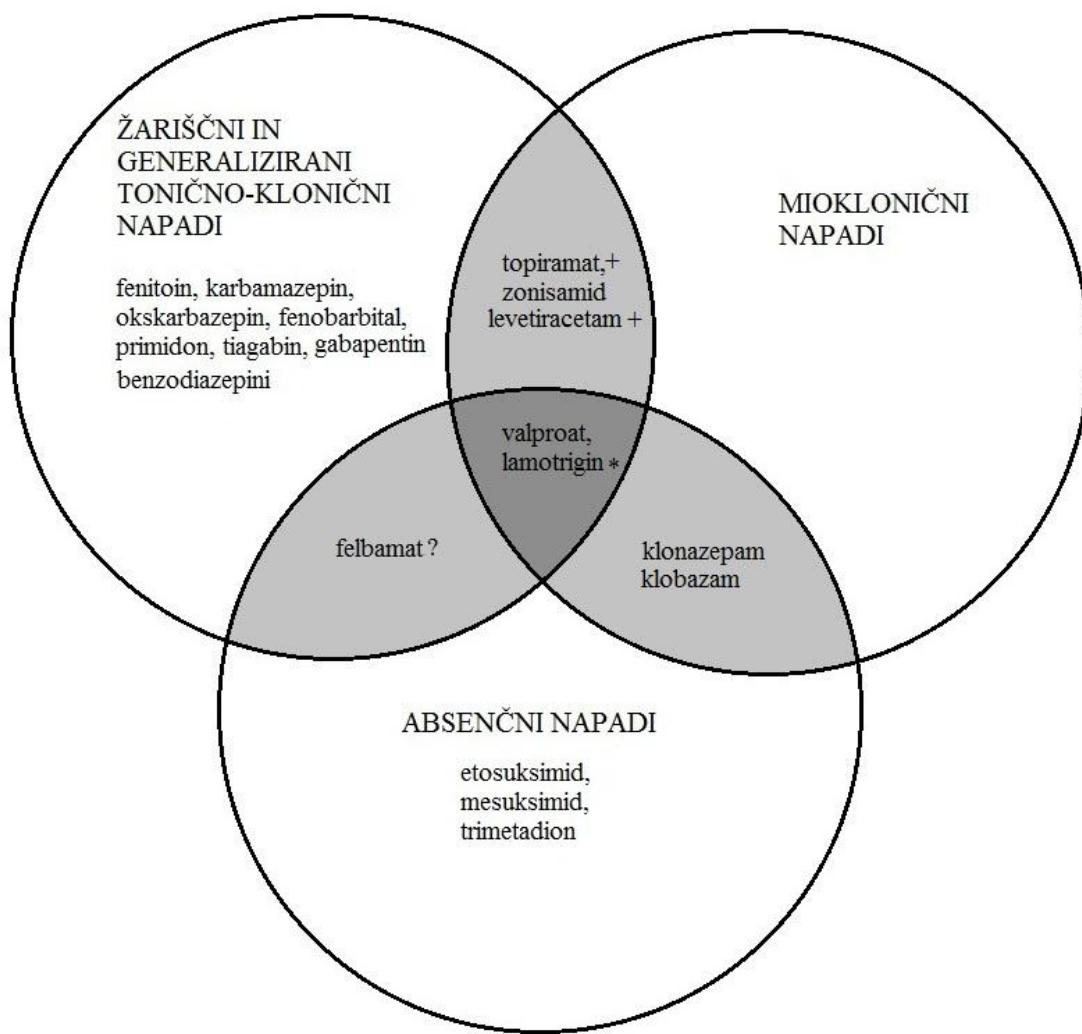
1.2. PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE

Protiepileptične učinkovine (PEU) se uporabljajo za preprečevanje in nadzorovanje epileptičnih napadov, poleg tega pa se uporabljajo tudi za preprečevanje konvulzij, ki niso epileptične narave (1, 8). Oseba, ki ima napad prvič, ni nujno deležna takojšnjega zdravljenja s PEU, temveč je zdravljenje odvisno od ocene, ali je tveganje nadaljnih napadov večje od tveganja zdravljenja. Če pa pride do odločitve o zdravljenju, je izbira PEU odvisna predvsem od učinkovitosti za določen tip epilepsije in potencialnih neželenih učinkov (9). Slika 1 shematično prikazuje uporabo PEU pri zdravljenju različnih epileptičnih napadov. Namen zdravljenja je preprečiti nadaljnje napade, ohraniti kakovost življenja z zdravilom, ki ima čim manj neželenih učinkov (10). Zdravljenje se začne z eno samo PEU, katere odmerek postopno povečujemo, dokler napadi niso pod kontrolo ali neželeni učinki postanejo neprenosljivi. V tem primeru je potrebno prvo učinkovino postopno ukiniti in zamenjati z drugo (9, 10).

Če pri bolniku z dvema zaporednima zamenjavama dobro prenosljivih PEU ne dosežemo ustrezne kontrole napadov, govorimo o trdovratni epilepsiji, ki jo ILAE definira kot neuspeh dveh skrbno izbranih zadostno preskušanih in prenosljivih PEU pri zaustavitvi napadov (11). Takrat preidemo na terapijo z dvema ali več PEU hkrati in pri tem izberemo kombinacijo PEU, ki ima različne mehanizme delovanja, da se izognemo aditivnosti neželenih učinkov. Ob tem moramo biti pozorni na vpliv nekaterih PEU na presnovo drugih PEU in morebitno potrebo po prilagajanju odmerkov teh učinkovin z namenom vzdrževanja plazemske koncentracije v terapevtskem oknu. V takšnem primeru je priporočljivo spremljanje plazemske koncentracije zdravil. V kolikor politerapija ni uspešna, se zdravljenje nadaljuje s tisto PEU oziroma kombinacijo, ki zagotavlja najboljše razmerje med nadzorom napadov ter neželenimi učinki (9).

Pri odraslih in mladostnikih je prognoza novo odkrite epilepsije dokaj dobra, saj pri okrog 50 % primerov zadostuje prva izbrana PEU z nizkim oziroma srednjim odmerkom. Pri naslednjih 10 % pacientov je terapija uspešna ob prvi oziroma drugi zamenjavi PEU. 30 % pacientov, ki se na prvi dve zamenjavi PEU ne odziva, razvije trdovratno epilepsijo (10).

PEU z idealnimi lastnostmi bi morala popolnoma ustaviti napade v odmerkih, ki ne povzročajo sedacije ali drugih neželenih učinkov v centralnem živčnem sistemu (CŽS).



Slika 1: Uporaba PEU pri zdravljenju različnih epileptičnih napadov (8, 9, 10).

* Lamotrigin lahko poslabša mioklonične napade v nekaterih primerih.

+ Levetiracetam lahko uporabljamo kot alternativo pri zdravljenju sindroma otroške absenčne epilepsije.

+ Topiramat je zdravilo druge izbire pri zdravljenju absenčnih napadov.

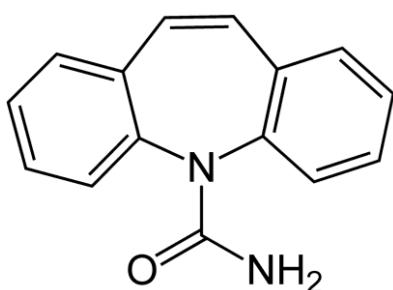
? Felbamat je verjetno učinkovit pri zdravljenju absenčnih napadov

Optimalna PEU bi morala biti dobro prenosljiva in zelo učinkovita proti različnim tipom napadov. Po peroralnem dajanju bi moral biti učinek dolgotrajen (8). Prav tako bi se morala popolnoma absorbirati in izkazovati linearno kinetiko z dolgim razpolovnim časom. Takšna PEU bi se morala tudi minimalno vezati na plazemske proteine ter se izločati samo skozi ledvica, pri čemer bi morali biti odsotni aktivni presnovki (10).

PEU, ki so trenutno na voljo, imajo različne mehanizme delovanja na ekscitatornih in inhibitornih sinapsah. Tako naj bi karbamazepin in levetiracetam delovala zaviralno na ekscitatornih sinapsah, medtem ko naj bi topiramat deloval tako inhibitorno na ekscitatornih sinapsah kot tudi agonistično na inhibitornih sinapsah (12).

1.2.1. Karbamazepin

Karbamazepin (CBZ) je v 60-ih letih prejšnjega stoletja prišel v uporabo kot PEU in je še vedno najbolj uporabljana učinkovina za zdravljenje žariščnih epileptičnih napadov s sekundarno generalizacijo ali brez (10, 11). Uporablja se tudi za zdravljenje drugih stanj, kot je nevropatska bolečina in manično depresivna bolezni (1). Glavni mehanizem delovanja CBZ je na napetostno odvisnih natrijevih kanalčkih v možganih. CBZ stabilizira in podaljša neaktivno stanje natrijevih kanalčkov po aktivaciji ter posledično prepreči hitra, ponavljajoča električna proženja in njihovo širjenje pri napadu (8). Slika 2 prikazuje strukturo CBZ.

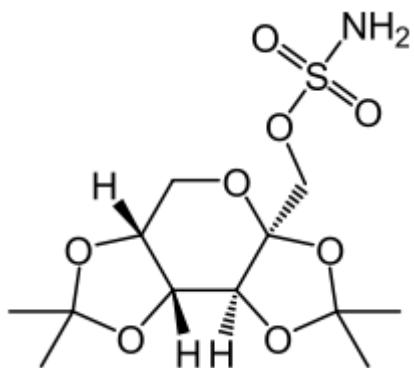


Slika 2: Struktura karbamazepina (13).

CBZ se po peroralnem dajanju počasi in neenakomerno absorbira iz gastrointestinalnega trakta, njegova biološka uporabnost pa je od 85 do 100 % (9). Se dobro veže na plazemske proteine, predvsem albumin, saj odstotek vezave znaša od 70 do 80 %. Pri monoterapiji je njegova optimalna serumska koncentracija 4-12 mg/L (17-51 µmol/L) (14). Njegova plazemska razpolovna doba se po enem odmerku med posamezniki zelo razlikuje (od 18 do 55 ur), zaradi močne avtoindukcije jetrnih encimov pa se po večkratnih odmerkih lahko občutno zmanjša in znaša od 8 do 24 ur (9, 14). V veliki meri se presnavlja v jetrih preko izoencimov citokromov P450 CYP3A4 in CYP2C8 (10). Njegov glavni aktivni presnovek je karbamazepin-10,11-epoksid, katerega koncentracija predstavlja od 25 do 50 % uporabljenega odmerka in je hkrati odgovorna za učinkovitost in toksičnost CBZ (15). CBZ oziroma njegovi presnovki lahko povzročijo motnje pri pomnjenju, pogosto so opazili hiponatremijo, pri 10 do 20 % ljudi pa moramo zdravljenje prekiniti zaradi preobčutljivostne reakcije (10, 16).

1.2.2. Topiramat

Topiramat (TOP) je sulfamatno substituiran monosaharid fruktoze (slika 3), ki ima širok spekter protiepileptičnega delovanja (8). Uporablja se pri dodatni terapiji žariščnih napadov z ali brez sekundarne generalizacije, napadih povezanimi z Lennox-Gastaut-ovim sindromom in pri generaliziranih tonično-kloničnih napadih. Lahko se uporablja tudi v monoterapiji pri pacientih z novoodkrito epilepsijo, ki imajo generalizirane tonično-klonične ali žariščne napade. Uporablja se tudi za preprečevanje migrene (9). Mehanizem delovanja ni dobro poznan, vendar predvidevajo da TOP deluje na različne tarče. Deluje kot inhibitor natrijevih in kalcijevih L kanalčkov, poveča učinek γ -aminomaslene kislino (GABA) z alosterično modulacijo GABA_A receptorja. Verjetno je tudi antagonist na receptorjih AMPA (α -amino-3-hidroksi-4-izoksazol propanojska kislina) in kainične kisline ter s tem ovira ekscitatorno delovanje glutamata. Je tudi šibak inhibitor encima karbonska anhidraza, ki katalizira pretvorbo ogljikovega dioksida in vode v bikarbonat in proton ter obratno (8, 12).

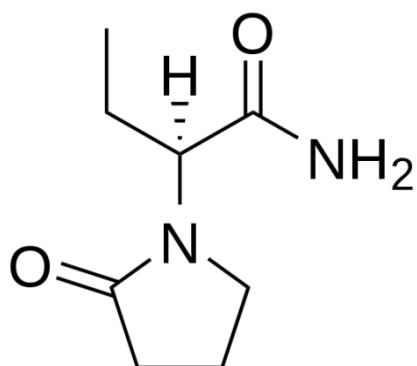


Slika 3: Struktura topiramata (13).

Po peroralnem dajanju se TOP hitro absorbira z biološko uporabnostjo od 80-95 % (8). na Na plazemske proteinese veže v obsegu od 9 do 17 % (9). Običajna serumska koncentracija TOP pri pacientih, ki prejemajo terapevtske odmerke, znaša od 5 do 20 mg/L (15-59 μ mol/L) (14). Večina učinkovine (70-80 %) se izloča skozi ledvica v nespremenjeni obliki, v prisotnosti induktorjev jetrnih encimov (npr. kombinacija s CBZ) pa se presnova TOP poveča (8). TOP lahko vpliva na kognitivno funkcijo, upad telesne teže, pri bolnikih, ki so že imeli ledvične kamne, pa poveča tveganje za njihov ponoven nastanek tudi do 10-krat (10).

1.2.3. Levetiracetam

Levetiracetam oziroma aktivni enantiomer S-(-)-levetiracetam (LEV) je analog piracetama in se uporablja v dodatni terapiji žariščnih napadov, z ali brez sekundarne generalizacije, pri bolnikih starejših od 4 let ter v monoterapiji pri bolnikih starejših od 16 let (1, 9, 17). Uporabljamo ga tudi pri preprečevanju miokloničnih napadov ter kot alternativo pri zdravljenju sindroma otroške absenčne epilepsije (9, 10). Mehanizem njegovega delovanja ni povezan z nobenim do danes poznanim ekscitatornim oziroma inhibitornim mehanizmom epilepsije, čeprav izgleda, da ima LEV učinke tudi na GABA_A receptor (8, 11). Z vezavo na sinaptični vezikularni glikoprotein 2A, ki naj bi bil udeležen pri mehanizmu sproščanja ekscitatornega nevrotransmiterja glutamata, ima LEV pomembno vlogo tudi pri preprečevanju začetka napadov (12). Slika 4 prikazuje strukturo LEV.



Slika 4: Struktura levetiracetama (13).

LEV se hitro in popolnoma absorbira iz gastrointestinalnega trakta s skoraj 100 % biološko uporabnostjo. Njegova vezava na plazemske proteine je minimalna (manj kot 10 %) (8, 9). Referenčne serumske koncentracije pri bolnikih s terapevtskimi odmerki so med 12 in 46 mg/L (70-270 µmol/L) (14). Okoli 25 % LEV se presnavlja z hidroksilacijo do neaktivnih presnovkov, ki se skupaj z nespremenjeno oblikov obsegu do 95 % izločajo skozi ledvica (9). Najpogostejsa neželena učinka LEV sta zaspanost in omotica (10).

1.3. OKSIDATIVNI STRES

Reaktivne zvrsti so molekule, ki nastajajo v mitohondriih in peroksisomih tekom normalne aerobne znotrajcelične presnove, kot tudi v vrsti znotrajceličnih encimskih

sistemov. Prav tako lahko nastajajo zaradi zunanjih dejavnikov, kot so ultravijolična svetloba, ionizirajoče sevanje, toksini itd. Njihovo nastajanje je v določeni meri zaželeno, saj nekateri služijo kot signalne molekule ali pri obrambi telesa pred tujki. Pri normalnih pogojih telo oksidante odstranjuje z lastnim obrambnim mehanizmom encimskih in neencimskih antioksidantov, s katerimi prepreči njihovo škodljivo delovanje (18). Oksidativni stres je stanje, ko se ravnotežje med prooksidanti in antioksidanti premakne v prid prooksidantov, kar lahko povzroči poškodbe bioloških makromolekul (19). Nevrodegenerativne bolezni, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, kot tudi nastanek epileptičnih napadov, so povezani z oksidativnim stresom (20, 21). Oksidativni stres je lahko posledica povečane tvorbe reaktivnih zvrsti ali znižanega nivoja antioksidantov (22).

1.3.1. Reaktivne zvrsti

Reaktivne zvrsti (RS) imenujemo skupino radikalov (snovi, ki imajo v strukturi vsaj en nesparjen elektron) in ne-radikalov, ki lahko oksidirajo biološke molekule. Razdelimo jih na reaktivne kisikove zvrsti (ROS), reaktivne dušikove zvrsti in reaktivne klorove zvrsti, poznamo pa še številne druge (23). V preglednici II so naštete pomembnejše RS.

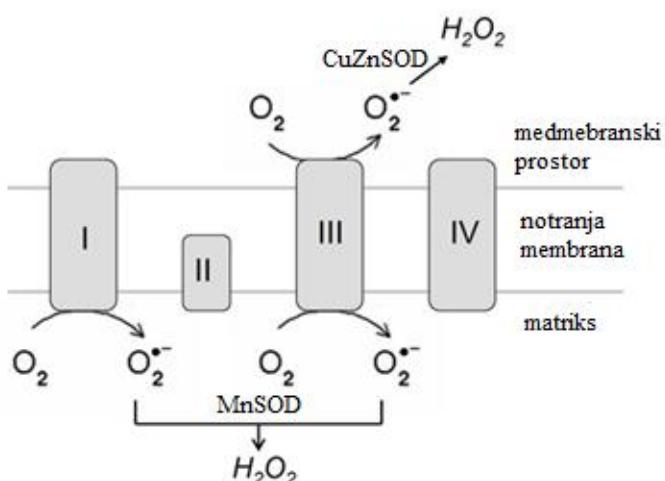
Preglednica II: Pomembnejše reaktivne zvrsti (24).

radikali	Ne-radikalske reaktivne zvrsti
Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	
Superoksidni, $\text{O}_2^{\cdot -}$	Singletni, ${}^1\text{O}_2$
Hidroperoksilni, HOO^{\cdot}	Ozon, O_3
Hidroksilni, HO^{\cdot}	Vodikov peroksid, H_2O_2
Peroksilni, ROO^{\cdot}	Peroksinitrit, $\text{ONOO}^{\cdot -}$
Alkoksilni, RO^{\cdot}	Hipoklorna kislina, HOCl
Reaktivne dušikove zvrsti	
Dušikov oksid, ON^{\cdot}	Dušikovi oksidi, N_2O_3 in N_2O_4
Dušikov dioksid, $\text{O}_2\text{N}^{\cdot}$	Nitrozil anion, $\text{NO}^{\cdot -}$
	Nitrozil kation, NO^{+}
	Alkilperoksinitrit, ROONO

Mitohondriji

Mitohondriji imajo pomembne funkcije v celici, kot so produkcija adenozin-5'-trifosfata (ATP), biosinteza presnovkov in nevrotransmiterjev (v CŽS), homeostaza kalcija in kontroliranje celične smrti. So pa tudi glavni vir ROS (25). Oksidativna fosforilacija oziroma mitohondrijska dihalna veriga je proces, kjer nastaja ATP, ki je univerzalni prenašalec energije v biokemijskih procesih. Verigo predstavlja štirje (I-IV) zaporedno nameščeni multiencimski kompleksi, preko katerih potuje tok elektronov od NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) ali reducirane oblike flavin adenin dinukleotida do kisika in s tem proizvajajo elektrokemijski protonski gradient preko mitohondrijske notranje membrane. Encimski kompleks ATP-sintaza nato uporabi protonski gradient za sintezo ATP (26).

Okoli 90 odstotkov vsega kisika v celici se porabi v mitohondriju, predvsem v procesu oksidativne fosforilacije. Pri tem od 1 do 3 % vseh elektronov uide iz dihalne verige, predvsem iz kompleksov I in III (20, 21), kar prikazuje slika 5. Ti elektroni se vežejo na kisik (O_2), kar privede do neprekinjenega nastajanja superoksidnega radikala ($O_2^{\cdot -}$) (22). Ta je relativno nestabilen, z razpolovnim časom nekaj milisekund. Zaradi svojega naboja ne prehaja dobro celične membrane, lahko pa reducira železove ione ali poškoduje proteine encimskih kompleksov dihalne verige (20). Superoksidni radikal nastaja tudi kot normalen produkt encima NAD(P)H oksidaze, ki je odgovoren za aktivacijo obrambnega mehanizma proti vdoru patogenov (27). Prav tako je $O_2^{\cdot -}$ stranski produkt ksantinske oksidaze, ki razgrajuje hipoksantin v ksantin, tega pa naprej do sečne kisline (28). $O_2^{\cdot -}$ dismutira v H_2O_2 preko encima superoksid dismutaza (SOD) (21).

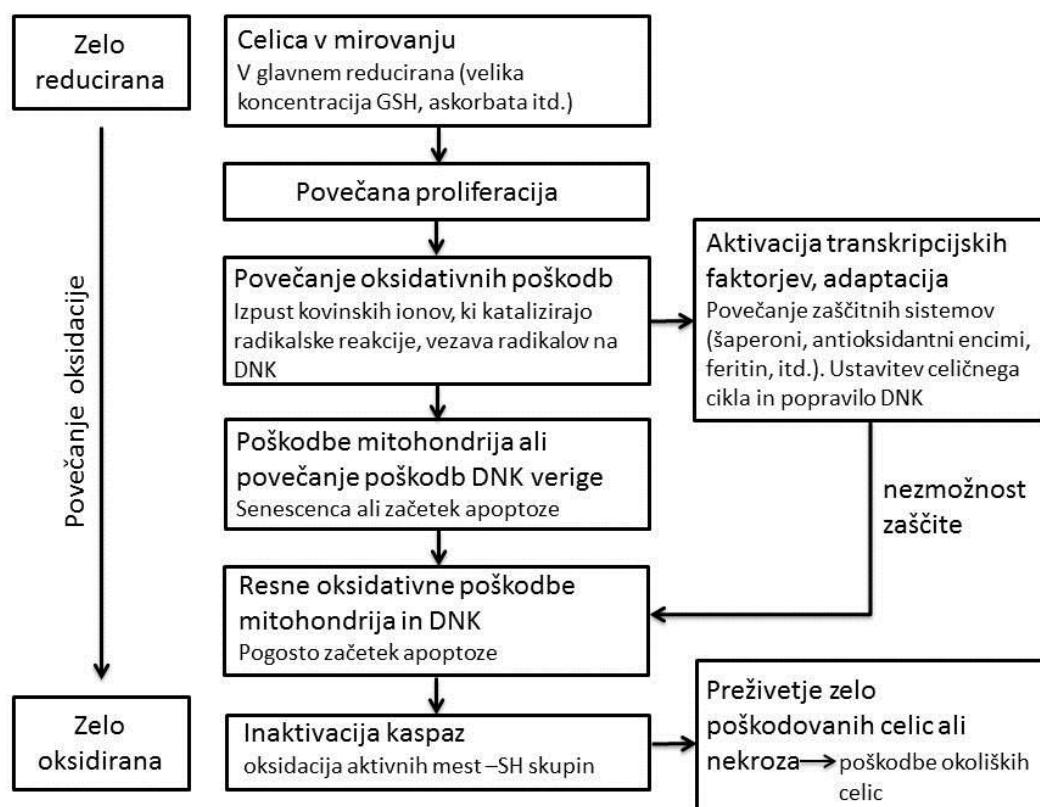


Slika 5: Shema mitohondrijskih encimskih kompleksov dihalne verige in mesta uhajanja elektronov (26).

Molekula H_2O_2 ne vsebuje neparnih elektronov in ni radikal, kar pa ne pomeni, da ni nevarna za organizem. Po strukturi je podobna molekuli vode in zelo dobro prehaja membrane, verjetno skozi akvaporinske kanale (22). Preko Fentonove reakcije, ki poteka med ioni prehodnih kovin (Fe^{2+} in Cu^+) in H_2O_2 , nastane hidroksilni radikal HO^\cdot , ki je eden izmed najbolj škodljivih radikalov za celice. Je zelo nestabilen, z življenjsko dobo manj kot 1 nanosekunda, in lahko poškoduje deoksiribonukleinsko kislino (DNK), ribonukleinsko kislino, proteine, lipide in membrane organelov (20, 21, 27). Glavni mehanizmi odstranjevanja H_2O_2 potekajo preko encimov katalaza, glutation peroksidaza in peroksiredoksinov (29).

1.3.1.a. Oksidativne poškodbe

Različne celice imajo različno toleranco do oksidativnega stresa. Stopnja oksidativnega stresa, torej razmerje med oksidanti in antioksidanti, ima različen vpliv na usodo celic. Na sliki 6 je prikazano, kako se celice odzovejo na različne stopnje oksidativnega stresa (30).



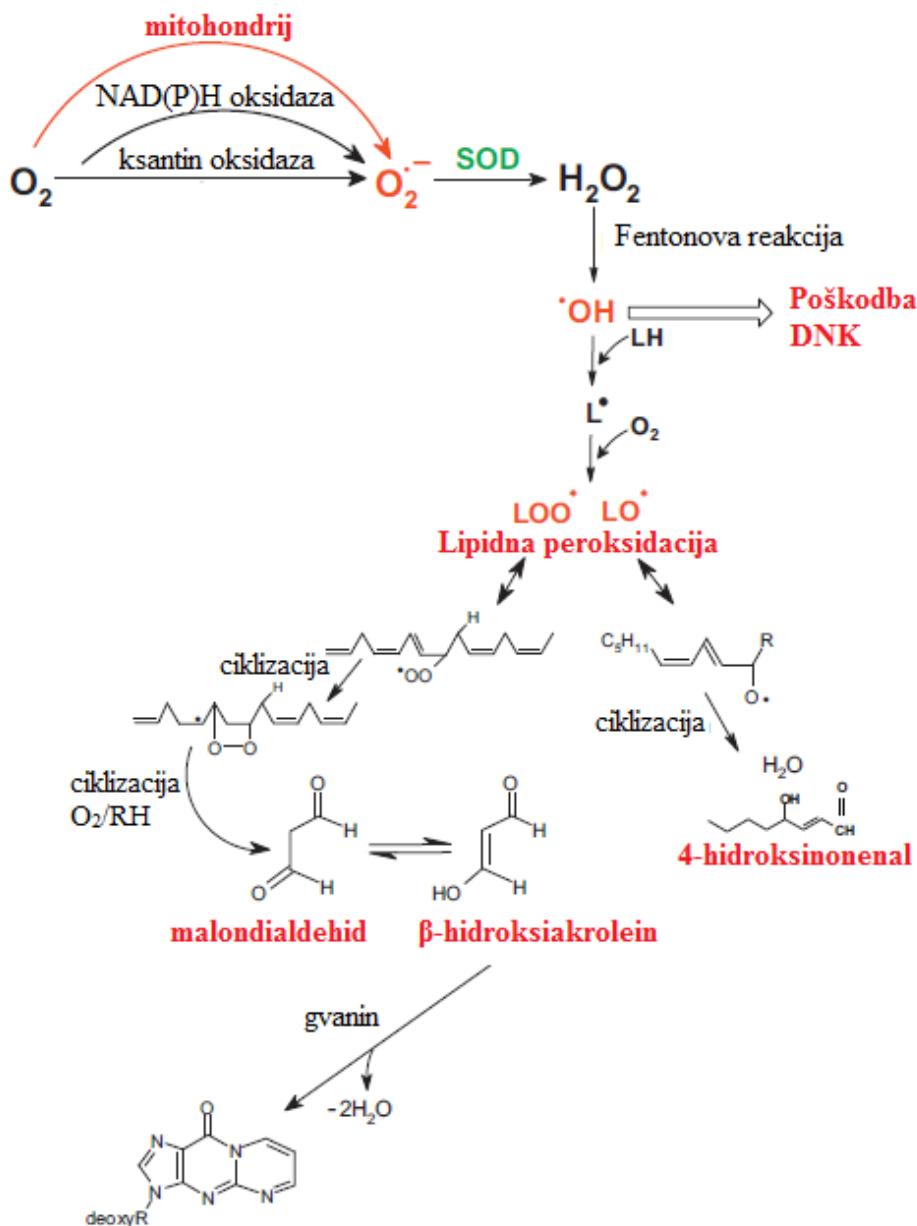
Slika 6: Vpliv povečanja oksidativnega stresa na funkcijo celic (30).

1.3.1.b. Lipidna peroksidacija

Membrane, ki obkrožajo celice in organele vsebujejo velike količine fosfolipidov, ki so sestavljeni iz večkratnenasičenih maščobnokislinskih stranskih verig. Lipidna peroksidacija je oksidativna razgradnja večkratnenasičenih maščobnih kislin (VNMK) (30). Možgani so zaradi visoke vsebnosti VNMK, visoke porabe kisika in nizke vsebnosti antioksidantov še posebej dovetni za poškodbe, ki jih povzročajo produkti lipidne peroksidacije (21). Tudi mitohondriji vsebujejo veliko VNMK in so hkrati vir nastanka ROS, kar jih naredi zelo dovetne za lipidno peroksidacijo (25). Lipidna peroksidacija lahko zmanjša membransko fluidnost, poveča propustnost membrane za snovi, ki normalno ne prehajajo membrane, ter povzroči poškodbe membranskih proteinov, inaktivira encime in ionske kanale (30).

Reaktivne zvrsti lahko privedejo do iniciacije lipidne peroksidacije bodisi z adicijo ali z odstranitvijo vodikovega atoma z metilenske (-CH₂-) skupine. V obeh primerih pride do nastanka ogljikovega radikala, ki reagira s kisikom, ki se zaradi hidrofobnosti kopči v membranah. V tej fazi, ki jo imenujemo faza propagacije, pride do nastanka peroksilnega radikala (ROO[•]), ki lahko odstrani vodikov atom s sosednje VNMK, lahko pa pride do premestitve radikala in ciklizacije ter nastanka endoperokksida, ki nato reagira s kisikom in ustvari nov peroksilni radikal. Eden izmed končnih produktov pa je malonaldehid (27, 30). Pomemben produkt lipidne peroksidacije je tudi 4-hidroksi-2-nonenal. Slika 7 shematično prikazuje potek lipidne peroksidacije.

Malonaldehid (MDA) nastaja predvsem pri lipidni peroksidaciji VNMK, kot so linolenska, arahidonska in dokozaheksanojska kislina. Obstaja lahko v različnih oblikah, ki so odvisne od pH. MDA lahko reagira z bazami DNK verige, predvsem gvaninom, kar lahko privede do mutagenosti. Prav tako lahko ustvari prečne povezave med DNK in proteini, posledice česar je potrebno še raziskati (31). V celicah se MDA relativno hitro presnavlja do acetata preko encima aldehydna dehidrogenaza (30).



Slika 7: Shema poteka lipidne peroksidacije od vira elektronov do končnih produktov (27).

1.3.2. Antioksidanti

Antioksidant je vsaka snov, ki v nizkih koncentracijah, v primerjavi s koncentracijo oksidirajočega substrata, značilno zakasni ali prepreči oksidacijo tega substrata. Organizem posreduje različne antioksidantne mehanizme, ki omogočajo lovljenje in omejevanje nastajanje ROS, vendar niso 100-odstotno učinkoviti. Ti mehanizmi so zapleteni in vključujejo tako endogene kot tudi s prehrano vnesene molekule (22).

1.3.2.a. Encimski antioksidanti

Poznamo tri najpomembnejše encimske antioksidante: superoksid dismutazo (SOD), glutation peroksidazo (GP) in katalazo (KAT). SOD je skupina treh izoencimov, ki se nahajajo v različnih predelih celice in vsi katalizirajo dismutacijo O_2^- v H_2O_2 , s čimer zmanjšujejo tveganje za nastanek hidroksilnega radikala. Encim KAT naprej razgradi H_2O_2 na vodo in kisik. Encim GP preko oksidacije glutationa prav tako razgradi H_2O_2 do H_2O , vendar z veliko večjo afiniteto kot CAT, poleg tega sodeluje tudi v potek odgovornih za detoksifikacijo lipidnih peroksilnih radikalov (ROO^\cdot) (21, 28). Zaradi specifičnosti in velike afinitete do RS ter zmožnosti povečanja delovanja so encimski antioksidanti najbolj pomembna obramba pred RS (19).

1.3.2.b. Ne-encimski antioksidanti

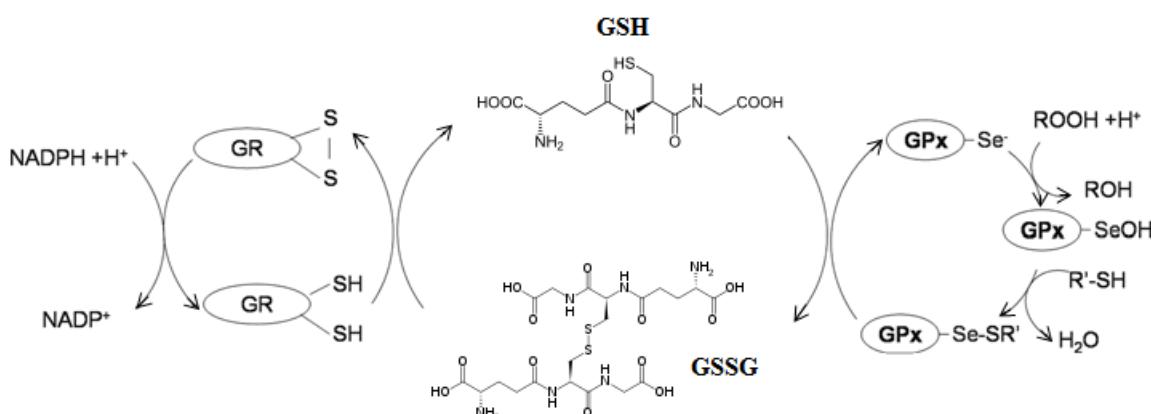
Poleg encimskih antioksidantov so pri lovljenju RS pomembne tudi nizkomolekularne spojine. Organizem jih lahko proizvaja *in vivo* in/ali jih pridobi iz prehrane. Ne-encimski antioksidanti so glutation, α -tokoferol, vitamin C, β -karoten, flavonoidi in številne druge molekule, ki so prisotne v različnih predelih celic in imajo različne mehanizme delovanja, kar poveča njihovo učinkovitost (20, 28).

Glutation

Reduciran glutation (GSH) je vodotopen tripeptid, sestavljen iz aminokislin glutamata, cisteina in glicina. Vse celice so sposobne sintetizirati GSH z dvostopenjskim procesom, pri katerem v prvi stopnji sodeluje encim γ -glutamilcistein sintetaza (γ -GCS). Ekspresija in aktivnost tega encima je pomemben dejavnik koncentracije GSH v celicah (32). GSH ima različne esencialne funkcije v telesu, med drugimi deluje tudi neposredno kot dober lovilec ROS in radikalov ter s tem preprečuje povečanje oksidativnega stresa (22, 28). Poleg tega se GSH preko selenoproteinskega encima GP oksidira in preko disulfidne vezi pride do nastanka dimera, ki mu pravimo oksidirani glutation (GSSG) (28). Normalno je v citoplazmi celic sesalcev razmerje med GSH/GSSG od 50 do 100, to pa se pri oksidativnem stresu zmanjša zaradi zmanjšane koncentracije GSH in povišane koncentracije GSSG (33). Encim glutation reduktaza (GR) v prisotnosti donorju elektronov NADPH pretvori GSSG v GSH (28, 33). Pri močnem oksidativnem stresu pride do porabe NADPH, zaradi česar se koncentracija GSSG v citoplazmi poveča. Odvečni GSSG celica

črpa v ekstracelularni prostor ali pa GSSG tvori mešane disulfide z drugimi tioli (28). Slika 8 shematično prikazuje proces oksidacije in redukcije GSH.

Merjenje plazemskih koncentracij GSH in GSSG je pogosto uporabljena metoda zaznavanja oksidativnega stresa, podana kot koncentracija GSH, GSSG ali razmerja GSH/GSSG. Glutation (GSH in GSSG) je dober indikator sistemskega oksidativnega stanja ter tveganja za nastanek bolezni (28).



Slika 8: Shema prenosa elektronov od NADPH do GP preko GR in GSH (34).

1.4. EPILEPSIJA IN OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres in okvara mitohondrijev nista samo posledica epileptičnih napadov ampak lahko prispevata tudi k samemu nastanku epilepsije, t.i. epileptogenezi (25). Nastanek napadov je namreč povezan s spremembami v znotrajcelični koncentraciji antioksidantov in oksidantov (21). Možgani so še posebej občutljivi na poškodbe povzročene z oksidativnim stresom zaradi številnih mitohondrijev, velike količine VNMK in kovinskih ionov ter visoke porabe kisika. Okvara mitohondrijske dihalne verige zaradi ROS lahko privede do od kalcija odvisne depolarizacije mitohondrijske membrane, čemur sledi nepopolna poraba kisika, zmanjšana produkcija ATP in nastanek dodatnih ROS (25). To lahko povzroči začarani krog nastajanja ROS, ki vodi do oksidativnih poškodb celice (25, 35).

Zaradi povečanega oksidativnega stresa v možganih lahko pride do poškodb glutamatnih transporterjev ter glutamat sintetaze, zaradi česar se zmanjša privzem in razgradnja

glutamata. Zaradi povečane zunajcelične koncentracije glutamata lahko nastopi zvišana vzdraženost nevronov (25).

Pri določenih bolnikih so odkrili mutacije mitohondrijske DNK, ki vplivajo predvsem na sintezo proteinov dihalne verige (35). Zaradi zmanjšane koncentracije ATP lahko pride do sprememb v homeostazi kalcija. To povzroči povečano vzdraženost nevronov in sinaptičen prenos, kar je zelo povezano z nastankom epileptičnih napadov (20).

Modulacija ionskih kanalov poteka preko različnih faktorjev. Sprememba v redoks potencialu, torej sprememba v razmerju med oksidanti in antioksidanti, modulira različne ionske kanale, med drugimi nikotinske, glicinske in GABA_A receptorje. Posledica modulacije je lahko povečana vzdraženost nevronov, kar poveča verjetnost za nastanek napadov (25).

1.5. PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA IN OKSIDATIVNI STRES

Prvotna vloga PEU je preprečitev epileptičnih napadov, vendar ostaja izliv, kako preprečiti epileptogenezo ter posledično pridobljeno epilepsijo (20). Poškodbe tkiva in celic, ki so posledica oksidativnega stresa, lahko igrajo pomembno vlogo pri začetku in napredovanju epilepsije, zato bi lahko zdravljenje, ki bi omililo oksidativni stres, zmanjšalo poškodbe in spremenilo potek nastanka bolezni. Veliko PEU starejše generacije se presnavlja do reaktivnih presnovkov, ki imajo sposobnost kovalentne vezave na biološke makromolekule. Zato lahko PEU poleg preprečitve napadov izzovejo sistemsko toksičnost preko kovalentne vezave njihovih presnovkov na proteine in druge pomembne biološke molekule (36).

Eksperimentalni modeli epileptogeneze so pokazali, da je bil CBZ praktično neučinkovit pri zmanjšanju epileptogeneze, medtem ko so novejše učinkovine, kot je LEV, bolj učinkovite. V eksperimentalnem modelu na podganah, pri katerih so izvali epileptične napade, je LEV celo ščitil pred epileptogenezo, medtem ko je bil TOP neučinkovit (20).

Uporaba PEU z aromatičnim obročem, med katere spada tudi CBZ, je povezana s sicer redko idiosinkratsko hepatotoksičnostjo, ki je v določenih primerih lahko tudi usodna. Za to je odgovorna akumulacija epoksid, ki ga encim epoksid hidrolaza ni sposoben v zadostni meri odstraniti (37). Po predlaganem mehanizmu toksičnosti presnovki CBZ povzročijo povečanje koncentracije ROS (38).

2. NAMEN DELA

Cilj naloge je opredeliti vpliv časa izpostavljenosti, koncentracije in vrste protiepileptičnih učinkovin na nastanek oksidativnega stresa v celični liniji limfocitov B. V ta namen bomo izpostavili celice vodikovemu peroksidu in trem protiepileptičnim učinkovinam: karbamazepinu, topiramatu in levetiracetamu. Vodikov peroksid bomo uporabili za izvedbo pozitivne kontrole, s katero bomo potrdili ustreznost izbranih spojin (MDA, GSH in GSSG) za ocenjevanje oksidativnega stresa v celicah. Koncentracijo spojin bomo merili ob dveh časovnih točkah in sicer po enourni in 72-urni inkubaciji celic v prisotnosti H₂O₂.

Celice bomo izpostavili v 48 urnih intervalih dvema koncentracijama protiepileptičnih učinkovin: CBZ in TOP v koncentracijah 10 mg/L in 50 mg/L, in LEV v koncentracijah 25 mg/L in 100 mg/L. Prav tako bomo celice izpostavili kombinaciji PEU in sicer CBZ in TOP v koncentracijah 10 mg/L + 10 mg/L ter 50 mg/L + 50 mg/L ter CBZ in LEV v koncentracijah 10 mg/L + 25 mg/L ter 50 mg/L + 100 mg/L.

Med inkubacijo celic bomo spremljali živost in število celic s hemocitometrom pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Živost oz. število celic bomo tudi ocenili s pomočjo testa MTS.

V celicah bomo določali koncentracijo MDA z metodo DNPH, ki jo bomo povzeli iz literature, za analizo pa bomo uporabili predhodno razvito metodo na LC-MS/MS. Prav tako bomo določali GSH in GSSG v celicah z metodo, ki jo bomo povzeli iz literature. Metodo LC-MS/MS bomo razvili sami.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Standardi

Standardi	Proizvajalec
Goveji serumski albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Malonaldehid tetrabutilamonijeva sol	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Karbamazepin	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
L-glutation oksidirani	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
L-glutation reducirani	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
2,4-dinitrofenilhidrazin, raztopina s fosforo kislino	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
Cell Titer 96® AQueous One Solution Reagent (reagent MTS)	Promega, Madison, WI, ZDA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent koncentrat	Bio-Rad, Nemčija
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija

Fetalni goveji serum (FBS)	Invitrogen; Auckland, Nova Zelandija
Ficoll-Paque Plus (fikol)	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
Mravljična kislina, 100 %	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Natrijev hidroksid	Fluka Analytical; St. Louis, ZDA
Ocetna kislina, 100 % (Ledocet)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Raztopina tripanskega modrila, 0,4 % (angl. Trypan Blue Solution)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Triklorocetna kislina (TCA)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
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 1640, HEPES Modification 50 ml FBS 5,5 ml L-glutamin 5,5 ml antibiotik/antimikotik 100× (10 000 enot penicilina, 10 mg streptomicina in 25 µg amfotericina B na mL)

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. Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Analitična tehnica	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	
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
Hemocitometer	Brand Neubauer (Blau Brand)
Hladilnik (+5 °C)	LTH; Škofja Loka, Slovenija

Kolone:

- Kinetex C18, $50 \times 2,1$ mm, $5 \mu\text{m}$ Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA

- Kinetex PFP; 100×3 mm, $2,6 \mu\text{m}$

Injekcijske igle FINE-JECT	Henke Sass Wolf; Tuttlingen, Nemčija
----------------------------	--------------------------------------

Inkubator	HERAUS Holding GmbH; Hanau, Nemčija
-----------	--

Inserti za viale $0,1$ 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
------------------------------------	---

LC-MS/MS Sistem Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jeatstream® LC/MS	Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA
--	--

Mešalo	LAB DANCER, IKA; Staufen, Nemčija VIBROMIX 10, Tehnica; Železniki, Slovenija
--------	--

Mikrotiterski čitalec Safire ² TM Genios	Tecan, Genios; Zürich, Švica
---	------------------------------

Mikrotitrske ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 24 in 96 vdolbinami)	TPP; Trasadingen, Švica
--	-------------------------

Multikanalna pipeta ($300 \mu\text{L}$)	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 mikrofiltrrom, 500 mL	TPP; Trasadingen, Švica
--	-------------------------

Plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke:	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
--	------------------------------

$0,5$ mL

$1,5$ mL

Serološke pipete za enkratno uporabo ($5, 10, 25$ in 50 mL)	TPP; Trasadingen, Švica
---	-------------------------

Steklovina (steklene čaše za 25 in 250 mL;	
--	--

steklene bučke za 5, 10, 25, 50, 100 in 250 mL)

Stresalnik VIBROMIX 403 EVIT	Tehnica; Železniki, Slovenija
Škatle za zamrzovanje vzorcev	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Tehnica AG 245	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
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

3.1.6. Humana celična linija Ramos

RAMOS (ACC 603) je celična linija humanega Burkittovega limfoma, pridobljena iz peritonealne tekočine 3-letnega dečka z Burkittovim limfomom leta 1972. Celice so Epstein-Barr virus negativne in izražajo nezreli fenotip limfocitov B (39).

3.2. METODE DELA S CELICAMI

Pri delu s celicami je potrebno zagotoviti aseptične pogoje. Zato smo poskuse 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 kot tudi vse reagente, topila in opremo, ki smo jih potrebovali pri delu (pipete, nastavke za pipete, serološke pipete, centrifugirke, mikrocentrifugirke), razkužili s 70-odstotnim etanolom. Pri delu smo uporabljali zaščitne rokavice. Nastavke za pipete in mikrocentrifugirke smo predhodno avtoklavirali in jih posušili v sušilniku.

3.2.1. Izolacija perifernih mononuklearnih celic iz venske krvi

V sodelovanju z Nevrološko kliniko Kliničnega centra Ljubljana se izvaja klinična študija na prostovoljcih, ki se zdravijo za epilepsijo. V krvnih vzorcih bolnikov bodo določali kazalnike oksidativnega stresa, med drugimi tudi MDA in GSH, ter spremljali koncentracijo PEU v krvni plazmi.

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

Epruveto Vacutainer® z dodanim EDTA s polno krvjo smo centrifugirali 10 min na 3000 obratih/min. Epruveto smo pod acceptičnimi pogoji prenesli v LAF komoro ter previdno odpipetirali plazmo v 1,5 mL mikrocentrifugirke in jih zamrznili pri -80°C. Krvne celice smo nato redčili v razmerju 1:1 s PBS in jih kvantitativno prenesli z 1 mL avtomatsko pipeto v konusno centrifugirko (15 mL), v katero smo predhodno odmerili 2 mL fikola. Pri tem smo pazili, da smo kri nanesli na fikol tako da se med seboj nista mešala. Dobro zaprte centrifugirke smo centrifugirali 22 minut pri 2200 obratih/min brez zavore. Plast PBMC, ki se je nahajala neposredno nad plastjo fikola, smo s sterilno pipeto prenesli v nove centrifugirke (15 mL). Zaradi zaostankov fikola, ki so se ob tem prenesli, smo celično suspenzijo takoj redčili z gojiščem do oznake (do 15 mL) in centrifugirali 7 minut pri 1700 obratih/min z zavoro. Supernatant smo odstranili ter celice sprali z 1,6 mL PBS, odvzeli 10 µL suspenzije za kasnejše štetje celi in prenesli 1,5 mL v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Celice smo nato centrifugirali 5 min pri 1700 obratih/min z zavoro. Supernatant smo odstranili ter celice zamrznili pri -80 °C za kasnejšo analizo.

3.2.2. Štetje celic

Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra pod invertnim mikroskopom. Ta metoda omogoča štetje celic v znanem volumnu medija in izračun koncentracije celic (št. celic/mL). V sterilnih pogojih smo 10 µL celične suspenzije prenesli v mikrocentrifugirko. Dodali smo 10 µL raztopine tripanskega modrila, ki obarva poškodovane in mrtve celice modro. Zmes smo dobro premešali 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:

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

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:

$$\frac{\text{žive celice} (\%)}{\text{št. živih in mrtvih celic}} = \frac{\text{št. živih celic}}{\text{št. živih in mrtvih celic}} \times 100\%$$

3.2.3. Gojenje in subkultiviranje celic

Celice RAMOS 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 približno 48-ih urah. Za zagotavljanje ustreznega števila celic smo jih subkultivirali. Optimalno rast dosegajo pri koncentraciji 0,5 – 1,5 × 10⁶ celic/mL (39). Ustrezno količino celične suspenzije smo razredčili z medijem RPMI z dodatki, segretim na 37 °C.

3.2.4. Priprava osnovne raztopine protiepileptičnih učinkovin

Pripravili smo osnovne raztopine PEU in jih raztopili v dimetilsulfoksidu (DMSO). Topilo smo izbrali zaradi slabe topnosti CBZ v vodi. DMSO je za celice v koncentracijah nad 0,5 % toksičen, zato volumen dodane osnovne raztopine nikoli ni presegal 5/1000 volumna celične suspenzije.

Osnovne raztopine PEU smo pripravili v aseptičnih pogojih. Najprej smo naredili osnovno raztopino s koncentracijo 200 mg/mL. CBZ zaradi slabše topnosti v DMSO v takšni koncentraciji ni bil topen, zato smo pripravili raztopino s koncentracijo 100 mg/mL. Iz osnovnih raztopin PEU smo pripravili še raztopine s koncentracijami 1, 10, 25, 50 in 100 mg/mL. Osnovne raztopine smo shranjevali pri - 20 °C.

3.2.5. Pozitivna kontrola

Pozitivno kontrolo smo opravili kot dokaz ustreznosti metode za določanje kazalnikov oksidativnega stresa na celicah, izpostavljenih PEU. Izvajali smo jo v treh neodvisnih poskusih v štirih paralelkah (inkubacija 72 ur) in v dveh neodvisnih poskusih v duplikatu (inkubacija 1 ur). Za induciranje oksidativnega stresa smo uporabili vodno raztopino H_2O_2 , ki smo jo pripravili z redčenjem s PBS na dan izvedbe poskusov. Posamezne paralelke smo izvajali na različnih mikrotitrskih ploščicah s šestimi vdolbinami. Pripravili smo suspenzijo celic s koncentracijo 8×10^5 celic/mL in jih kvantitativno razdelili v posamezne vdolbine. Celice smo izpostavili H_2O_2 v koncentracijah 0, 0,05 in 0,1 mmol/L in inkubirali 72 ur v inkubatorju (glej poglavje 3.2.3.). Celice smo vsakih 24 ur prešteli. Pri poskusih z enourno inkubacijo smo pripravili suspenzijo celic s koncentracijo 2×10^6 celic/mL in jih kvantitativno razdelili v vdolbine. Celice smo izpostavili 0, 1 in 2 mmol/L H_2O_2 . Celice smo po 72 in enourni inkubaciji prešteli in zamrznili.

3.2.6. Izpostavljanje celic PEU

Celice smo izpostavili dvema koncentracijama PEU, terapevtski in povišani. Prav tako smo izpostavili celice kombinaciji PEU v dveh različnih koncentracijah. Pri terapevtski koncentraciji smo upoštevali podatke iz literature o terapevtski serumski koncentraciji za posamezno PEU. Tako smo izbrali koncentracijo 10 mg/L za CBZ in TOP ter koncentracijo 25 mg/L za LEV. Pri povišani koncentraciji smo v primerjavi s terapevtsko koncentracijo za faktor 5 oziroma 4 povečali koncentracijo PEU. Pri CBZ in TOP smo izbrali koncentracijo 50 mg/L, pri LEV pa koncentracijo 100 mg/L. Celice smo izpostavili PEU v treh neodvisnih poskusih (CBZ in TOP v štirih). Pri kombinaciji PEU smo CBZ kombinirali s TOP oziroma LEV in celice izpostavili koncentracijama 10 in 10 mg/L za CBZ in TOP ter 10 in 25 mg/L za CBZ in LEV pri terapevtski koncentraciji in 50 in 50 mg/L ter 50 in 100 mg/L pri povišani koncentraciji.

Posamezne poskuse smo izvajali na mikrotitrskih ploščicah s šestimi vdolbinami. Pripravili smo suspenzijo celic s koncentracijo 5×10^5 celic/mL in jih kvantitativno razdelili v posamezne vdolbine. Celice smo izpostavili različnim koncentracijam in kombinacijam PEU ter jih inkubirali 48 h v inkubatorju (glej poglavje 3.2.3.). Po inkubaciji smo celice prešteli in zamrznili.

3.2.7. Zamrzovanje celic

Suspenzijo celic smo iz mikrotitrske ploščice prenesli v 15 mL centrifugirne epruvete in jih 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. Iz vsakega vzorca smo odvzeli 10 μL za štetje celic. 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 (t.i. peleta) pa smo zamrznili v zamrzovalniku na - 80 °C in jih tam hranili do analize.

3.2.8. Priprava celic za analizo

Celice smo glede na analizo različno pripravili. Pri analizi MDA smo zamrznjenim vzorcem dodali 210 μL 0,1 M HCl in vzorce 30 sekund mešali na stresalniku Vibromix. Nato smo odvzeli 10 μL suspenzije za določanje proteinov v vzorcu, preostanek vzorca (200 μL) pa smo uporabili za analizo MDA.

Vzorce za določanje GSH smo odtalili na ledu in jim dodali 220 μL 1 mM HCl z dodatkom 1 mM EDTA in jih mešali na stresalniku Vibromix 10 sekund. Nato smo vzorce ponovno zamrznili pri - 80 °C. V nadaljevanju smo vzorce odtalili v mrzli vodi in nato mešali na stresalniku 10 sekund. Ta postopek smo ponovili trikrat. Nato smo iz vzorcev odvzeli 20 μL suspenzije za določanje proteinov v vzorcu, preostanku (200 μL) pa smo dodali 400 μL acetonitrila in pustili 10 min na ledu. Nato smo vzorce centrifugirali 10 minut pri temperaturi 4 °C in 13100 obratih/min. Supernatant smo uporabili pri nadaljnji analizi.

3.2.9. Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu

Vzorce za določanje proteinov (glej poglavje 3.2.8.) smo odtalili na ledu in nato v dveh ponovitvah nanesli na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinami. Dodali smo raztopino pripravljenega reagenta Bio-Rad Protein Assay, inkubirali 10 min pri sobni temperaturi in izmerili absorbanco pri 595 nm na mikrotitrskirm čitalcu Safire² TM Genios. Izračunali smo povprečje dveh ponovitev in odčitali koncentracijo proteinov iz umeritvene krivulje narejene iz raztopine govejega serumskega albumina.

3.3. TEST ZA DOLOČANJE PRESNOVNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS

Celično proliferacijo in živost lahko določamo z merjenjem aktivnosti presnovnih encimov. Test za določanje presnovne aktivnosti celic MTS je kolorimetrična metoda za merjenje encimov, ki reducirajo reagent MTS (3-(4,2-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol z dodatkom reagenta za prenos elektronov fenazin etosulfata) v formazan vijolične barve. Tetrazolijev sol žive, presnovno aktivne celice reducirajo do obarvanega formazana, ki je topen v mediju in ga lahko spektrofotometrično kvantificiramo pri 490 nm na mikrotitrskirm čitalcu (39, 40, 41). Večja kot je torej izmerjena absorbanca, večja je presnovna aktivnost celic oziroma število celic, ki so presnovno aktivne. MTS test je enako občutljiv in zanesljiv kot njegov analogni test MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), vendar je zaradi nepotrebnega postopka ekstrakcije, kot je to potrebno pri testu MTT, veliko manj zahteven za izvedbo (40).

Postopek:

Pripravili smo preračunan volumen suspenzije celic RAMOS s koncentracijo 2×10^5 celic/mL. V mikrotitrsko ploščico s 24 vdolbinami smo odpipetirali po 1 mL suspenzije in ji dodali različno koncentracijo PEU (1-200 µg/mL končne koncentracije) in kombinacije PEU v različne koncentracije (od 1 mg/L do 200 mg/L vsake spojine). Nato smo v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinami v duplikatu odpipetirali vse koncentracije in kombinacije PEU in jih inkubirali 45 ur v inkubatorju za gojenje celic (37°C , 5 % CO_2). Po inkubaciji smo dodali 10 µL MTS reagenta in inkubirali v inkubatorju 3 ure (skupno 48 h), zatem pa smo z mikrotitrskim čitalcem izmerili absorbanco nastalega formazana. Istočasno smo test izvedli tudi z medijem RPMI in dodali 10 µL MTS, s čimer smo določili absorbanco ozadja (slepa kontrola) ter jo odšteli od absorbance vzorcev.

3.4. DOLOČANJE MDA V CELICAH S LC-MS/MS Z METODO DNPH

3.4.1. Priprava vzorcev

Pri pripravi vseh reagentov in vzorcev smo uporabili ultračisto vodo, pridobljeno z Milli Q – Advantage A10 (v nadaljevanju: voda).

Priprava reagentov

0,1 M HCl: V 100 mL bučko smo odpipetirali 0,829 mL 37 % HCl in dopolnili z vodo do oznake.

4 M klorovodikova kislina (HCl): 50 mL 4 M HCl smo pripravili iz 16,57 mL 37 % HCl in dopolnili z vodo do oznake.

1 M HCl: 10 mL 1 M HCl pripravili iz 0,829 mL 37 % HCl in dopolnili z vodo do oznake.

6 M natrijev hidroksid (NaOH): V 10 ml bučko smo nalili približno 5 mL vode in med mešanjem počasi dodajali predhodno natehtani NaOH (2,40 g), ki se je sproti raztopljal. Ko se je ves NaOH raztopil, smo dolili vodo do oznake in še enkrat premešali.

20 % triklorocetna kislina (TCA): V 25 mL bučko smo natehtali 5,00 g TCA in dopolnili z vodo do oznake.

1 mg/mL raztopina 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH): Uporabili smo raztopino DNPH s fosforno kislino ($c = 0,2 \text{ M}$). 250 μL te raztopine smo odpipetirali v 10 mL bučko ter dopolnili do oznake s 4 M HCl.

0,2 M pufer ocetna kislina/amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+$): V 100 mL bučko smo nalili približno 50 mL vode. S pipeto smo dodali 1146 μL 100 % ocetne kisline. Nato smo dodali 17,66 mL 25 % (m/m %) amonijaka v vodi ter dopolnili z vodo do oznake.

Priprava standardov MDA

V 10 mL bučko smo natehtali 43,50 mg malonaldehid tetrabutilamonijeve soli ter dopolnili do oznake z acetonitrilom. Tako smo dobili 1 mg/mL osnovno raztopino I (OR I). Nato smo 180 μL OR I odpipetirali v 50 mL bučko in dopolnili do oznake z 0,1 M HCl. Nastalo raztopino smo dobro premešali. Tako smo dobili standard MDA s koncentracijo 50 $\mu\text{mol/L}$.

(osnovna raztopina II; OR II). Ta standard smo ustrezeno redčili z 0,1 M HCl, da smo dobili standarde s koncentracijami 2,5 in 1,25 $\mu\text{mol/L}$. Standard s koncentracijo 1,25 $\mu\text{mol/L}$ (naredili smo duplikat) pa smo dalje redčili z 0,1 M HCl, da smo dobili standarde s koncentracijami od 0,625 do 0,039 $\mu\text{mol/L}$.

V 1,5 mL mikrocentrifugirkah smo pripravili po 1 mL vsakega standarda MDA z določeno koncentracijo. V preglednici III so prikazane pripravljane redčitve 50 μM OR II in 1,25 μM standarda z 0,1 M HCl, s katerimi smo pripravili standarde MDA z ustrezeno koncentracijo.

Preglednica III: Priprava MDA standardov.

koncentracija standarda MDA [$\mu\text{mol/L}$]	koncentracija raztopine [$\mu\text{mol/L}$]	alikvot raztopine [μL]	volumen 0,1 M HCl [μL]
2,5	50	50	950
1,25	50	25	975
0,625	1,25	500	500
0,469	1,25	375	635
0,313	1,25	250	750
0,235	1,25	188	812
0,156	1,25	125	875
0,078	1,25	63	937
0,039	1,25	31	969
0	/	/	1000

Osnovni postopek priprave vzorcev za določanje celokupnega MDA z DNPH metodo

V 1,5 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 200 μL vzorca (ali standarda) in dodali 50 μL 6 M NaOH, premešali in inkubirali 30 min v termostatiranem stresalniku pri 60 °C in 20 obratih/min (alkalna hidroliza na proteine vezanega MDA). Vzorce smo nato hladili v hladilniku 10 min. Potem smo vzorcem dodali 250 μL ohlajene 20 % TCA in jih centrifugirali 10 minut pri 5 °C in 13100 obratih/min (obarjanje proteinov). Po 450 μL supernatanta smo prenesli v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke in dodali 4 μL 6 M NaOH, da smo dobili raztopino s pH 6-7. Nato smo dodali 10 μL 1 M HCl (pH~2). V primeru, da je

vzorec postal moten, smo ga ponovno centrifugirali. 200 μ L te raztopine smo prenesli v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke ter dodali 150 μ L 1 M HCl in 50 μ L raztopine DNPH ter jih premešali. Nato smo jih inkubirali 60 minut pri 50 °C na termostatiranem stresalniku pri obratih 20 obratov/min, zaščiteno pred svetlobo (derivatizacija MDA). Nastali produkt MDA-DNPH je nestabilen v prisotnosti svetlobe, zato smo derivatizirane vzorce ohladili na sobni temperaturi (10 min), zaščitene pred svetlobo. Vzorcem smo nato dodali 150 μ L acetatnega pufra ter premešali. 150 μ L raztopine smo odpipetirali v inserte, ki smo jih nato vstavili v obarvane viale. Viale z vzorci smo zložili v avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema ohlajenega na 10 °C. Postopek priprave vzorcev smo povzeli po članku Czauderne in sod. (42), z manjšimi spremembami.

3.4.2. Metoda tekočinske kromatografije (LC)

Metoda LC in MS/MS je bila uporabljena pri diplomski nalogi, ki je bil predhodno izdelana na katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko (43). Uporabili smo LC sistem Agilent 1290 Infinity. Analizo smo izvajali na koloni Kinetex C18 ($50 \times 2,1$ mm, velikost delcev 5 μ m). Injicirali smo 5 μ L 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 razplinili v ultrazvočni kadički. Čas analize je znašal 2,6 minute. Retencijski čas analita (t_r) je bil 1,23 min. Pretok MF je bil 0,5 mL/min, analiza se je izvajala z gradientno elucijo po shemi predstavljeni v preglednici IV.

Preglednica IV: Shema gradientne elucije.

t (min)	delež topila B (%)
0	30
2	50
2,05	30
2,6	30

3.4.3. 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 vzeli odziv ionov 159,2. Nastavitev masnega analizatorja so podane v preglednici V.

Preglednica V: Nastavitev masnega analizatorja za analizo MDA.

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)

3.5. DOLOČANJE GSH IN GSSG V CELICAH S LC-MS/MS METODO

3.5.1. Priprava vzorcev

Pri pripravi vseh reagentov in vzorcev smo uporabili ultračisto vodo, pridobljeno z Milli Q – Advantage A10 (v nadaljevanju: voda).

Priprava 1 mM HCl z 1 mM EDTA: V 100 mL bučko smo natehtali 37,2 mg EDTA in jo raztopili v približno 80 mL vode. Nato smo dodali 25 µL 4 M HCl in dopolnili z vodo do oznake.

Priprava standardov GSH

V 10 mL bučko smo natehtali 6,15 mg GSH in dodali 1 mM HCl do oznake (GSH I). V drugo 10 mL bučko smo natehtali 6,12 mg GSSG in dodali 1 mM HCl do oznake (GSSG I). Nato smo v novo 10 mL bučko odpipetirali 1 mL GSH I in 80 µL GSSG I in dodali 1 mM HCl do oznake. Tako smo dobili osnovno raztopino GSH in GSSG s koncentracijami 200 µmol/L in 8 µmol/L. To osnovno raztopino smo redčili z 1 mM HCl v razmerju 1:10 in dobili raztopini s koncentracijama 20 µmol/L GSH in 0,8 µmol/L GSSG. Ti raztopini smo uporabili za pripravo standardov, ki so prikazani v preglednici VI.

Preglednica VI: Priprava GSH in GSSG standardov.

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

Osnovni postopek priprave vzorcev za določanje GSH in GSSG

K 200 μL vzorca (ali standarda) smo dodali 400 μL hladnega acetonitrila in premešali na stresalniku Vibromix. Vzorce smo nato centrifugirali 10 min pri 4 °C in 13100 obratih/min (obarjanje proteinov). Supernatant smo odpipetirali v obarvane viale in jih vstavili v avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema ohlajenega na 10 °C. Postopek priprave vzorcev smo povzeli po literaturi in prilagodili (44, 45), prav tako tudi pogoje pri metodi LC in MS/MS (46).

3.5.2. Metoda LC

Uporabili smo LC sistem Agilent 1290 Infinity. Analizo smo izvajali na koloni Kinetex PFP (100 × 3 mm, velikost delcev 2,6 μm) s temperaturo 50 °C. Injicirali smo 5 μL vzorca, avtomatski vzorčevalnik je bil ohlajen na 10 °C. MF je bila sestavljena iz 0,1 % mravljične kisline in metanola v razmerju 98:2. Obe topili smo pred analizo razplinili v ultrazvočni kadički. Analiza se je izvajala z izokratsko elucijo. Šele po 2 min analize smo eluat vodili na masni spektrometer, čas analize pa je znašal 3,5 minute. Pretok MF je bil 0,2 mL/min,

post-kolonsko smo z dodatno kvarterno črpalko preko T-člena dovajali 0,2 mL/min acetonitrila.

3.5.3. Metoda MS/MS

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

Preglednica VII: Nastavitev masnega analizatorja za analizo GSH in GSSG.

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

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

3.6. OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA

Podatke meritev smo zbrali in obdelali s pomočjo programa Microsoft Excel 2010. Prav tako smo ta program uporabili za izdelavo grafičnega prikaza podatkov. Podatke smo predstavili kot povprečja s standardno deviacijo (SD). Statistično analizo smo opravili s programom IBM Statistical Package for Social Sciences za Windows (verzija 19.0; SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA). Za primerjavo dveh skupin smo uporabili dvostranski Studentov *t* test odvisnih vzorcev. Če je bila manjša od 0,05 ali 0,01, smo izbrali kot statistično značilno.

4. REZULTATI

4.1. ODSTOTEK IN ŠTEVILO ŽIVIH CELIC

Odstotek živih celic smo uporabili kot indikator resnih oksidativnih poškodb. Pri opažanju lažjih oksidativnih poškodb, za katere je značilna ustavitev celičnega cikla ter posledično ustavitev proliferacije celic, pa smo dodatno upoštevali še število živih celic.

V nadaljevanju so podani odstotki živih celic in število celic od začetka do konca inkubacije s standardno deviacijo (SD) (glej enačbo *žive celice (%)* v poglavju 3.2.2.).

4.1.1. Pozitivna kontrola

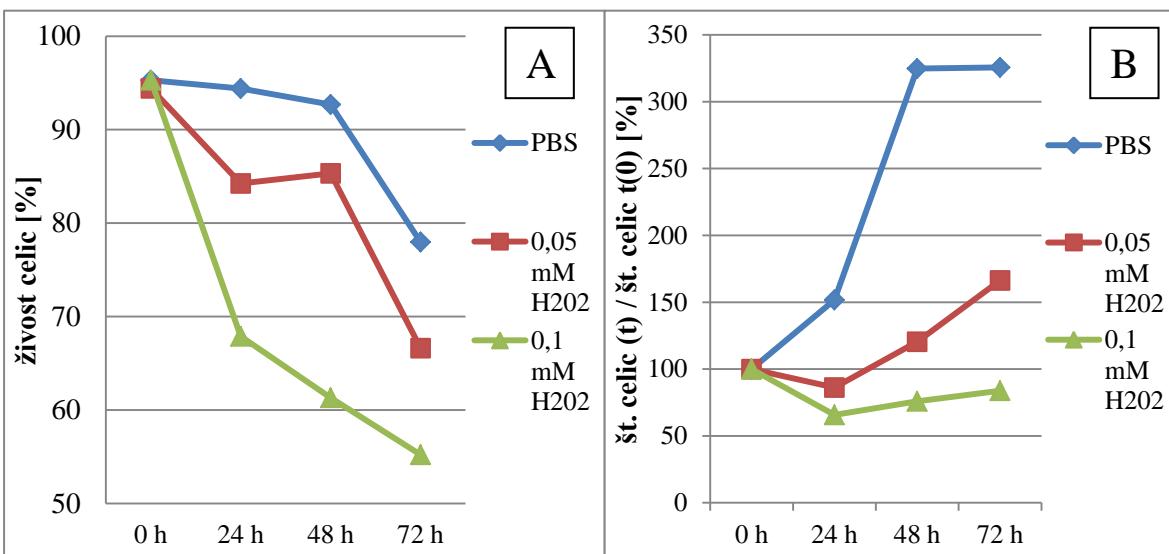
Preglednici VIII in IX ter slika 10 prikazujejo odstotek in število živih celic v kontrolnem vzorcu (PBS) ter vzorcih, pri katerem so bile celice izpostavljene H_2O_2 v koncentracijah 0,05 in 0,1 mM. Čas inkubacije je znašal 72 ur.

Preglednica VIII: Odstotek živih celic v odvisnosti od časa njihove izpostavitve (0, 24, 48, 72 h) različnim koncentracijam H_2O_2 (0,05 in 0,1 mM). Kontrolni vzorci predstavljajo celice, ki smo jih inkubirali le v prisotnosti PBS.

	žive celice (%) \pm SD			
	t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
kontrola PBS 2 % (n= 12)	95,3 \pm 4,0	94,4 \pm 4,4	92,7 \pm 3,5	78,0 \pm 7,3
0,05 mM H_2O_2 (n= 8)	94,4 \pm 4,7	84,3 \pm 9,8	85,3 \pm 3,6	66,6 \pm 10,2
0,1 mM H_2O_2 (n= 12)	95,3 \pm 4,0	67,9 \pm 17,5	61,3 \pm 13,1	55,2 \pm 9,1

Preglednica IX: Število celic v odvisnosti od časa jihove izpostavitve (0, 24, 48, 72 h) različnim koncentracijam H_2O_2 (0,05 in 0,1 mM). Podatki so predstavljeni kot razmerje med številom celic v posamezni časovni točki in številom celic ob času t = 0 h.

	št. živih celic (t) / št. živih celic (t_0) \pm SD (%)			
	t = 0 h (t_0)	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
kontrola PBS 2 % (n= 12)	100	152 \pm 54	325 \pm 97	326 \pm 140
0,05 mM H_2O_2 (n= 8)	100	86 \pm 33	120 \pm 44	166 \pm 116
0,1 mM H_2O_2 (n= 12)	100	66 \pm 38	76 \pm 54	84 \pm 36



Slika 9: 72 urno izpostavljanje celic. A - odstotek živih celic v odvisnosti od časa in koncentracije H₂O₂, vrednosti so predstavljene v preglednici VII; B - razmerje med številom celic v posamezni časovni točki in številom celic ob času t = 0 h. (%), vrednosti so predstavljene v preglednici IX.

4.1.2. Terapevtska in povišana koncentracija PEU

Preglednici X in XI ter slika 10 prikazujejo odstotek in število živih celic v kontrolem vzorcu (DMSO) in PEU s koncentracijama 10 in 50 mg/L za CBZ in TOP ter 25 in 100 mg/L za LEV. Čas inkubacije je znašal 48 h, parametre pa smo merili ob začetku (t = 0 h) in ob koncu inkubacije (t = 48 h).

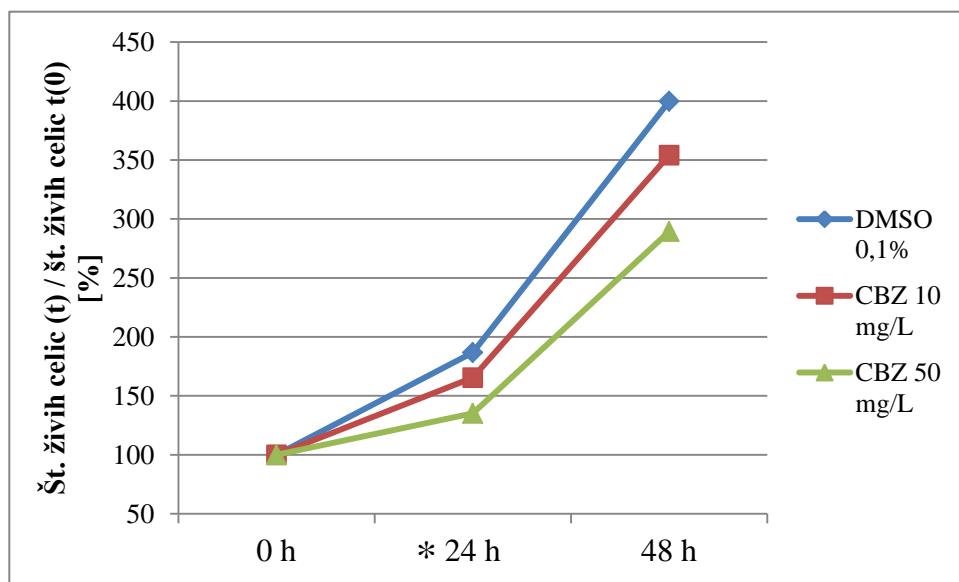
Preglednica X: Odstotek živih celic v odvisnosti od časa njihove izpostavitve (0, 48 h) različnim PEU v terapevtski koncentraciji in število celic predstavljeno kot razmerje med številom celic v posamezni časovni točki in številom celic ob času t = 0 h.

Terapevtska koncentracija PEU	žive celice (%) \pm SD		št. živih celic (t) / št. živih celic (t ₀) \pm SD (%)	
	t = 0 h	t = 48 h	t = 0 h (t ₀)	t = 48 h
kontrola DMSO 0,02 % (n= 4)	88,8 \pm 3,0	95,0 \pm 2,7	100	400 \pm 50
CBZ 10 mg/L (n= 4)	88,8 \pm 3,0	95,2 \pm 1,8	100	350 \pm 100
TOP 10 mg/L (n= 4)	88,8 \pm 3,0	96,0 \pm 1,2	100	440 \pm 80
LEV 25 mg/L (n= 3)	89,8 \pm 2,7	96,6 \pm 1,1	100	400 \pm 80

Preglednica XI: Odstotek živih celic v odvisnosti od časa njihove izpostavitve (0, 48 h) različnim PEU v povišani koncentraciji in število celic predstavljeno kot razmerje med številom celic v posamezni časovni točki in številom celic ob času t = 0 h.

Povišana koncentracija PEU	žive celice (%) ± SD		št. živih celic (t) / št. živih celic (t ₀) ± SD (%)	
	t = 0 h	t = 48 h	t = 0 h (t ₀)	t = 48 h
kontrola DMSO 0,1 % (n= 7)	89,2 ± 2,7	95,0 ± 2,7	100	400 ± 70
CBZ 50 mg/L (n= 4)	88,8 ± 3,0	91,8 ± 4,5	100	290 ± 70 ^(a)
TOP 50 mg/L (n= 4)	88,8 ± 3,0	96,4 ± 1,9	100	450 ± 140
LEV 100 mg/L (n= 3)	89,8 ± 2,7	95,6 ± 0,4	100	420 ± 50

(a) primerjava s kontrolo; **p < 0,05**; dvostranski t-test neodvisnih vzorcev enakih varianc.



Slika 10: število celic predstavljeno kot razmerje med številom celic v posamezni časovni točki in številom celic ob času t = 0 h. Vrednosti so predstavljene v preglednici IX in X.
* Odstotek pri t = 24 h je predpostavljen na podlagi pozitivne kontrole.

4.1.3. Terapevtska in povišana koncentracija kombinacije PEU

Preglednici XII in XIII prikazujeta odstotek preživetja in število živih celic v kontroli (DMSO) in kombinacijah PEU s koncentracijama 10 in 50 mg/L za CBZ in TOP ter 25 in 100 mg/L za LEV. Čas inkubacije je znašal 48 h, parametre pa smo merili ob začetku (t = 0 h) in ob koncu inkubacije (t = 48 h).

Preglednica XII: Odstotek živih celic v odvisnosti od časa njihove izpostavitve (0, 48 h) različnim kombinacijam PEU v terapevtskih koncentracijah in število celic predstavljeno kot razmerje med številom celic v posamezni časovni točki in številom celic ob času t=0 h.

Terapevtska koncentracija kombinacije PEU	žive celice (%) ± SD		št. živih celic (t) / št. živih celic (t ₀) ± SD (%)	
	t = 0 h	t = 48 h	t = 0 h (t ₀)	t = 48 h
kontrola DMSO 0,04 % (n= 3)	89,8 ± 2,7	96,9 ± 0,3	100	410 ± 60
CBZ 10 mg/L + TOP 10 mg/L (n= 3)	89,8 ± 2,7	97,0 ± 0,7	100	500 ± 40 ^(a)
CBZ 10 mg/L + LEV 25 mg/L (n= 3)	89,8 ± 2,7	96,1 ± 0,5	100	400 ± 30

(a) primerjava s kontrolo, **p < 0,05**.

Preglednica XIII: Odstotek živih celic v odvisnosti od časa njihove izpostavitve (0, 48 h) različnim kombinacijam PEU v povišanih koncentracijah in število celic predstavljeno kot razmerje med številom celic v posamezni časovni točki in številom celic ob času t=0 h.

Povišana koncentracija kombinacije PEU	žive celice (%) ± SD		št. živih celic (t) / št. živih celic (t ₀) ± SD (%)	
	t = 0 h	t = 48 h	t = 0 h (t ₀)	t = 48 h
kontrola DMSO 0,2 % (n= 3)	89,8 ± 2,7	97,2 ± 1,4	100	440 ± 40
CBZ 50 mg/L + TOP 50 mg/L (n= 3)	89,8 ± 2,7	92,3 ± 2,3	100	340 ± 60 [*]
CBZ 50 mg/L + LEV 100 mg/L (n= 3)	89,8 ± 2,7	93,3 ± 3,9	100	330 ± 20 ^{**}

* primerjava s kontrolo, p = 0,07;

** primerjava s kontrolo, p = 0,06.

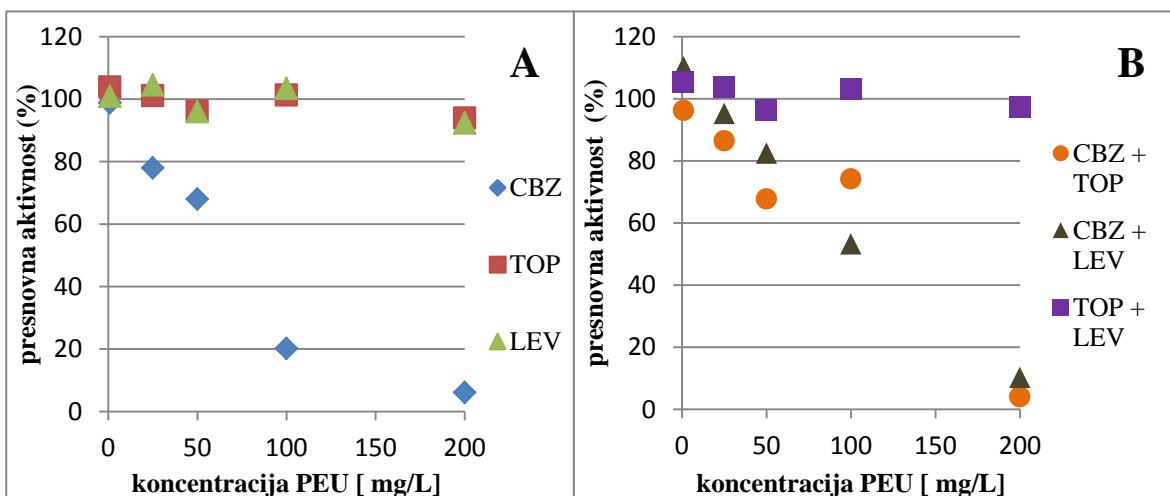
4.2. DOLOČANJE PRESNOVNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS

Preglednica XIV ter slika 11 prikazujejo razmerje presnovne aktivnosti med koncentracijo PEU in kontrolo. Čas inkubacije je znašal 48 h.

Preglednica XIV: Presnovna aktivnost celic ocenjenih s testom MTS po 48 urah inkubacije s različnimi koncentracijami in kombinacijami PEU v primerjavi s kontrolo.

t= 48 h	razmerje med presnovno aktivnostjo PEU in kontrolo (%)				
	1 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
CBZ	94,1	74,2	64,7	19,1	5,8
TOP	98,9	101,1	96,1	101,3	93,9
LEV	96,0	99,5	96,0	98,3	92,3
CBZ + TOP *	91,4	82,0	64,2	70,5	3,8
CBZ + LEV *	101,7	90,5	78,3	50,6	9,8
TOP + LEV *	99,9	98,2	91,5	97,9	92,5

* V primeru kombinacij učinkovin je bila uporabljena vsaka učinkovina v navedeni koncentraciji.



Slika 11: Razmerje presnovne aktivnosti med celicami izpostavljenimi PEU in med kontrolo po 48 urni inkubaciji: A – posamezne PEU; B – kombinacije PEU.

4.3. MERITVE MDA, GSH IN GSSG

Meritve MDA smo zaradi dolgotrajnega časa priprave vzorcev izvedli v več zaporednih dnevih in sekvencah. Zraven spodaj prikazanih rezultatov smo navedli tudi enačbe umeritvenih premic.

Meritve GSH in GSSG smo v celoti izvedli v enem dnevu z eno sekvenco na masnem spektrometru. Umeritvena premica meritve GSH je imela enačbo *koncentracija GSH = 41886,9 x odziv - 36102,6*; determinacijski koeficient $R^2 = 0,999$. Umeritvena premica meritve GSSG je imela enačbo *koncentracija GSSG = 93264,2 x odziv + 150,3*; $R^2 = 0,998$.

Odzivi vzorcev pri meritvi GSSG so bili v večini med mejo detekcije (MD) in mejo določljivosti (meja kvantifikacije - MK). MD je bila 20,6 nmol/L, MK pa 72 nmol/L. MD po smernicah ICH (International conference on harmonization) običajno predstavlja trikratno vrednost slepe meritve, MK pa desetkratno vrednost slepe meritve (47). Koncentracije smo zaradi enakih trendov med paralelkami vseeno predstavili in sicer kot razmerje med GSH in GSSG.

4.3.1. Pozitivna kontrola 72 h

Pozitivno kontrolo smo izvedli v dvanajstih ponovitvah. Meritve MDA smo izvedli v dveh zaporednih dnevih, osem prvi dan in štiri drugi dan. Umeritvena premica prve meritve je imela enačbo *koncentracija MDA = 2274,2 x odziv + 147,6*; determinacijski koeficient $R^2 = 0,9988$. Umeritvena premica druge meritve *koncentracija MDA = 2939,4 x odziv + 109,5*; $R^2 = 0,9994$. Preglednica XV in slika 12 prikazujejo rezultate meritve MDA in GSH ter GSSG.

Preglednica XV: Količina MDA, GSH in razmerje GSH / GSSG v celicah, ki so bile 72 h izpostavljene različnim koncentracijam H₂O₂. Rezultati so predstavljeni kot povprečje \pm SD.

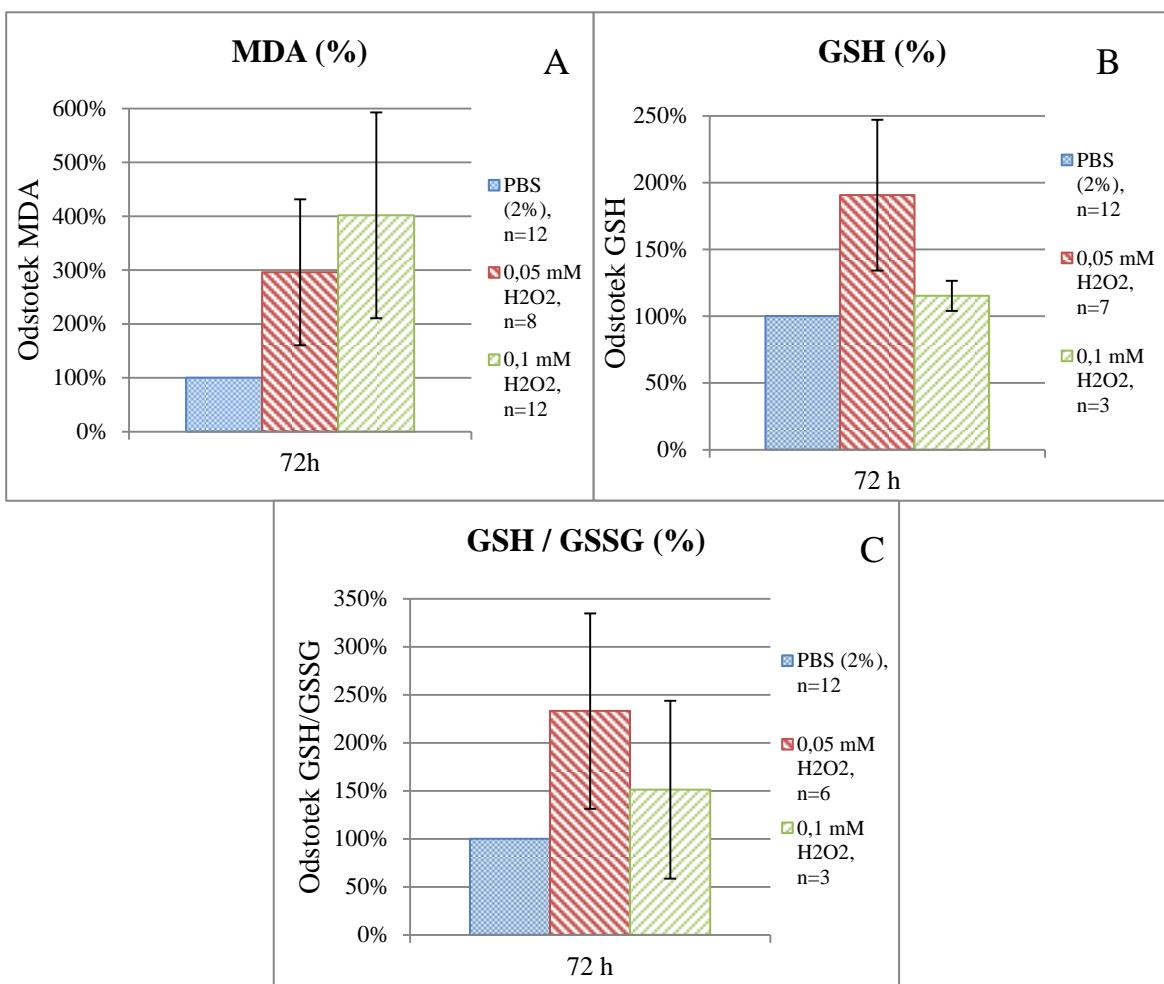
t = 72 h	MDA (pmol / 10 ⁶ celic)	GSH (nmol / 10 ⁶ celic)	GSH / GSSG
kontrola PBS 2 % (n _{MDA, GSH} = 12)	24,8 \pm 12,5	0,64 \pm 0,25	404 \pm 200*
0,05 mM H ₂ O ₂ (n _{MDA} = 8, n _{GSH} = 7)	58,5 \pm 24,9 ^(a)	1,02 \pm 0,34 ^(a)	789 \pm 214**
0,1 mM H ₂ O ₂ (n _{MDA} = 12, n _{GSH} = 3)	85,4 \pm 28,9 ^(a, b)	0,80 \pm 0,06 ^(c)	498 \pm 231**

(a): primerjava s kontrolo, **p < 0,01**;

(b): primerjava s 0,05 mM H₂O₂, **p < 0,01**;

(c): primerjava s kontrolo, p = 0,1;

* 5 rezultatov meritve GSSG je bilo nad mejo detekcije (MD) in pod mejo določljivosti (MK), ostali so bili pod MD; ** vsi rezultati meritve GSSG so bili pod MD.



Slika 12: Spremembe kazalnikov oksidativnega stresa po 72 urni inkubaciji celic v prisotnosti H₂O₂: A – odstotek MDA v celicah v primerjavi s kontrolo; B – Odstotek GSH v celicah v primerjavi s kontrolo; C – Odstotek razmerja GSH/GSSG v primerjavi s kontrolo.

4.3.2. Pozitivna kontrola 1 h

Pozitivno kontrolo smo izvedli v štirih ponovitvah. Meritve MDA smo izvedli v eni sekvenci v enim dnevu. Umeritvena premica meritve je imela enačbo *koncentracija MDA = 1509,2 x odziv + 94,0*; determinacijski koeficient $R^2 = 0,998$. Število celic smo predpostavili s primerjavo izmerjenih proteinov in določenega povprečja proteinov v celicah. Preglednica XVI in slika 13 prikazujejo rezultate meritev MDA in GSSG.

Preglednica XVI: Količina MDA, GSH in razmerje GSH / GSSG v celicah, ki so bile 1 h izpostavljene različnim koncentracijam H₂O₂. Rezultati so predstavljeni kot povprečje ± SD.

t = 1 h	MDA (pmol / 10 ⁶ celic)	GSH (nmol / 10 ⁶ celic)	GSH / GSSG
kontrola PBS 2 % (n= 4)	34,7 ± 18,8	2,11 ± 0,23	176 ± 32*
1 mM H ₂ O ₂ (n= 4)	69,1 ± 20,8 ^(a)	1,51 ± 0,61	120 ± 5**
2 mM H ₂ O ₂ (n= 4)	56,8 ± 36,0 ^(b)	1,24 ± 0,38 ^(a)	117 ± 8***

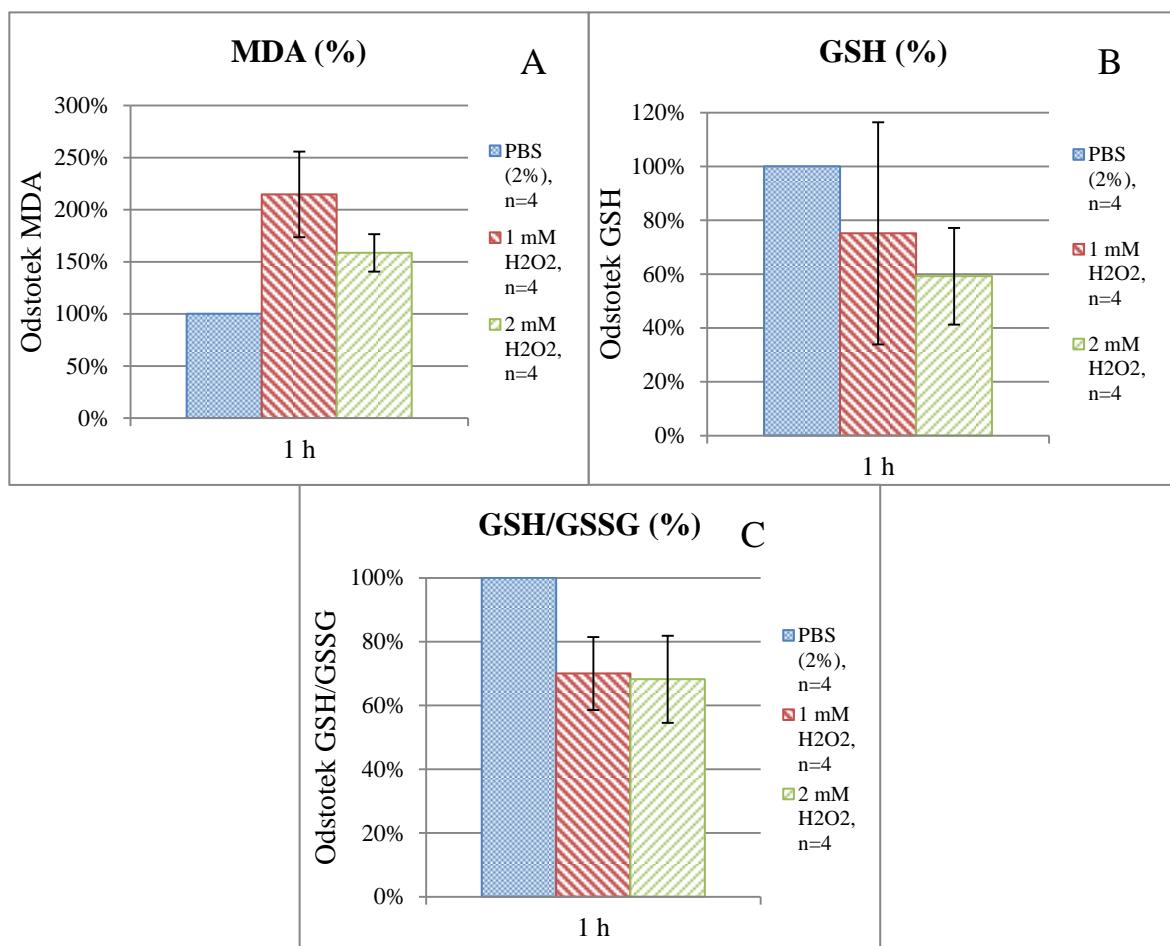
(a): primerjava s kontrolo, p < 0,05;

(b): primerjava s kontrolo, p = 0,08;

* 3 rezultati meritve GSSG so bili nad MD in pod MK, 1 pod MD;

** 2 rezultata meritve GSSG sta bila nad MD in pod MK, 2 pod MD;

*** rezultati meritve GSSG so bili nad MD in pod MK.



Slika 13: Spremembe kazalnikov oksidativnega stresa po enourni inkubaciji celic v prisotnosti H₂O₂: A – odstotek MDA v celicah v primerjavi s kontrolo; B – Odstotek GSH v celicah v primerjavi s kontrolo; C – Odstotek razmerja GSH/GSSG v primerjavi s kontrolo.

4.3.3. Terapevtska in povišana koncentracija PEU

Celice smo izpostavili PEU v štirih ponovitvah (pri LEV v treh ponovitvah). Meritve MDA smo izvedli v treh sekvencah ob treh različnih časih. Umeritvena premica prve meritve je imela enačbo $koncentracija MDA = 1509,2 \times odziv + 94,0$; determinacijski koeficient $R^2 = 0,998$. Umeritvena premica druge meritve je imela enačbo $koncentracija MDA = 1968,3 \times odziv - 15,6$; $R^2 = 0,9988$. Tretja umeritvena premica pa $koncentracija MDA = 1838,5 \times odziv + 172,6$; $R^2 = 0,999$. Preglednica XVII in slika 14 prikazujejo rezultate meritve MDA in GSH ter GSSG pri terapevtski koncentraciji PEU, preglednica XVIII in slika 15 pa pri povišani koncentraciji PEU.

Terapevtska koncentracija PEU

Preglednica XVII: Količina MDA, GSH in razmerje GSH / GSSG v celicah, ki so bile 48 h izpostavljene različnim PEU v terapevtskih koncentracijah. Rezultati so predstavljeni kot povprečje $\pm SD$.

$t = 48 \text{ h}$	MDA (pmol / 10^6 celic)	GSH (nmol / 10^6 celic)	GSH / GSSG
kontrola DMSO 0,02 % (n= 4)	$27,6 \pm 10,7$	$1,48 \pm 0,31$	$469 \pm 80^*$
CBZ 10 mg/L (n= 4)	$39,0 \pm 16,7^{(a)}$	$1,67 \pm 0,58$	$377 \pm 63^{**}$
TOP 10 mg/L (n= 4)	$28,0 \pm 12,6$	$1,25 \pm 0,56^{(b)}$	$482 \pm 80^{**}$
LEV 25 mg/L (n= 3)	$33,3 \pm 18,2^{(b)}$	$1,57 \pm 0,61$	$479 \pm 129^{***}$

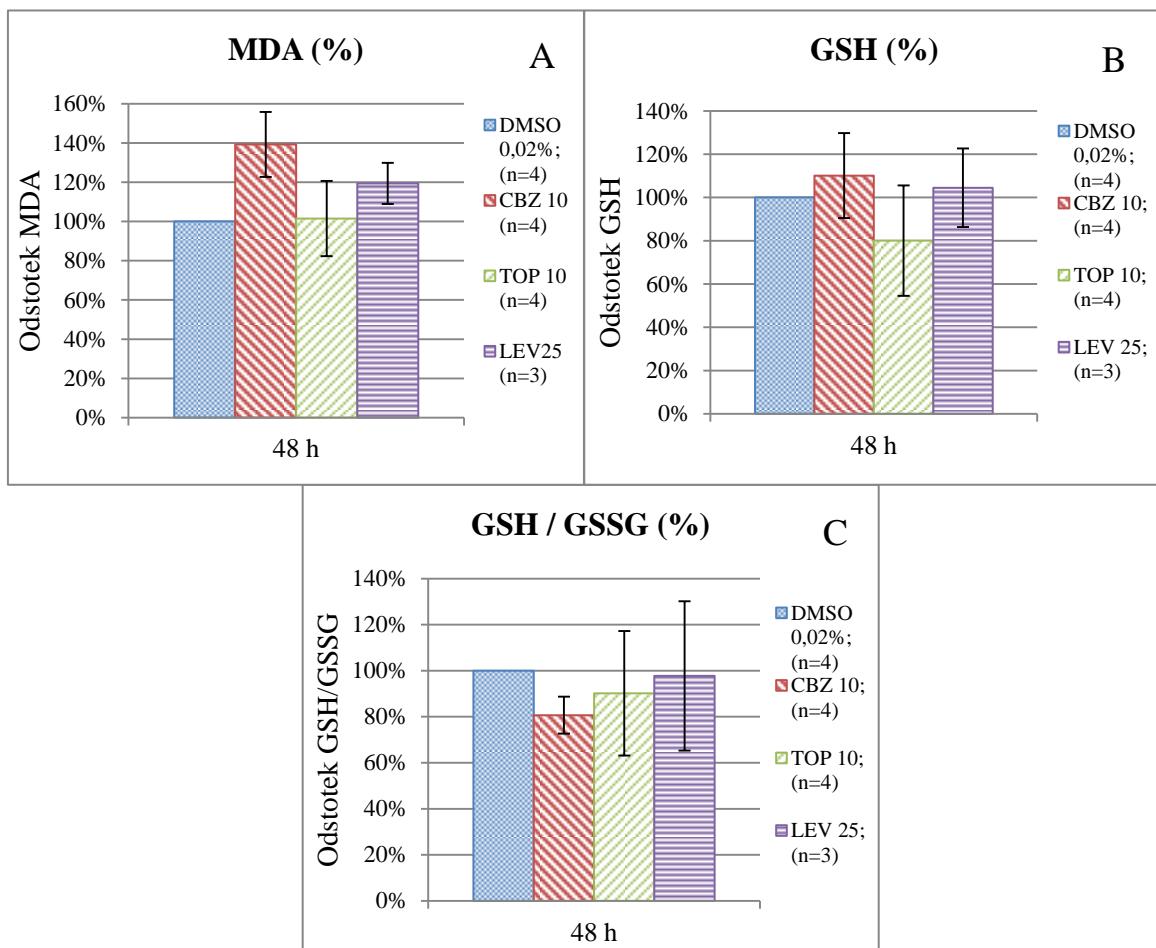
(a): primerjava s kontrolo; **p < 0,05**;

(b): primerjava s kontrolo, $p < 0,2$;

* 3 rezultati meritve GSSG so bili nad MD in pod MK, 1 nad MK;

** rezultati meritve GSSG so bili nad MD in pod MK;

*** 2 rezultata meritve GSSG sta bila nad MD in pod MK, 1 pod MD.



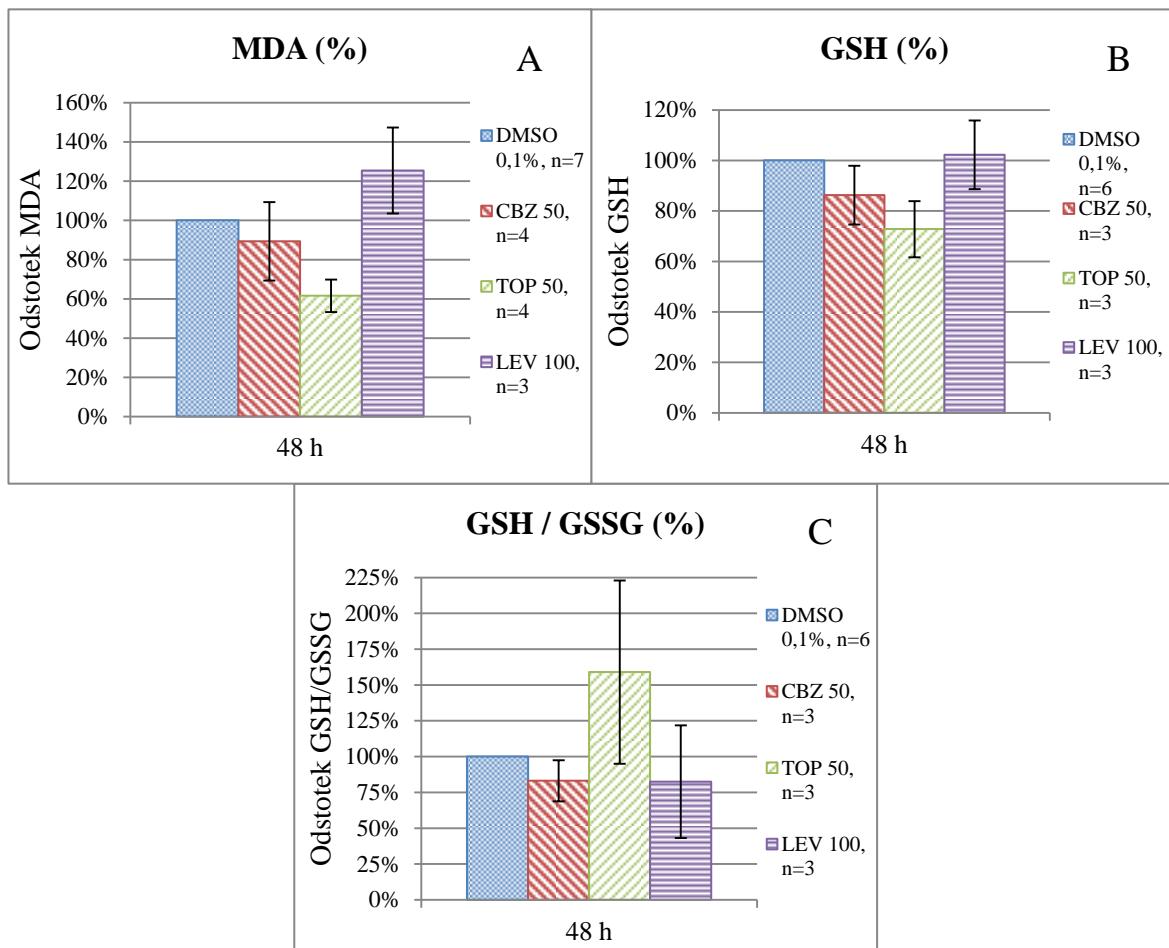
Slika 14: Spremembe kazalnikov oksidativnega stresa po 48 urni inkubaciji celic v prisotnosti terapevtske koncentracije PEU: A – odstotek MDA v celicah v primerjavi s kontrolo; B – Odstotek GSH v celicah v primerjavi s kontrolo; C – Odstotek razmerja GSH/GSSG v primerjavi s kontrolo.

Povišana koncentracija PEU

Preglednica XVIII: Količina MDA, GSH in razmerje GSH / GSSG v celicah, ki so bile 48 h izpostavljene različnim PEU v povisani koncentraciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje \pm SD.

t = 48 h	MDA (pmol / 10^6 celic)	GSH (nmol / 10^6 celic)	GSH / GSSG
kontrola			
DMSO 0,1 % (n _{MDA} =7 n _{GSH} =6)	33,0 \pm 11,6	1,66 \pm 0,50	383 \pm 116*
CBZ 50 mg/L (n _{MDA} =4 n _{GSH} =3)	32,5 \pm 10,7	1,56 \pm 0,23 ^(b)	290 \pm 65*
TOP 50 mg/L (n _{MDA} =4, n _{GSH} = 3)	22,4 \pm 6,3 ^(a)	1,32 \pm 0,30 ^(b)	420 \pm 139*
LEV 100 mg/L (n= 3)	35,0 \pm 16,3	1,47 \pm 0,50 ^(b)	330 \pm 106*

(a): primerjava s kontrolo, p < 0,05; (b): primerjava s kontrolo, p < 0,2; * rezultati meritve GSSG so bili nad MD in pod MK.



Slika 15: Spremembe kazalnikov oksidativnega stresa po 48 urni inkubaciji celic v prisotnosti povišane koncentracije PEU: A – odstotek MDA v celicah v primerjavi s kontrolo; B – Odstotek GSH v celicah v primerjavi s kontrolo; C – Odstotek razmerja GSH/GSSG v primerjavi s kontrolo.

4.3.4. Terapevtska in povišana koncentracija kombinacije PEU

Celice smo izpostavili kombinaciji PEU v treh ponovitvah. Meritve MDA smo izvedli v dveh sekvencah v različnem času. Umeritvena premica prve meritve je imela enačbo $koncentracija MDA = 1968,3 \times odziv - 15,6; R^2 = 0,9988$. Umeritvena premica druge meritve pa $koncentracija MDA = 1838,5 \times odziv + 172,6; R^2 = 0,999$. Preglednica XIX in XX ter slika 16 prikazujejo rezultate meritve MDA in GSH ter GSSG pri terapevtski in povišani koncentraciji kombinacije PEU.

Terapevtska koncentracija kombinacije PEU

Preglednica XIX: Količina MDA, GSH in razmerje GSH / GSSG v celicah, ki so bile 48 h izpostavljene različnim kombinacijam PEU v terapevtskih koncentracijah. Rezultati so predstavljeni kot povprečje ± SD.

t = 48 h	MDA (pmol / 10 ⁶ celic)	GSH (nmol / 10 ⁶ celic)	GSH / GSSG
kontrola DMSO 0,04 % (n= 3)	30,3 ± 10,3	1,31 ± 0,50	673 ± 268*
CBZ 10 mg/L + TOP 10 mg/L (n= 3)	26,8 ± 8,6 ^(a)	1,09 ± 0,28	415 ± 33*
CBZ 10 mg/L + LEV 25 mg/L (n= 3)	29,3 ± 14,5	1,32 ± 0,53	452 ± 157**

(a): primerjava s kontrolo, p < 0,2;

* 2 rezultata meritve GSSG sta bila nad MD in pod MK, 1 pod MD;

** rezultati meritve GSSG so bili nad MD in pod MK.

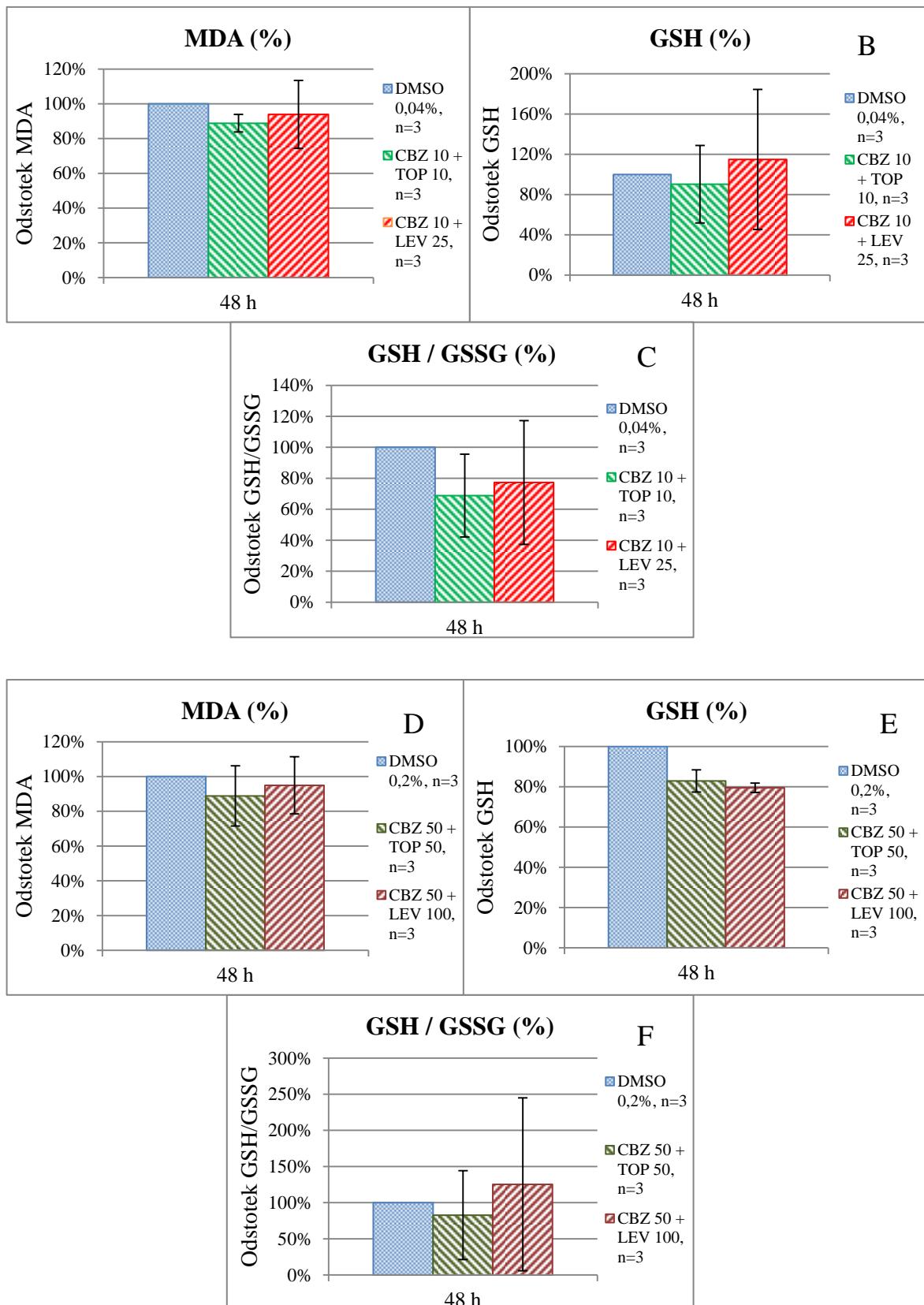
Povišana koncentracija kombinacije PEU

Preglednica XX: Količina MDA, GSH in razmerje GSH / GSSG v celicah, ki so bile 48 h izpostavljene različnim kombinacijam PEU v povisanih koncentracijah. Rezultati so predstavljeni kot povprečje ± SD.

t = 48 h	MDA (pmol / 10 ⁶ celic)	GSH (nmol / 10 ⁶ celic)	GSH / GSSG
kontrola DMSO 0,2 % (n= 3)	30,5 ± 11,6	1,47 ± 0,50	511 ± 307*
CBZ 50 mg/L + TOP 50 mg/L (n= 3)	26,0 ± 7,7	1,20 ± 0,34 ^(a)	350 ± 194*
CBZ 50 mg/L + LEV 100 mg/L (n= 3)	30,2 ± 15,1	1,16 ± 0,37 ^(a)	511 ± 399*

(a): primerjava s kontrolo, p < 0,20;

* 2 rezultata meritve GSSG sta bila nad MD in pod MK, 1 pod MD.



Slika 16: Spremembe kazalnikov oksidativnega stresa po 48 urni inkubaciji celic s terapevtsko in povišano koncentracijo PEU A, D – odstotek MDA v celicah v primerjavi s kontrolo; B, E – Odstotek GSH v celicah v primerjavi s kontrolo; C, F – Odstotek razmerja GSH/GSSG v primerjavi s kontrolo.

5. RAZPRAVA

5.1. ODSTOTEK IN ŠTEVILO ŽIVIH CELIC

Odstotek živih celic nam razkrije osnovno dogajanje v celicah. V primeru hudih motenj v okolju, kot je povečana koncentracija H_2O_2 , lahko pride do nepopravljivih poškodb in celične smrti. Od koncentracije H_2O_2 je odvisno ali celica vstopi v programirano celično smrt (apoptozo) ali pa pride do nekontroliranega izlitja celice (nekroza) (48).

5.1.1. Pozitivna kontrola 72 h

Na podlagi podatkov, ki smo jih dobili na neizpostavljenih celičnih linijah, smo izbrali optimalne pogoje za nadaljnje poskuse. Pri neizpostavljeni kontroli (dodatek PBS) so bile celice po 48 urah žive v enaki meri kot pri času $t = 0$ h, medtem ko se je pri 72 urah živost celic znižala za okoli dvajset odstotkov. Izbrana celična linija dosega optimalno rast pri koncentraciji celic $0,2 - 1 \times 10^6$ celic/mL, medtem ko je največja priporočljiva koncentracija celic po proizvajalcem navodilu enaka 2×10^6 celic/mL, medij pa je potrebno menjati na vsakih 2 do 3 dni (49). V našem primeru je koncentracija celic presegla priporočljivo koncentracijo, zato smo padec v živosti pripisali neustrezni koncentraciji celic in ne dodatku PBS. Nadaljnje poskuse s PEU smo zato omejili na 48 ur, kjer so bile celice v več kot 90 odstotkih žive, začetno koncentracijo celic pa zmanjšali iz 8×10^5 na 5×10^5 celic/mL.

Celicam, ki so bile izpostavljene H_2O_2 , je živost padala z naraščajočo koncentracijo H_2O_2 . Pri $0,05$ mM H_2O_2 je po začetnemu padcu števila živih celic prišlo do hitrejše rasti kot pri $0,1$ mM H_2O_2 , kar smo potrdili s štetjem celic. Grafično smo opazili, da dodatek $0,05$ mM H_2O_2 ovira podvojevanje celic v takšni meri, da rast ni več eksponentna, kot smo to opazili pri neizpostavljeni kontroli do časa 48 ur, ampak upočasnjena. Pri dodatku $0,1$ mM H_2O_2 je bila rast celic prav tako upočasnjena, vendar je bil naklon rasti celic manjši kot v primeru manjšega dodatka H_2O_2 .

5.1.2. Terapevtska in povišana koncentracija PEU

Pri 48 urnem izpostavljanju celic različnim PEU v terapevtskih in povišanih koncentracijah ob koncu inkubacije med kontrolnimi in s PEU izpostavljenimi vzorci nismo opazili razlik v živosti celic. Pri CBZ 50 mg/L smo opazili trend proti zmanjšanju živosti v primerjavi s kontrolo.

Pri primerjavi števila celic ob koncu in začetku inkubacije smo pri CBZ opazili od koncentracije odvisen upad njihovega števila. Pri višji koncentraciji CBZ je bil upad števila celic večji. Pri koncentraciji 50 mg/L je bilo število celic po 48 urah značilno nižje od kontrolnih vzorcev. CBZ kljub temu da na živost celic značilno ne vpliva, delno onemogoča proliferacijo celic, čemur bi lahko doprinesel povečan oksidativni stres. Pri TOP in LEV pri terapevtski ter povišani koncentraciji v primerjavi s kontrolo nismo opazili sprememb v odstotku živih celic ali njihovem številu.

5.1.3. Terapevtska in povišana koncentracija kombinacije PEU

Pri 48 urnem izpostavljanju celic različnim kombinacijam PEU v terapevtskih koncentracijah ob koncu inkubacije nismo opazili razlik v živosti celic med kontrolnimi in s PEU izpostavljenimi vzorci. Pri povišanih koncentracijah kombinacije CBZ s TOP ali LEV pa smo opazili trend proti zmanjšanju živosti v primerjavi s kontrolo. Podobno kot pri posameznih PEU, CBZ s koncentracijo 50 mg/L tudi v kombinaciji s TOP ali LEV zmanjša živost celic v primerjavi s kontrolo.

Pri primerjavi števila celic ob koncu in začetku inkubacije smo pri CBZ 10 mg/L + TOP 10mg/L opazili značilen porast števila celic v primerjavi s kontrolo, kar nakazuje na medsebojni vpliv posameznih PEU na povečanje proliferacije celic. Pri povišanih koncentracijah smo opazili enak trend proti zmanjšanju števila celic kot pri CBZ 50 mg/L, kar namiguje na prevladajoč vpliv CBZ na zmanjšanje proliferacije celic, vendar razlika ni bila značilna.

5.2. PRESNOVNA AKTIVNOST CELIC MERJENIH Z REAGENTOM MTS

MTS test smo preko ocene presnovne aktivnosti celic uporabili kot pokazatelj živosti oziroma njihove rasti pod vplivom PEU. Ker smo celice po dodatku PEU inkubirali 48 ur, smo pričakovali, da se bodo vsaj enkrat delile.

Pri celicah, ki smo jih izpostavili TOP in LEV v koncentracijah med 1 in 200 mg/L, nismo opazili razlik v presnovni aktivnosti v primerjavi s kontrolo. TOP in LEV torej v testiranih koncentracijah ne vplivata na živost in proliferacijo celic RAMOS, kar smo potrdili tudi s štetjem celic pri inkubiranju celic 48 ur s PEU. Pri CBZ smo opazili od koncentracije odvisno zmanjšanje presnovne aktivnosti. Ambrosio in sod. so pri dodatku CBZ kulturi

nevronov hipokampa Wistar podgan prav tako opazili padec razgradnje MTT v odvisnosti od dodane koncentracije CBZ (50). Pri pregledu kultur pod invertnim mikroskopom smo opazili, da je CBZ pri koncentracijah 100 in 200 mg/L zaradi slabše topnosti v mediju RPMI z dodatki tvoril kristale, ki bi lahko poškodovali membrane celic in tako vplivali na njihovo živost.

Poleg inkubacije celic s posameznimi PEU smo testirali tudi vse njihove kombinacije. Kombinacija TOP in LEV v koncentracijah od 1 do 200 mg/L ni prispevala k spremembji presnovne aktivnosti celic, kar pomeni da poleg tega, da posamezni entiteti ne vplivata na presnovno aktivnost celic, tudi v kombinaciji ne izkazujeta sinergističnega učinka. Pri kombinaciji CBZ z LEV ali TOP pa smo opazili enako znižanje presnovne aktivnosti v odvisnosti od koncentracije CBZ kot pri izpostavljanju samo CBZ. Potrebno je poudariti tudi, da smo kristale CBZ pri obeh kombinacijah opazili šele pri koncentracijah 200 mg/L, pri koncentraciji 100 mg/L pa le ti niso nastali, kar je drugače kot v primeru inkubacije samo z CBZ. Do te razlike je verjetno prišlo zaradi večje količine dodanega topila DMSO v primeru kombinacij (dvakrat več) in posledično boljše topnosti CBZ. Na podlagi teh rezultatov domnevamo, da je presnovna aktivnost celic pri samem CBZ 100 mg/L navidezno prenizka.

5.3. REZULTATI MERITEV MDA, GSH IN GSSG

Rezultate smo izrazili na število celic, ki smo jih ob koncu inkubacije zamrznili.

5.3.1. Razvoj metode določanja MDA

Osnovna metoda za določanje MDA je bila razvita na katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko in je bila večkrat uporabljena v diplomskih nalogah (43, 51, 52). Ta je zaradi dolgotrajnega postopka derivatizacije in potrebe ekstrakcije z uporabo organskih topil manj zanesljiva. Po ponovnem pregledu literature smo razvili novo metodo na podlagi članka Czauderna in sod., pri kateri ekstrakcija z organskimi topili ni potrebna (42). Zaobarjanje proteinov smo namesto raztopine perklorne kisline, ki je močan oksidant, uporabili vodno raztopino TCA, ki je manj nevarna za rokovanie, vendar vseeno zelo učinkovit obarjalni reagent. Prav tako smo zamenjali derivatizacijski reagent DNPH, tako da smo namesto trdne oblike za pripravo raztopine uporabili že pripravljeno raztopino DNPH. Z zamenjavami reagentov nam je uspelo zmanjšati odzive v slepih vzorcih, ki so nam ob uporabi prvotne metode onemogočali določanje koncentracij MDA v naših

vzorcih. Ob tem smo dobili dobro ponovljivost in točnost odzivov tako na HPLC sistemu z ultravijolično detekcijo kot tudi pri LC z detekcijo na masnem spektrometru. Optimizirani postopek priprave vzorcev je predstavljen v poglavju 3.4.1.

5.3.2. Razvoj metode določanja GSH in GSSG

Osnovno metodo za določanje GSH in GSSG so razvili na katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko (53). Metoda veleva različna postopka priprave vzorcev za določanje GSH ali GSSG, zato lahko pride med meritvami do variabilnosti. Prav tako pri določanju GSSG z zgoraj omenjeno metodo pri umeritveni premici nismo dobili linearnih odzivov in ponovljivosti. Po pregledu literature smo se odločili za razvoj nove metode s hkratnim določanjem GSH in GSSG v vzorcu z metodo LC-MS/MS (44, 45, 46). Postopek smo optimizirali z izborom ustrezne kolone, mobilne faze in z določitvijo masnih prehodov s pomočjo programske opreme Agilent MassHunter Workstation®. Kot obarjalni reagent proteinov smo uporabili acetonitril, ki se je izkazal kot boljša izbira v primerjavi s TCA, saj je poleg dobrega obarjanja hkrati tudi povečal učinek ionizacije na masnem spektrometru. Celice smo lizirali s postopkom odmrzovanja in odtaljevanja, uspešnost lize pa smo preverili z dodatnim 10 sekundnim sonificiranjem. Razlik nismo opazili. S postkolonskim dovajanjem acetonitrila v razmerju 1:1 smo še dodatno povečali odziv tako za GSH kot tudi GSSG. GSSG zaradi nizke vsebnosti v naših vzorcih oziroma visokega odziva v slepem vzorcu nismo mogli kvantificirati. Optimizirani postopek in pogoji analize so predstavljeni v poglavju 3.5.

5.3.3. Pozitivna kontrola

Celice, ki smo jih eno uro inkubirali z 1 mM H_2O_2 so vsebovale značilno večjo količino MDA v primerjavi s kontrolo, medtem ko se je količina pri inkubaciji celic z 2 mM H_2O_2 sicer povečala v primerjavi s kontrolo, vendar ni dosegla mej statistične značilnosti. Količina MDA se je v našem primeru v eni uri podvojila, medtem ko so Marini in sod. pri štiriurnem izpostavljanju podganjih makrofagov 0,25 mM H_2O_2 ugotovili do stokratno povečanje MDA (51). Celičnih kultur po enournem izpostavljanju zaradi časovnih omejitev nismo prešteli, vendar smo pri optičnem pregledu z raztopino tripanskega modrila ugotovili, da je inkubacija celic z 2 mM H_2O_2 močno poškodovala celice, ki so se tekom spiranja in centrifugiranja po vsej verjetnosti izgubile, rezultati meritev pa so bili zato sorazmerno nižji kot pri vzorcih z 1 mM H_2O_2 . Mitozo in sod. so pri enourni inkubaciji rezin hipokampusa podgan s koncentracijo 1 mM H_2O_2 ugotovili do 25 odstotno

zmanjšanje presnovne aktivnosti v primerjavi s kontrolo in do 50 odstotno zmanjšanje pri koncentraciji 3 mM (29), kar je posledica manjše živosti celic. Za določanje presnovne aktivnosti smo uporabili MTS test.

Pri daljših inkubacijah smo zato uporabili nižje koncentracije H₂O₂. Tridnevna inkubacija celic s 0,05 mM H₂O₂ je v primerjavi s kontrolo za več kot dvakrat povečala količino MDA v celicah, inkubacija z 0,1 mM H₂O₂ pa za več kot trikrat. Oba porasta sta bila statistično značilna. Prav tako je bila značilna razlika med porastom MDA pri celicah izpostavljenim 0,05 mM H₂O₂ vs. 0,1 mM H₂O₂. Rezultati so skladni z ugotovitvami He in sod., ki so po 48 urni inkubaciji izoliranih PBMC zdravih darovalcev s 0,02 mM terc-butilhidroperoksida izmerili 2,5-krat višjo koncentracijo MDA (55).

Celice, ki smo jih eno uro inkubirali z H₂O₂, so z naraščajočo koncentracijo H₂O₂ vsebovale manjšo količino GSH, le-ta je bil pri koncentraciji 2 mM značilno nižji od kontrole. 72 urna inkubacija celic s 0,05 mM H₂O₂ pa je v primerjavi s kontrolo značilno povečala količino GSH v celicah, kar je v nasprotju s pričakovanimi rezultati. Podobne rezultate so opazili v nekaterih študijah. Ray in sod. so pri poskusih na humanih bronhialnih epitelnih celicah, ki so jih izpostavili menadionu (povzroča nastanek ROS kot so superoksidni radikal in H₂O₂), ugotovili koncentracijsko in časovno odvisen upad količine GSH v celicah v dveh urah po dodatku menadiona. Po odstranitvi menadiona pa so po dvanajstih urah ugotovili značilen porast aktivnosti encima γ -GCS ter količino GSH, ki je po bil po 24-ih urah povišan tudi do dvakrat (32). Prav tako so Navarro in sod. pri obsevanju miš z x-žarki, ki povzročajo nastajanje hidroksilnega radikala v celicah, dve uri po izpostavljanju zaznali upad količine GSH v organih, po 24 urah pa se je količina GSH v srcu in jetrih značilno povečala v primerjavi s stanjem pred obsevanjem (56). Najverjetnejše torej celica po prvotnem upadu GSH prilagodi in poveča tvorbo GSH.

Izpostavljanje celic 0,1 mM H₂O₂ zaradi majhnega števila vzorcev ni značilno povečalo količine GSH v primerjavi s kontrolo. Opazili smo tudi, da trend spremembe količine GSH v celicah glede na koncentracijo H₂O₂ ni enak trendu naraščanja MDA, saj smo pri 0,1 mM H₂O₂ določili manjšo količino GSH kot pri 0,05 mM H₂O₂.

5.3.4. Karbamazepin

Izpostavljanje celic CBZ s koncentracijo 10 mg/L je značilno povečalo koncentracijo MDA v primerjavi s kontrolo, medtem ko pri izpostavitvi celic koncentraciji 50 mg/L

razlik ni bilo. V literaturi najdemo nasprotujoče rezultate glede vpliva CBZ na MDA. Pahuja in sod. so pri poskusih na podganah, ki so jim z elektrošokom inducirali napade, testirali učinke CBZ na MDA v homogenatu možganov. Ugotovili so, da je CBZ v terapevtskem odmerku (približno 6 mg/L) značilno znižal nivo MDA v primerjavi z neizpostavljenou kontrolo, medtem ko se pri sub-terapevtskem odmerku (približno 3 mg/L) nivo MDA ni znižal (57). Nedavno objavljena študija na pacientih z epilepsijo, kjer so primerjali serumsko koncentracijo MDA nezdravljenih in z CBZ zdravljenih pacientih, je pokazala, da CBZ ne vpliva na spremembo serumske koncentracije MDA (58). Verotti in sod. so v prospektivni študiji opazovali aktivnost encimov GP in SOD, ki sta pomembna encimska antioksidanta in lahko vplivata na nivo GSH in MDA. Po enoletni terapiji s CBZ niso zaznali značilnih sprememb v aktivnosti encimov (59).

Koncentracija GSH se pri inkubaciji celic s terapevtsko koncentracijo CBZ ni spremenila. Pri dodatku 50 mg/L CBZ smo opazili trend padanja količine GSH ($p = 0,18$). Razmerje med GSH in GSSG je bilo v primerjavi s kontrolo znižano tako pri dodatku terapevtske kot tudi povisane koncentracije CBZ. Arora in sod. so v možganih podgan po enajst tedenskem dodajanju CBZ izmerili znižano koncentracijo GSH, ki pa ni bila statistično značilna (60).

5.3.5. Topiramat

Izpostavljanje celic TOP s koncentracijo 10 mg/L ni povzročilo sprememb v koncentraciji MDA v primerjavi s kontrolo, medtem ko smo pri izpostavljanju s 50 mg/L TOP izmerili značilno znižanje koncentracije MDA v primerjavi s kontrolo. Demirci in sod. so pri poskusih na nevronalem modelu iz podganje celične linije opazovali vplive TOP na oksidativni stres. Ugotovili so, da pri terapevtski koncentraciji TOP (okoli 3,4 mg/L) ni prišlo do sprememb v količini MDA v primerjavi s kontrolo. Je pa TOP preprečil nastajanje MDA ob dodatku 0,1 mM H₂O₂ v primerjavi s skupino brez TOP (61). Cárdenas-Rodríguez in sod. so na različnih humanih rakavih celičnih linijah dokazali, da TOP lovi različne ROS kot so superoksidni in hidroksilni radikal, hipoklorna kislina, vodikov peroksid in singletni kisik v odvisnosti od njegove koncentracije (62).

Pri izpostavljanje celic TOP s koncentracijo 10 mg/L smo zaznali trend upadanja količine GSH v primerjavi s kontrolo ($p = 0,17$), medtem ko je bil pri koncentraciji 50 mg/L upad količine v primerjavi s kontrolo blizu signifikance ($p = 0,07$). V študiji na podganji celični liniji se količina GSH ob dodatku terapevtske količine TOP ni spremenila, medtem ko je

ob dodatku 0,1 mM H₂O₂ preprečila padec GSH (61). Razmerje GSH / GSSG je pri izpostavljanju celic TOP s koncentracijo 10 mg/L v primerjavi s kontrolo ostalo nespremenjeno, medtem ko smo pri koncentraciji 50 mg/L opazili trend povečanja.

5.3.6. Levetiracetam

Izpostavljanje celic LEV v koncentraciji 25 mg/L in 100 mg/L ni povzročilo sprememb v koncentraciji MDA v primerjavi s kontrolo. Oliveira in sod. so v homogenatu dela možganov miši, ki so jim dajali LEV, ugotovili, da prisotnost LEV v primerjavi s kontrolo prav tako ne poveča koncentracije MDA (63).

Izpostavljanje celic LEV v koncentraciji 25 mg/L ni povzročilo sprememb v koncentraciji GSH v primerjavi s kontrolo. Pri koncentraciji 100 mg/L smo opazili znižanje koncentracije GSH, ki pa ni bilo značilno ($p = 0,16$). Razmerje GSH / GSSG je pri obeh testiranih koncentracijah LEV ostalo nespremenjeno. Poskusi na miših in podganah so pokazali, da LEV v homogenatu različnih delov možganov ne povzroči padca koncentracije GSH. Tudi po indukciji epileptičnega napada z različnimi načini je LEV značilno zmanjšal porabo GSH v primerjavi s kontrolo (54, 63).

5.3.7. Kombinacija PEU

Izpostavljanje celic kombinaciji CBZ in TOP v terapevtski koncentraciji v primerjavi s kontrolo ni povzročilo statistično značilnih sprememb v količini nastalega MDA, opazili pa smo trend proti zmanjšanju ($p = 0,14$). Tudi količina GSH se v primerjavi s kontrolo ni spremenila.

Pri izpostavljanju celic kombinaciji CBZ in TOP v povišani koncentraciji nismo opazili sprememb v količini nastalega MDA v primerjavi s kontrolo. Količina GSH se je v primerjavi s kontrolo zmanjšala ($p = 0,1$). Pri terapevtski in povišani koncentraciji smo opazili trend proti zmanjšanju razmerja GSH / GSSG v primerjavi s kontrolo.

Izpostavljanje celic kombinaciji CBZ in LEV v terapevtski koncentraciji ni povzročilo sprememb v količini MDA ali GSH v primerjavi s kontrolo. Prav tako pri izpostavljanju celic povišani koncentraciji izbranih PEU nismo opazili sprememb v količini MDA v primerjavi s kontrolo. Izmerili pa smo manjšo količino GSH v primerjavi s kontrolo, rezultati pa so bili blizu signifikance ($p = 0,06$). Varoglu in sod. so v študiji na bolnikih z epilepsijo opazovali kazalnike oksidativnega stresa, ki so jih primerjali z zdravi

prostovoljci. Odkrili so, da CBZ v kombinaciji z LEV ni spremenil antioksidantno/oksidantnega razmerja v primerjavi z monoterapijo CBZ (64).

Rezultati nakazujejo, da kombinacije PEU ne vplivajo na koncentracijo MDA, opazili pa smo trend upadanja GSH in posledičnega zniževanja redoks potenciala celic.

6. SKLEPI

V diplomski nalogi smo optimizirali pogoje izpostavljanja celic PEU v celični kulturi RAMOS. Določili smo maksimalen čas izpostavljanja celic, ki je znašal 48 h. S pomočjo MTS testa smo ocenili vpliv PEU in njihovih kombinacij v širokem koncentracijskem razponu na živost ter proliferacijo celic.

Uspelo nam je vzpostaviti model pozitivne kontrole na celični liniji RAMOS z uporabo vodikovega peroksida. Izpostavljanje celic 0,05 mM in 0,1 mM H₂O₂ je po 72 urah v celicah povečalo količino kazalnika oksidativnega stresa MDA. Nasprotno s pričakovanji je koncentracija GSH v celicah ob dodatku H₂O₂ narasla, kar namiguje na prilagoditev celic s povečano sintezo GSH. Pri enournem izpostavljanju celic 1 mM koncentraciji H₂O₂ smo opazili pričakovan padec koncentracije GSH in povečanje nastalega MDA.

Ugotovili smo, da dodatek CBZ, TOP, LEV ali kombinacij PEU ne vpliva na živost celic. CBZ je imel koncentracijsko odvisen vpliv na zmanjšanje proliferacije celic RAMOS. Kombinacija CBZ s TOP ali LEV ni značilno zmanjšala proliferacije, kar namiguje na zaščitno delovanje TOP oziroma LEV.

Pri izpostavljanju celic terapevtskim koncentracijam CBZ smo izmerili značilno povečanje količine MDA v celicah. TOP v preskušanih koncentracijah ne vpliva na nastanek lipidne peroksidacije. Opazili smo negativni trend zmanjšanja koncentracije GSH v celicah v odvisnosti od koncentracije TOP. Kombinacija terapevtskih koncentracij CBZ s TOP ali LEV v primerjavi s kontrolo ni povzročilo sprememb v količini MDA ali GSH.

Razvili smo nov postopek derivatizacije MDA, pri katerem ni potrebno izvajati ekstrakcije z organskimi topili. Postopek derivatizacije je primeren tako za ultravijolično detekcijo kot tudi detekcijo z MS. S postopkom derivatizacije smo dobili dobro ponovljive ter točne rezultate.

Prav tako smo razvili postopek določanja koncentracije GSH in GSSG v vzorcih. Postopek priprave vzorcev je kratek in tehnično nezahteven. Metoda tekočinske kromatografije ter detekcije je hitra in omogoča hkratno določanje GSH in GSSG v vzorcih. Za kvantitativno meritev GSSG bi bilo potrebno povečati število celic v vzorcih, saj je večina vsebovala manjšo koncentracijo GSSG kot je bila meja določljivosti.

Rezultati nakazujejo, da CBZ v terapevtski koncentraciji povzroča oksidativni stres, ki ga lahko zaznamo s spremeljanjem kazalnikov kot je MDA. Kombinacija CBZ s TOP ali LEV ne povzroča oksidativnega stresa, kar bi lahko imelo pri zdravljenju epilepsije določene prednosti, vendar so za dokončno potrditev potrebni še dodatni in vitro ter in vivo poskusi.

7. LITERATURA

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: Rang and Dale's Pharmacology, 7th edition. Elsevier limited, 2011: 540-551.
2. Tan TY, Lu CH, Chuang HY, Lin TK, Liou CW, Chang WN, Chuang YC: Long-term antiepileptic drug therapy contributes to the acceleration of atherosclerosis. *Epilepsia* 2009; 50: 1579-86.
3. Kudin AP, Zsurka G, Elger CE, Kunz WS: Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2009; 218: 326-332.
4. DeLorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS: Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: The calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 2005; 105: 229-266.
5. Kannoth S, Unnikrishnan JP, Santhosh KT, Sankara SP, Radhakrishnan K: Risk factors for epilepsy: A population-based case-control study in Kerala, southern India. *Epilepsy Behav* 2009; 16: 58-63.
6. Martinc B, Grabnar I, Vovk T: The role of reactive species in epileptogenesis and influence of antiepileptic drug therapy on oxidative stress. *Curr Neuropharmacol* 2012; 10: 328-343.
7. 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: 470-472.
8. Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of medicinal chemistry, 6th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2007: 521-546.
9. Reynolds J: Martindale, the extra pharmacopeia, 36th ed. London, The Pharmaceutical Press, 2009: 465-477, 488-489 ,506-508.
10. Zgonc V, Čebular B: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Zdravniški vestnik* 2006; 75: 379-388.
11. Brodie MJ: Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* 2010; 19: 650-655.
12. Bialer M, White HS: Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 68-82.

13. <http://en.wikipedia.org> (dostopno: december 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: 1239-1276.
15. Anderson GD: Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic targeted therapy of antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 173-180.
16. Čebular B, Zgonc V: Posebnosti zdravljenja epilepsije pri starejših. *Zdravniški vestnik* 2007; 76: 473-479.
17. Isoherranen N, Yagen B, Soback S, Roeder M, Schurig V, Bialer M: Pharmacokinetics of levetiracetam and its enantiomer (R)- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide in dogs. *Epilepsia* 2001; 42: 825–830.
18. Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247.
19. Bošković M, Vovk T, Kores Plesničar B, Grabnar I: Oxidative stress in schizophrenia. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9: 301-312.
20. Aguiar CCT, Almeida AB, Araujo PVP, Abreu RNDC, Chaves EMC, Vale OC, Macedo DS, Woods DJ, Fonteles MMF, Vasconcelos SMM: Oxidative stress and epilepsy: Literature review. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 795259.
21. Devi PU, Manocha A and Vohora D: Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9: 3169-3177.
22. Halliwell B: Free radicals and other reactive species in disease. *eLS* 2005; doi: 10.1038/npg.els.0003913.
23. Mravljak J, Mašič LP: Resnice in polresnice o antioksidantih. Fakulteta za farmacijo, Prehranska dopolnila II, 2010.
24. Pečar S: Ultravijolični stres in fotostaranje. Fakulteta za farmacijo, Kozmetologija II, Koža in sonce: Kozmetično aktivne sestavine, 2012.
25. Waldbaum S, Patel M: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy?. *J Bioenerg Biomembr* 2010; 42: 449-55.

26. Boyer R: Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 450-465.
27. Jomova K, Valko M: Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011; 283: 65-87.
28. Gomes EC, Silva AN, Oliveira MR: Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 756132.
29. Mitozo PA, Souza de LF, Loch-Neckel G, Flesch S, Maris AF, Figueiredo CP, Santos dos ARS, Farina M, Dafre AL: A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 69-77.
30. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine, 4th edition. Oxford University Press, 2007: 21-23, 79-121, 187-260.
31. Rio DD, Stewart AJ, Pellergini N: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15: 316-28.
32. Ray S, Watkins DN, Misso NLA, Thompson PJ: Oxidant stress induces gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in human bronchial epithelial NCI-H292 cells. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 571-7.
33. Ogasawara Y, Funakoshi M, Ishii K: Determination of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate concentration using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: ratio of the reduced form as a biomarker of oxidative stress. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 1819-23.
34. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK: From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 775-806.
35. Zsurka G, Kunz WS: Mitochondrial dysfunction in neurological disorders with epileptic phenotypes. *J Bioenerg Biomembr* 2010 ;42: 443-8.
36. Aycicek A, Iscan A: The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. *Eur Neurol* 2007; 57: 65-69.

37. 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. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 1820-1824.
38. Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T: Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci* 2012; 130: 4-16.
39. Andrejc D: Indukcija apoptoze v humanih celičnih linijah limfocitov B s stimulacijo receptorja EP4, diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
40. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods* 1993; 157: 233-40.
41. <http://www.promega.com> (dostopno december 2012)
42. Czauderna M, Kowalczyk J, Marounek M: The simple and sensitive measurement of malondialdehyde in selected specimens of biological origin and some feed by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 2251-8.
43. Titan A: Določanje malondialdehida v plazmi konj z derivatizacijskimi metodami in tekočinsko kromatografijo, diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011.
44. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R: Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 785: 263-75.
45. Camera E, Rinaldi M, Briganti S, Picardo M, Fanali S: Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 757: 69-78.
46. Squellerio I, Caruso D, Porro B, Veglia F, Tremoli E, Cavalca V: Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 71: 111-8.

47. ICH Topic Q 2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Step 5: Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology, European Medicines Agency, London, 2006.
48. Lee Y, Shacter E: Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 19792-8.
49. <http://www.atcc.org> (dostopno december 2012)
50. Ambrosio AF, Silva AP, Araujo I, Malva JO, Soares-da-Silva P, Carvalho AP, Carvalho CM: Neurotoxic / neuroprotective profile of carbamazepine, oxcarbazepine and two new putative antiepileptic drugs, BIA 2-093 and BIA 2-024. *Eur J Pharmacol* 2000; 406: 191-201.
51. Šparakl J: Razvoj metode HPLC za vrednotenje lipidne peroksidacije z določanjem malondialdehida v plazmi, diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
52. Pibernik N: Spremljanje oksidativnega stresa v perifernih mononuklearnih celicah, izpostavljenih protiepileptičnim učinkovinam prve in druge generacije, diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2012.
53. Kolar S: Razvoj analizne metode za določanja plazemskih koncentracij oksidirane in reducirane oblike glutationa s pomočjo fluorescenčnih ligandov, diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
54. 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 Sci* 2004; 74: 1253-1264.
55. He SH, Wu B, Chang XM, Li HX, Qiao W: Effects of selenium on peripheral blood mononuclear cell membrane fluidity, interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in patients with chronic hepatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3531-3.
56. Navarro J, Obrador E, Pellicer JA, Asensi M, Vina J, Estrela JM: Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1203-9.

57. Pahuja M, Kleekal T, Reeta KH, Tripathi M, Gupta YK: Interaction profile of *Zizyphus jujuba* with phenytoin, phenobarbitone, and carbamazepine in maximal electroshock-induced seizures in rats. *Epilepsy Behav* 2012; 25: 368-73.
58. Menon B, Ramalingam K, Kumar RV: Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. *Seizure* 2012; 21: 780-4.
59. Verotti A, Basciani F, Trotta D, Pomilio MP, Morgese G, Chiarelli F: Serum copper, zinc, selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in epileptic children before and after 1 year of sodium valproate and carbamazepine therapy. *Epilepsy Res* 2002; 48: 71-5.
60. Arora T, Mehta AK, Sharma KK, Mediratta PK, Banerjee BD, Garg GR, Sharma AK: Effect of carbamazepine and lamotrigine on cognitive function and oxidative stress in brain during chemical epileptogenesis in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; 106: 372-7.
61. Demirci S, Kutluhan S, Naziroğlu M, Uğuz AC, Yürekli VA, Demirci K: Effects of selenium and topiramate on cytosolic $\text{Ca}^{(2+)}$ influx and oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Neurochem Res* 2013; 38: 90-7.
62. Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E, Huerta-Gertrudis B, García-Cruz ME, Pedraza-Chaverri J, Coria-Jiménez R, Bandala C, Ruíz-García M: Antioxidant activity of topiramate: an antiepileptic agent. *Neurol Sci* 2012; DOI 10.1007/s10072-012-1127-5.
63. Oliveira AA, Almeida JP, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LM, Júnior HV, Fonseca FN, Viana GS, Sousa FC, Fontelles MM: Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27: 395-406.
64. Varoglu AO, Yildirim A, Aygul R, Gundogdu OL, Sahin YN: Effects of valproate, carbamazepine, and levetiracetam on the antioxidant and oxidant systems in epileptic patients and their clinical importance. *Clin Neuropharmacol* 2010; 33: 155-7.