

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



BLAŽ ROBNIK

**VREDNOTENJE OZNAČEVALCEV OKSIDATIVNEGA STRESA V
CELICAH, IZPOSTAVLJENIH PROTIEPILEPTIČNIM
UČINKOVINAM**

**EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN CELLS,
EXPOSED TO ANTI-EPILEPTIC AGENTS**

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložbo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič Raščan, mag. farm.

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorju doc. dr. Tomažu Vovku, mag. farm., somentorici prof. dr. Ireni Mlinarič Raščan, mag. farm. in delovni mentorici Tijani Markovič, mag. farm. za številne strokovne nasvete, potrpežljivost in dostopnost pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se doc. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za pomoč pri MS analizi ter vsem ostalim zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi kakorkoli pomagali pri raziskovalnem delu.

Iskrena hvala staršem, da so mi omogočili študij ter me podpirali v teh letih. Hvala Zala za pomoč in podporo.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič Raščan, mag. farm.

Ljubljana, september 2013

Blaž Robnik

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

1.	UVOD.....	1
1.1.	OKSIDATIVNI STRES	1
1.1.1.	Reaktivne spojine.....	1
(i)	Najpomembnejše neradikalske vrste kisika	2
(ii)	Najpomembnejše radikalske vrste kisika.....	3
(iii)	Prehodne kovine in Fentonova reakcija	4
1.1.2.	Povečan nastanek oksidativnega stresa (4).....	5
(i)	Dejavniki okolja.....	5
(ii)	Spremembe metabolizma.....	6
(iii)	Zmanjšana antioksidativna zaščita.....	8
1.2.	EPILEPSIJA IN PEU.....	9
1.2.1.	Epilepsija	9
1.2.2.	PEU	10
(i)	Karbamazepin	10
(ii)	Topiramat.....	11
(iii)	Levetiracetam.....	12
1.3.	POVEZAVE EPILEPSIJE IN OKSIDATIVNEGA STRESA.....	12
1.3.1.	Zmanjšana antioksidativna zaščita.....	13
1.3.2.	Mitohodrijska disfunkcija	13
1.3.3.	Redoks-aktivni elementi	14
1.3.4.	Arahidonska kislina	14
1.3.5.	Staranje	14
1.4.	PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA IN OKSIDATIVEN STRES	15
2.	NAMEN.....	16
3.	MATERIALI IN METODE.....	17
3.1.	MATERIALI	17
3.2.	BIOLOŠKI MATERIAL	20
3.3.	METODE.....	20
3.3.1.	Metode dela s celicami	20
3.3.2.	Priprava osnovnih raztopin protiepileptičnih učinkovin.....	21
3.3.3.	Izolacija perifernih mononuklearnih celic	21
(i)	Iz trombocitno-levkocitne plasti krvi (BC).....	21
(ii)	Iz venske krvi.....	22

3.3.4. Štetje celic.....	23
3.3.5. Odmrzovanje in gojenje celic	24
3.3.6. Izpostavljanje celic PEU	24
3.3.7. Zamrzovanje celičnih pelet	25
3.3.8. Priprava celičnega lizata za analizo	25
3.3.9. Določanje proteinov z metodo po Bradfordu.....	25
3.3.10. MTS test za določanje presnovne aktivnosti	27
3.3.11. Določanje malondialdehida v celicah z LC-MS/MS metodo in predhodno derivatizacijo z DNPH	29
3.3.12. Določanje glutationa v celicah z LC-MS/MS metodo.....	32
3.3.13. Obdelava podatkov in statistična analiza.....	35
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	36
4.1. VPLIV PROUČEVANIH PEU NA PRESNOVNO AKTIVNOST CELIC	36
4.2. UGOTAVLJANJE TOKSIČNIH UČINKOV PEU S POMOČJO ODSTOTKA PREŽIVELIH CELIC	39
4.2.1. Nizke in visoke koncentracije PEU	40
4.2.2. Nizke in visoke koncentracije kombinacij PEU	42
4.3. REZULTATI MERITEV MDA IN GSH	44
4.3.1. Optimizacija metod za določanje izbranih označevalcev oksidativnega stresa...	44
4.3.2. Nizka in visoka koncentracija PEU	47
(i) Karbamazepin	49
(ii) Topiramat.....	50
(iii) Levetiracetam.....	51
4.3.3. Nizke in visoke koncentracije kombinacij PEU	51
(iv) Kombinacija PEU	53
5. SKLEPI	55
6. LITERATURA	56

SEZNAM OKRAJŠAV

BC	Trombocitno-levkocitna plast krvi (angl. buffy coat)
CBZ	Karbamazepin
CTRL	Netretirana kontrola
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
GSH	Reduciran glutation
GSSG	Oksidiran glutation
ILAE	International League Against Epilepsy
LAF	Laminarni pretok zraka (laminar air flow)
LEV	Levetiracetam
MDA	Malondialdehid
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
OR	Osnovna raztopina
PBMC	Periferne mononuklearne celice
PBS	Fosfatni pufer
PEU	Protiepileptične učinkovine
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti
RS	Reaktivne zvrsti
SOD	Superoksid dismutaza
TOP	Topiramat
VAL	Valprojska kislina

POVZETEK

Epilepsijo in epileptične napade se v zadnjih letih vse bolj povezuje z oksidativnim stresom. Ob epileptičnih napadih se znatno poveča količina reaktivnih spojin v možganih. Ni povsem jasno, ali je oksidativni stres vzrok ali posledica epilepsije, najverjetneje pa gre za prepletost obeh. Poškodbe, ki nastanejo ob epileptičnih napadih, pripomorejo k napredovanju bolezni, zato je smiseln razmišljati v smeri zdravljenja, ki bi oksidativni stres omililo. Protiepileptične učinkovine (PEU) imajo različne mehanizme delovanja. Nekatere med njimi naj bi imele tudi nevroprotективno vlogo in zmanjšale oksidativni stres. Predvsem za protiepileptične učinkovine prve generacije velja, da se presnavljajo do reaktivnih metabolitov in na ta način bi lahko bolezen še dodatno poslabšala.

V diplomskem delu smo preučevali vpliv PEU na oksidativni stres. Poskuse smo osnovali na primarnih celicah limfocitov B štirih zdravih prostovoljcev. Celice smo izpostavili terapevtskim in višjim koncentracijam karbamazepina (CBZ), topiramata (TOP) in levetiracetama (LEV) ter kombinacijam CBZ s TOP in LEV. Po 48 urni inkubaciji smo celice šteli, jim določali presnovno aktivnost, za naše analize bioloških označevalcev oksidativnega stresa pa smo jih zamrznili v obliki pelet in jih ponovno odmrznili ob času analize. Tako pripravljene celice smo lizirali in jih odcentrifugirali ter v supernatantu pomerili koncentraciji označevalcev. Proces lipidne peroksidacije smo opredelili s pomočjo malondialdehida (MDA), ki je eden izmed končnih produktov oksidacije membran celic. Status celičnih antioksidantov smo določili z določevanjem koncentracij glutationa (GSH). GSH je namreč endogeni antioksidant, ki glede na svoje redoks stanje odraža porušeno razmerje med oksidanti in antioksidanti v celici.

Živost celic in zmanjšana presnovna aktivnost kažeta na to, da je CBZ za celice v povišanih koncentracijah lahko toksičen, v manjši meri pa tudi njegove kombinacije s TOP in LEV. Pri terapevtskih koncentracijah CBZ in drugih protiepileptičnih učinkovinah takšnih razlik nismo zaznali. Prav tako večjih sprememb nismo zaznali pri rezultatih meritev MDA in GSH. Do trenda povišanja koncentracij MDA je prišlo le pri terapevtskih koncentracijah CBZ. Pri terapevtskih koncentracijah TOP in LEV ter pri povišanih koncentracijah oziroma njihovih kombinacij teh trendov nismo zaznali. CBZ verjetno v celicah povzroči oksidativni stres, vendar bi za dokončno potrditev bilo potrebno izvesti

dodatne poskuse. Kombinacije CBZ s TOP ali LEV ne kažejo povišanega oksidativnega stresa v celicah, kar bi lahko za samo zdravljenje epilepsije imelo velik pomen.

ABSTRACT

In recent years epilepsy and epileptic seizures have been increasingly associated with oxidative stress. During seizures, the amount of reactive compounds in the brain is significantly increased. It is not clear whether oxidative stress is a cause or a consequence of epilepsy; most likely it is a combination of both. Damages resulting from epileptic seizures contribute to the progression of the disease, which is why it is reasonable to consider treatment directions that moderate oxidative stress. Antiepileptic drugs work in various ways. Some of them purportedly also have a neuroprotective role and reduce oxidative stress. Especially first-generation of antiepileptic agents are metabolized to reactive metabolites, which means that they could thereby further aggravate the disease.

The aim of our work was to investigate the effect of antiepileptic drugs on oxidative stress. Experiments were conducted using the B lymphocyte cells of four healthy volunteers as a basis. Cells were exposed to therapeutic and elevated concentrations of carbamazepine (CBZ), topiramate (TOP) and levetiracetam (LEV), and their combinations with CBZ. After 48 hours of incubation, the percentage of surviving cells and their metabolic activity was determined. The cells were frozen in pellet form afterward and thawed at the time of analysis. The cells were then lysed and centrifuged and two markers of oxidative stress were measured in the supernatant concentration. Malondialdehyde (MDA) is one of the end products of lipid peroxidation and was measured as indicator of damage to cell membranes. The redox status of cellular antioxidants was determined by measuring glutathione (GSH) concentration. GSH is an endogenous antioxidant that according to the redox state reflects the disrupted relationship between oxidants and antioxidants in the cell.

The results of the percentage of surviving cells and reduced metabolic activity suggest that the CBZ for cells in elevated concentrations is moderately toxic, as is its combination with TOP and LEV. In therapeutic concentrations, there were no great differences in cell survival between CBZ and other antiepileptic agents. Neither were significant changes observed in the measurement results for MDA and GSH. Only in therapeutic concentrations of CBZ a trend in increased MDA concentrations was observed. In therapeutic concentrations of TOP and LEV, as well as at higher concentrations or combinations, such trend was not observed. Though it appears that CBZ probably provokes oxidative stress for cells, it would be advisable to carry out further research in order to

confirm this. Combinations of CBZ with TOP or LEV do not exhibit increased oxidative stress in cells, and this itself could be of great significance for the treatment of epilepsy.

1. UVOD

1.1. OKSIDATIVNI STRES

Naše življenje je neposredno povezano s kisikom, ki je zelo reaktivna molekula, hkrati pa je nujen za naš obstoj. Reaktivnost kisika ima za posledico oksidativni stres, ki je vrsta kemičnega stresa, kateremu smo podvrženi vsi aerobni organizmi. Definiran je kot motnja v ravnotežju antioksidantov in oksidantov v korist slednjih, ki vodi v potencialne poškodbe. Tem poškodbam pravimo oksidativne poškodbe in so definirane kot biomolekularne poškodbe, ki nastanejo ob napadu reaktivnih spojin (RS) na vitalne dele organizmov. V zdravih organizmih je nastajanje RS uspešno uravnoteženo s strani antioksidatnih sistemov. Antioksidanti radikalov ne odstranijo v celoti, ampak jih le vzdržujejo na nizki fiziološki stopnji (1,2). RS namreč v manjših količinah nastajajo tudi v normalnih okoliščinah ob vsakdanjih fizioloških procesih. V zadnjih letih je vse več dokazov, da so pomembne pri znotrajceličnem signaliziranju in izražanju genov (3). Sodelujejo tako pri sintezi nekaterih hormonov, kot tudi pri obrambi pred okužbami (4).

1.1.1. *Reaktivne spojine*

Oksidativne poškodbe se lahko pojavijo zaradi zmanjšane zmožnosti odpravljanja napak sistemov, ki so za to odgovorni, kot tudi zaradi povišanega oksidativnega stresa. Ta pa se lahko pojavi zaradi zmanjšanega delovanja antioksidantov ali pa zaradi povečanega nastajanja RS (1). Med RS uvrščamo reaktivne kisikove spojine (ROS), reaktivne klorove (RCS), reaktivne dušikove (RNS), kot tudi bromove in žveplove spojine (Preglednica I) (2,5,6).

Preglednica I: Radikali in ne-radikalske spojine (1,6).

RADIKALI	NE-RADIKALSKA SPOJINA
Reaktivne kisikove spojine	Reaktivne kisikove spojine
superoksidni radikal, $O_2^{\cdot-}$ hidroksilni, HO^{\cdot} hidroperoksilni radikal, HOO^{\cdot} peroksilni radikal, ROO^{\cdot} alkoksilni radikal, RO^{\cdot}	vodikov peroksid, H_2O_2 ozon, O_3 singletni kisik, 1O_2 organski peroksidi, $ROOH$
Reaktivne dušikove spojine	Reaktivne dušikove spojine
dušikov oksid, NO^{\cdot} dušikov dioksid, NOO^{\cdot} nitrat, NO_3^{\cdot}	peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$ dušikova kislina, HNO_2 nitrozil anion, NO^{\cdot} nitrozil kation, NO^+
Reaktivne klorove spojine	Reaktivne klorove spojine
atom klora, Cl^{\cdot}	hipoklorna kislina, $HOCl$ klor plin, Cl_2

Najpomembnejše od zgoraj naštetih so kisikove reaktivne spojine. Izraz kisikove reaktivne spojine zajema tako kisikove radikale (imajo nesparjene elektrone), kot tudi nekatere neradikalske derivate O_2 , kot so H_2O_2 , singletni kisik (1O_2), hipoklorna kislina ($HOCl$) in ozon (O_3) (2,6). »Reaktivne« je zelo relativen pojem, saj recimo molekuli superoksidnega aniona ($O_2^{\cdot-}$) in vodikovega peroksidu (H_2O_2) sami po sebi nista preveč reaktivni, na drugi strani pa hidroksilni radikal (HO^{\cdot}) reagira praktično z vsemi molekulami v svoji bližini (1).

(i) Najpomembnejše neradikalske vrste kisika

Singletna oblika kisika obstaja v dveh stanjih (vzbujeno in osnovno). Pri nobeni ni spinske restrikcije, ki bi upočasnila reakcijo z neradikaliskimi molekulami, tako da je ta oblika kisika zelo reaktivna. Nastane fotokemično in pri nekaterih kemičnih reakcijah ter tvori endoperokside ter hidroperokside (7).

Vodikov peroksid proizvaja mnogo encimov, eden izmed njih je tudi superoksid dismutaza (SOD). H_2O_2 nastaja v skoraj vseh tkivih *in vivo*. V celicah pa je največji generator vodikovega peroksidu mitohondrij. H_2O_2 v mitohondriju nastaja z monoaminsko oksidazo

(možganski mitohondriji) in v procesih dihalne verige. Ker je prisoten v telesu v visokih koncentracijah, je dobro, da ni zelo reaktiv, saj tudi pri višjih koncentracijah ne pride do oksidacij pomembnih telesnih struktur (DNA, proteinov, lipidov). Lahko pa vodikov peroksid deaktivira nekatere encime in povzroči apoptozo ali nekrozo celic. Vzrok za takšne dogodke je Fentonova reakcija, kjer se iz H_2O_2 tvori hidroksilni radikal (8).

Ozon je molekula sestavljena iz treh atomov kisika. Običajno nastaja preko fotodisociacije molekularnega kisika, kjer najprej nastane atomarni kisik, le-ta pa nadalje reagira z molekularnim kisikom, da nastane ozon. Čeprav ni radikal, je od kisika mnogo bolj reaktiv in lahko sproži oksidacijo lipidov ter v vodnih raztopinah nastanek hidroksilnega radikala (4,9).

(ii) Najpomembnejše radikalske vrste kisika

Pravzaprav je že sam tripletni kisik biradikal, saj ima dva nesparjena elektrona v dveh različnih π orbitalah. Zaradi paralelnih spinov takšen kisik sprejme le en elektron naenkrat in počasi reagira z neradikalimi spojinami, lahko pa hitro reagira z ostalimi radikali. Reaktivnost molekule kisika lahko naraste, če se spremeni smer enega od spinov nesparjenih elektronov.

Hidroksilni radikal je izjemno reaktiv radikal. Prav zaradi te svoje reaktivnosti deluje lokalno in oksidira vse molekule v okolini svojega nastanka. Glavna načina nastanka sta reakcija H_2O_2 kovinskimi ioni (npr. Fe^{2+} , Cu^+) in homolitski razpad H_2O_2 , povzročen z UV sevanjem. Prav velike količine kovin najbolj povečajo nevarnost za poškodbe. Poškodbe nastanejo tako, da HO^\cdot pritegne vodikov atom, pri čemer nastaneta nov radikal in voda, ta radikal pa potem lahko reagira naprej s kisikom, čemur pravimo peroksidacija biomolekul. Preglednica II prikazuje tarče hidroksilnega radikala in njihove produkte v telesu.

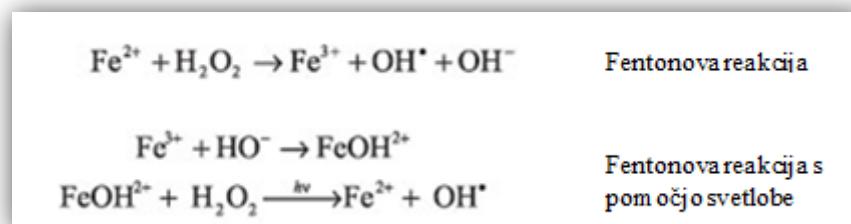
Preglednica II: Tarče hidroksilnega radikala in njihovi produkti (4).

Tarčna molekula	Produkti oksidacije
lipidi	lipidni peroksidi, aldehidi, ketoni, alkili
proteini	hidroperoksidi, prečno povezane molekule
DNA/RNA	8-hidroksigvanin, cepitev, hidroksiliranje, deaminacija
hialuronska kislina	glikozidi, hidroperoksidi

Superoksidni radikal je mnogo manj reaktivен od hidroksilnega radikala in skoraj da ne reagira z biološkimi molekulami. Njegova reaktivnost se močno poviša v kislem pH, kjer pride do protoniranja in nastali hidroperoksilni radikal (HO_2^\cdot) je precej bolj reaktiv. Lahko tudi prehaja preko membran in tako povzroči lipidno peroksidacijo, medtem ko O_2^\cdot težko prehaja membrane. Superoksidni radikal nastaja endogeno pri celičnih procesih, kjer se porablja kisik, to je v dihalni verigi, pri fagocitozi, encimskih oksidacijah, avtooksidacijah substratov ter pri reakcijah prenosa elektronov v mikrosomih (4,9).

(iii) Prehodne kovine in Fentonova reakcija

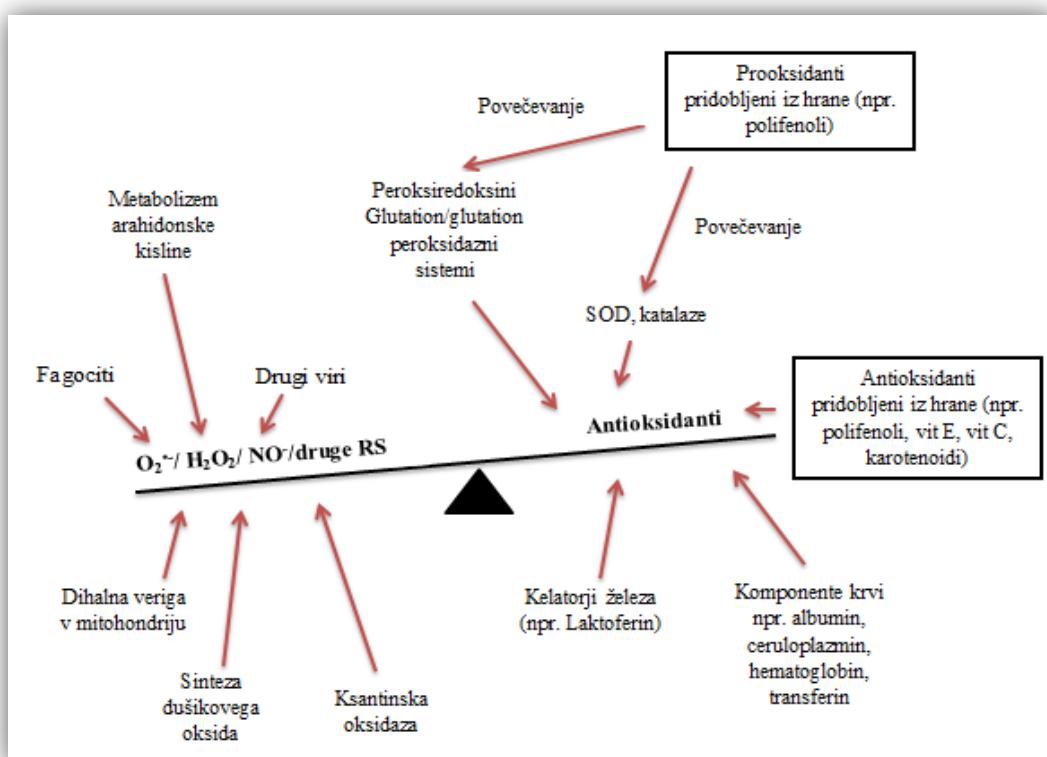
Veliko kovinskih ionov oziroma atomov ima nesparjene elektrone in jih zato uvrščamo med radikale. Takšno uvrstitev tudi upravičujejo, saj lahko mnogo prehodnih kovin sprejme ali odda posamezne elektrone in tako delujejo koristno ali pa škodljivo na celične procese. Ena izmed najnevarnejših reakcij (slika 1) kataliziranih s strani prehodnih kovin je Fentonova reakcija. V reakciji sodeluje železo v obliki Fe^{2+} ionov, ki lahko v kombinaciji z H_2O_2 oksidira mnoge organske molekule. Natančnejši mehanizem reakcije še vedno ni povsem znan, vendar večina znanstvenikov meni, da pride do tvorbe hidroksilnega radikala kot primarnega uničevalca bioloških struktur (1).



Slika 1: Tvorba hidroksilnega radikala preko Fentonove reakcije (1).

1.1.2. Povečan nastanek oksidativnega stresa (4)

Viri za sintezo ROS v fizioloških procesih so celična membrana, mitohondriji, mikrosomi (endoplazemski retikulum), peroksisomi in ostali viri citosola (4). V živih organizmih nastajajo ROS, ti pa lahko škodujejo našemu telesu, če se v preveliki koncentraciji pojavijo na mestih s premajhno antioksidativno zaščito. Povečanje oksidativnega stresa je lahko tudi povsem fiziološkega izvora, saj je bilo ugotovljeno, da se poveča ob nosečnosti in intenzivnem telesnem naporu. Slika 2 predstavlja ravnovesje med RS in antioksidanti, ter komponente, ki vplivajo nanj.



Slika 2: Antioksidanti v boju z reaktivnimi spojinami (2).

Povečan oksidativni stres je lahko posledica različnih dejavnikov kot so:

(i) Dejavniki okolja

Stanje povečanega oksidativnega stresa lahko nastane ob neustreznem življenskem okolju (onesnaženost, povečano sevanje) ali pri neprimerinem načinu življenja (slabo prehranjevanje, pitje alkohola, neustrezna telesna dejavnost, kajenje). Temu se lahko

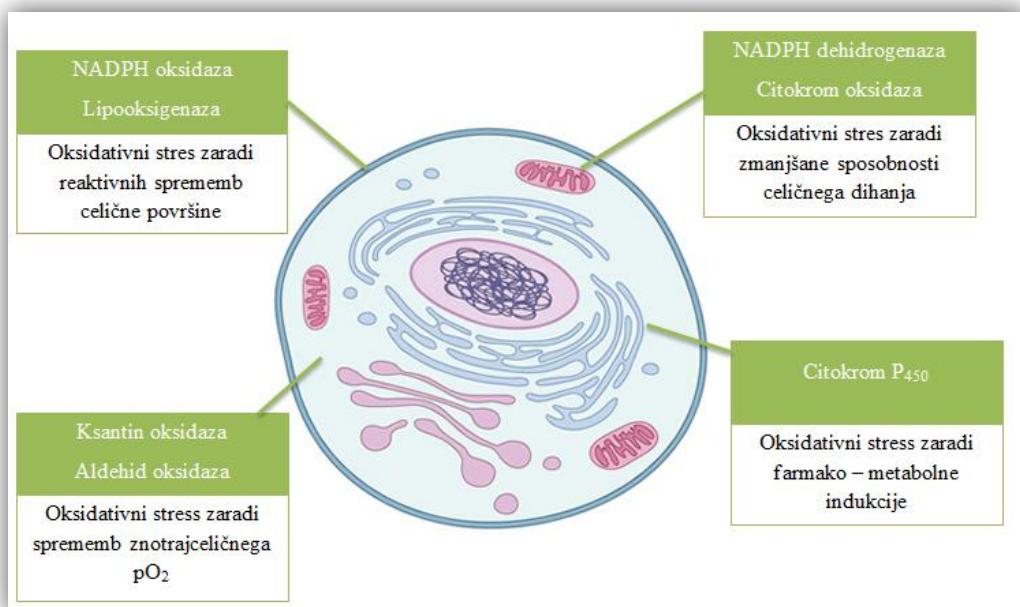
pridružijo še morebitne bolezni (poškodbe, okužbe, krvo-žilne bolezni, maligne bolezni), psiho-emocionalni stres in nekatera zdravila, radioterapija ter rentgenski in UV žarki.

- a) Fizikalni dejavniki. Med fizikalne dejavnike uvrščamo ionizirajoče in UV-sevanje, ki preko radiolize ali fotolize povzročata homolitični razpad molekul vode. Ta pojav je glede na količino prejetega sevanja in dejstva, da je človeški organizem sestavljen večinoma iz vode, vse prej kot zanemarljiv.
- b) Kemijski dejavniki. Ozon je kemijski dejavnik, ki lahko neposredno tvori peroksilne radikale, preko delovanja na derivate fenola. Obstajajo pa tudi kemikalije, ki delujejo posredno, kot to počno nekatere učinkovine, ki stimulirajo citokrom P₄₅₀ in pa nekateri aromatski policiklični ogljikovodiki.
- c) Biološki dejavniki. Bakterije in ostali povzročitelji okužb večajo tvorbo ROS preko fizioloških obrambnih mehanizmov pred okužbami, ter preko protiteles v imunskem odgovoru. V tem procesu sodelujejo predvsem fagociti, ki jih v veliki večini uvrščamo med nevtrofilce. Zreli nevtrofilci namreč vsebujejo številne encime, kot je NADPH oksidaza, ki so namenjeni ubijanju neželenih povzročiteljev okužb (10).

(ii) Spremembe metabolizma

Veliko je raziskav na temo vprašanja, ali je oksidativni stres vzrok ali posledica določenih bolezni. Zelo verjetno gre za prepletten proces, kjer lahko na primer radikali povzročijo primarno poškodbo, katere posledice so vidne v spremenjeni celični presnovi, kar pa lahko povzroči nadaljnje sproščanje sekundarnih radikalov. Dejstvo pa je, da se pri določenih bolezenskih stanjih spremeni metabolizem.

Različne vrste ROS nastajajo na različnih mestih v celici. Glede na primarno mesto generiranja ROS v celici lahko natančneje opredelimo vrsto oksidativnega stresa. Poenostavljena struktura sistemov, ki preko metabolizma tvorijo ROS, je predstavljena na shemi (slika 3).



Slika 3: Viri oksidativnega stresa v celici (4).

a) *Oksidativni stres zaradi zmanjšane sposobnosti celičnega dihanja*

Mitohondriji so najpomembnejši vir ROS *in vivo*, predvsem superoksidnega radikala (O_2^-). Imajo dve membrani (notranjo in zunanjou) in svoj unikaten genom, ki je odgovoren za funkcijo mitohondrijev v celicah. Notranja in zunanja membrana se precej razlikujeta po permeabilnosti. Notranja je mnogo manj permeabilna in ima nase vezane veliko encimov in transportnih proteinov, zato je razmerje med proteini in fosfolipidi visoko. Encimski kompleksi I – IV na membrani so oksidoreduktaze in sodelujejo pri prenosu elektronov iz nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) ali reducirane oblike flavin adenin dinukleotida (FADH₂) na kisik in s tem proizvajajo elektrokemijski protonski gradient preko mitohondrijske notranje membrane. Kompleks V (F₀F₁-ATP-aza) uporabi protonski gradient za sintezo adenozin trifosfata (ATP). Mitohondriji so zadolženi za večino produkcije celičnega ATP, preko mehanizma oksidativne fosforilacije. Čeprav je elektronska transportna veriga učinkovita v prenašanju elektronov do kisika, lahko nekateri elektroni pobegnejo in reagirajo z molekularnim kisikom ter tvorijo superoksidni radikal. Večina se ga sprosti v matriks, določen delež pa se lahko sprosti tudi v znotrajmembranski prostor. Večina O_2^- v obeh prostorih dismutira v H_2O_2 , preko encima superoksid dismutaza (SOD) (1,11). Problem nastane predvsem ob povečani metabolni dejavnosti, ki je lahko različnih izvorov (naporna telesna dejavnost, povečano hranjenje...). Metabolna

aktivacija poveča količino ROS, posledično pa lahko ta povečana količina ROS povzroči disfunkcijo mitohondrijev, ki znova vodijo v novo tvorbo ROS.

b) Oksidativni stres, povezan s celično membrano

V celični membrani oziroma plazmalemi se nahaja veliko encimskih sistemov, ki so sposobni tvoriti ROS. Plazmalema se aktivira preko nevtrofilcev, izzovejo pa jih lahko bakterije, endotoksini in imunski kompleksi. Ti dejavniki se lahko povežejo s površino celične membrane in aktivirajo NADPH-oksidaze, kar ima za posledico tvorbo superoksidnega radikala. Encim lipooksigenaza, ki se nahaja na celični membrani, pa je sposobna tvoriti ROS preko produkcije hidroperoksidov.

c) Oksidativni stres zaradi metabolne indukcije

Citokrom P₄₅₀ je hidroksilacijski encim. Nahaja se na endoplazmatskem retikulumu (ER). Delovanje tega encima se močno poveča ob zlorabi alkohola in povečanem izpostavljanju ksenobiotikov (npr. barbiturati). V poskusih so ugotovili, da izolirane mikrosomalne frakcije, ki vsebujejo endoplazmatski retikulum, producirajo velike količine O₂[•] in H₂O₂ in to predvsem preko citokromov P₄₅₀ (1).

d) Oksidativni stres povezan s spremjanjem znotrajceličnega tlaka kisika (pO₂)

V primerih ishemično-reperfuzijskih poškodb, kot so srčni infarkt, operacije srčnega obvoda ter presaditev organov, igra pomembno vlogo ksantinska oksidaza. Ta iz kisika tvori visoko ROS kot sta superoksidni ter hidroksilni radikal.

(iii) Zmanjšana antioksidativna zaščita

Tudi neustrezno delovanje antioksidativnega sistema ima lahko za posledico povečanje oksidativnega stresa. Podobno kot pri metabolizmu je tudi tukaj lahko nastanek ROS posledica bolezni. Primer je celiakija, pri kateri ne pride do zadostne absorbcije antioksidantov (AO) in lahko zaradi zmanjšane antioksidativne zaščite pride do tvorbe ROS. Možnih vzrokov za nastanek oksidativnega stresa je tudi tukaj več: a) *Zmanjšan vnos AO: hipovitaminoza, motena prehrana;* b) *Zmanjšana absorpcija AO: malabsorpcija, celiakija;* c) *Zmanjšana biološka uporabnost AO: nezadosten prevzem ali prenos;* d)

Oslabitev AO encimov: genetski ali iatrogeni dejavniki; e) Pretirano uživanje AO: prooksidativni učinek antioksidantov.

1.2. EPILEPSIJA IN PEU

1.2.1. Epilepsija

Epilepsija je skupno ime za različne motnje v možganih, za katere je značilno nagnjenje do epileptičnih napadov in pridružene nevrobiološke, kognitivne, fiziološke in socialne posledice napadov (12). Približno 50 milijonov ljudi po svetu ima epilepsijo (13). Za postavitev diagnoze morajo biti prisotni trije dejavniki: priti mora do vsaj enega epileptičnega napada, trajnih sprememb v možganih, ki povečajo verjetnost za nadaljnje napade, tretji dejavnik pa so z epilepsijo povezane psihološke posledice (12,14). Nastanek epileptičnih motenj strokovnjaki pripisujejo različnim dejavnikom, kot so: mutacije genov, tumorji, infekcije, degenerativne bolezni, travmatični dogodki, epileptični status in kap. V mnogih primerih pa vzrok motenj ni znan.

Klinično uvrščamo epilepsijo glede na lastnosti epileptičnih napadov in ne na podlagi vzroka za nastanek. Epileptične napade uvrščamo v dve glavni skupini: generalizirani in žariščni napadi. Med napadom oseba lahko ostane pri zavesti, kar uvrščamo med lažje napade. Lahko pa zavest tudi izgubi, takšnim napadom pravimo kompleksni napadi. Od lokacij, ki so vpletene pri napadu, so odvisni simptomi, ki so lahko le manjša sprememba vedenja ali občutkov, ali pa kratek padec pozornosti. Hujše oblike konvulzivnih napadov pa lahko trajajo tudi nekaj minut (15).

Obstajata dve glavni skupini generaliziranih napadov: absenčni ter tonično-klonični, ostali napadi pa so še tonični, atonični, miotonični in klonični. Absenčni napadi ali »petit mal« povzročijo kratkotrajno izgubo zavesti. Običajno pride do okrog 10 sekundnega strmenja v prazno in oseba po tej kratki izgubi zavesti nadaljuje z aktivnostjo, ki jo je počela prej. Lahko pa napad traja tudi nekaj minut, vključuje klonične in avtomatične gibe, vendar je to atipično. Tonično-klonični ali »grand mal« napad vključuje močno krčenje celotne telesne muskulature, prenehanje dihanja in izgubo zavesti, temu pa sledi serija hudih in usklajenih trzajočih gibov telesa, ki počasi izzvenijo (16).

1.2.2. PEU

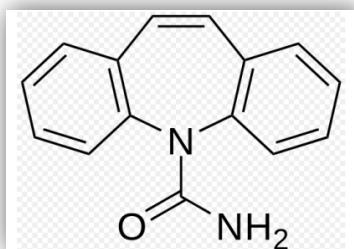
Protiepileptične učinkovine (PEU) se uporablja za zdravljenje epilepsije, poleg tega pa z njimi zdravimo tudi neepileptične konvulzivne motnje (15). Pri osebah, ki prvič doživijo epileptične napade, je potrebno oceniti, ali je tveganje nadaljnih napadov večje od tveganja zdravljenja, saj ima lahko zdravilo tudi neželene učinke (17). Ko pride do odločitve o izbiri protiepileptičnega zdravila, se izbere zdravilo, ki je učinkovito za to specifično vrsto epilepsije (18).

Zdravljenje se vedno začne z eno PEU, katere odmerek lahko povečujemo, dokler napadi niso pod kontrolo in dokler neželeni učinki zdravila niso pomembnejši od želenih. Ko pridemo do takšne situacije, se prvotno zdravilo postopoma ukine in ga zamenja drugo (17). International League Against Epilepsy (ILAE) definira neuspeh dveh skrbno izbranih in zadostno preizkušenih protiepileptičnih zdravil kot trdovratno epilepsijo (19). Takšna epilepsija se pojavi pri približno 30% pacientov. Prognoza epilepsije je namreč dokaj dobra, saj 60% novo odkritih bolnikov ustrezajo že uporaba prvega ozioroma drugega zdravila (17). Če je potrebno poseči po terapiji z dvema učinkovinama, je pomembno, da izberemo učinkovini, ki delujeta preko različnih mehanizmov delovanja in se drugače presnavljata, da ne pride do povečanja neželenih učinkov. Pri takšnih bolnikih je še posebej pomembno spremjanje terapevtskih koncentracij v krvi (20). Optimalna PEU čim bolj ustavi različne tipe napadov v odmerkih, ki ne povzročajo neželenih učinkov v centralnem živčnem sistemu (CŽS). Mora se dobro absorbirati, prenašati v CŽS in se v celoti izločati skozi ledvica z razpolovnim časom primernim za peroralno uporabo (17).

(i) Carbamazepin

Karbamazepin (CBZ) spada v prvo generacijo protiepileptičnih zdravil in je po 50 letih uporabe še vedno najbolj uporabljana učinkovina za zdravljenje žariščnih epileptičnih napadov (17). Glavni mehanizem delovanja CBZ je preko napetostno odvisnih natrijevitih kanalčkov v možganih. CBZ preprečuje ponavlajoče se proženje od natrija odvisnih akcijskih potencialov v depolariziranih nevronih, z blokado napetostno odvisnih natrijevitih kanalčkov (19). Karbamazepin je praktično netopen v vodi (21). Biološka uporabnost je okrog 80%, vezava na serumske proteine pa 70-80%. Podvržen je obsežnemu metabolizmu, le manj kot 2% zaužitega odmerka se izloči nespremenjenega z urinom (20).

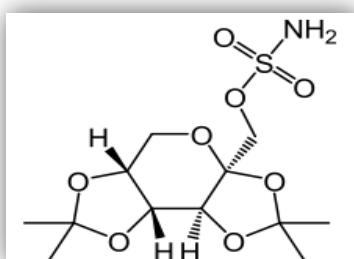
Njegova plazemska razpolovna doba znaša okrog 30 ur, a se lahko prepolovi, saj se v veliki meri presnavlja v jetrih preko izoencimov citokromov P₄₅₀ (CYP3A4 in CYP2C8) (17). Njegov glavni aktivni presnovek je karbamazepin-10,11-epoksid, katerega koncentracija predstavlja do 50% začetnega odmerka in je tudi odgovoren za učinkovitost in toksičnost CBZ. Pri monoterapiji je njegova optimalna koncentracija 4-12 mg/L (17-51 µmol/L) (20).



Slika 4: Struktura karbamazepina (22).

(ii) Topiramat

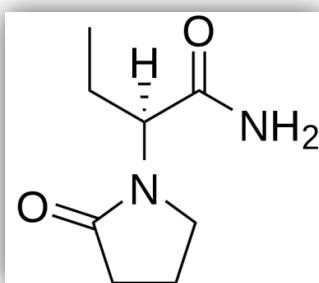
Topiramat (TOP) spada v drugo generacijo PEU in je učinkovito zdravilo za preprečevanje žariščnih in tonično-kloničnih napadov (16). Mehanizem delovanja ni povsem raziskan. Predvidevajo, da deluje kot inhibitor natrijevih in kalcijevih L kanalčkov, ter poveča učinek gama-aminomaslene kisline (GABA) z alosterično modulacijo GABA_A receptorja. Prav tako blokira AMPA receptorje (receptorji za glutamat, ekscitatorni nevrotrasmiter) in šibko inhibira karboanhidrazo (15,19). Za razliko od levetiracetama in karbamazepina naj bi deloval tudi agonistično na inhibitornih sinapsah (23). TOP se hitro absorbira in ima visoko biološko uporabnost (80-95%), na plazemske proteine se veže okrog 10%. Večina učinkovine se izloči skozi ledvica nespremenjene, v prisotnosti induktorjev jetrnih encimov (npr. CBZ) pa se presnova TOP poveča (16). Običajna serumska koncentracija TOP pri pacientih znaša 5 do 20 mg/L (15-59 µmol/L) (20).



Slika 5: Struktura topiramata (24).

(iii) Levetiracetam

Tudi levetiracetam (LEV) uvrščamo v drugo generacijo PEU. Uporabljam ga predvsem v kombiniranem zdravljenju in je učinkovit pri zdravljenju trdovratnih žariščnih in generaliziranih napadov, vključno z mioklonimi napadi in absencami (17). Mehanizem delovanja levetiracetama še ni povsem pojasnjen, najverjetneje pa deluje preko blokade kalcijevih kanalčkov tipa N in modulacije odgovorov na GABA_A receptorjih. LEV naj bi imel tudi pomembno vlogo pri preprečevanju začetka napadov, saj naj bi bil udeležen pri mehanizmu sproščanja ekscitatornega nevrotransmiterja glutamata (15). LEV se hitro in s skoraj 100% biološko uporabnostjo absorbira iz gastrointestinalnega trakta. Vezava na plazemske proteine je manj kot 10%. Okoli 25% LEV se presnavlja v jetrih do neaktivnih presnovkov, ti pa se skupaj z nespremenjeno obliko v 95% izločajo skozi ledvica. Terapevtski odmerki so med 12 in 46 mg/L (70-270 µmol/L)(17,20).



Slika 6: Struktura levetiracetama (25).

1.3. POVEZAVE EPILEPSIJE IN OKSIDATIVNEGA STRESA

Posledice oksidativnega stresa so lahko hude. Izkazalo se je, da so ROS vpletene v patogenezo velikega števila različnih bolezni. Čeprav je prisotnost ROS ponekod sekundarnega pomena, lahko po svojem nastanku tvorijo številne verižne reakcije, ki poškodujejo celice oziroma celične strukture, kot tudi tkiva. Med veliko število bolezni, v katere se vključujejo ROS, spadajo nevrodegenerativne bolezni (mednje uvrščamo tudi epilepsijo), srčno-žilne bolezni, rak in presnovne bolezni (4).

Poškodbe, ki nastanejo ob epileptičnih napadih v možganih, so dinamičen proces z mnogo vključenimi faktorji, ki lahko vodijo v smrt živčnih celic. Ti faktorji so lahko genetskega izvora, ekscitotoksično vzpodbujena mitohondrijska disfunkcija, spremenjene koncentracije citokinov in pa tudi oksidativni stres. Ob epileptičnih napadih pride tudi do

vstopa kalcija v celico, ki lahko povzroči iniciacijo biokemične kaskade in sproži nevronsko smrt ali pa vodi v povečan nastanek ROS. Možgani uporabljajo največje količine kisika, zato so še posebej podvrženi oksidativemu stresu. Prav tako imajo zelo veliko polinenasičenih maščobnih kislin, ki so v veliki meri podvržene lipidni peroksidaciji. So zelo bogati z železom, ki lahko katalizira nastanek hidroksilnega radikala, imajo pa tudi nizko koncentracijo encimov iz skupine katalaz, ki pretvarjajo peroksid v vodo. Vse to so razlogi, zakaj se ROS povezuje s patogenezo epilepsije. Te spojine naj bi namreč povzročale oksidativne celične poškodbe in preko poškodb vitalnih celičnih struktur povzročale odmrtje nevronov. Obstaja pa dilema ali so ROS vzrok ali posledica epileptičnih napadov (11). Nedvoumnih ugotovitev ni, so pa znani najbolj verjetni faktorji za epileptogenezo (26):

1.3.1. Zmanjšana antioksidativna zaščita

Pomembno vlogo pri nastanku epileptičnih napadov ima homeostatsko ravnotežje med oksidanti in antioksidanti. Zmanjšane koncentracije antioksidantov lahko sodeč po rezultatih različnih študij povzročijo epileptični napad. Zadostne koncentracije antioksidantov pa varujejo pred napadi in zmanjšajo oksidativne poškodbe ob pojavi napadov. Obstajajo dokazi, da naj bi imeli možgani predvsem težave z odstranjevanjem vodikovega peroksida, ki nastane iz superoksidnega radikala, saj so koncentracije katalaz v možganih nižje. Ob visokih koncentracijah železa, lahko iz vodikovega peroksida nastaja hidroksilni radikal, ki pa lahko povzroči veliko škode predvsem preko lipidne peroksidacije (27). Aycicek in sod. so ugotovili tudi, da je celotna antioksidativna kapaciteta pri zdravih ljudeh signifikantno večja kot pri bolnikih z epilepsijo (28).

1.3.2. Mitohodrijska disfunkcija

V možganih je zelo veliko število mitohondrijev. Zaradi svoje visoke mobilnosti po citoskeletnih transportnih mehanizmih so lahko nevronski mitohondriji pozicionirani glede na specifične metabolne potrebe, ki se zelo povečajo ob epileptičnem napadu. Možno je, da dovolj dolgi napadi tvorijo toliko ROS, da jih antioksidativni mehanizmi ne uspejo kontrolirati. Raziskave so pokazale tudi, da imajo nekateri bolniki z epilepsijo oslabljeno delovanje mitohodrijskega kompleksa I dihalne verige v hipokampusu. To lahko vodi do povečane produkcije ROS in posledično tudi do poškodb in epileptogeneze. Dokazi so tudi

o genetskih napakah na mitohondrijski DNA, ki je lahko vzrok za epilepsijo. Rezultati raziskav kažejo, da pri ljudeh z mitohondrijskimi boleznimi, povečano nastajanje ROS vodi do mitohondrijske disfunkcije, ki ima za posledico epileptični napad. Vsi ti dokazi podpirajo teorijo, da poškodbe mitohondrijev niso le posledica epileptičnih napadov, ampak so lahko tudi vzrok za le-te (11).

1.3.3. Redoks-aktivni elementi

Mnoge študije predvidevajo, da so večje količine železovih ionov vpletene v degeneracijo hipokampa. Neketere celo ugotavljajo, da bi naj prišlo do povečanega influksa železa v hipokampus, kar je lahko razlog za povečan oksidativni stres (1). Drugi pomemben element, ki ga povezujejo z oksidativnim stresom v epilepsiji, je selen. Selen je kofaktor encima glutation peroksidaza in ključen za njegovo delovanje. V raziskavah so ugotovili nižje koncentracije selena pri nekaterih epileptikih. Še več, pri epileptikih, ki so imeli pomanjkanje selena, je dodatek le tega zmanjšal pogostost epileptičnih napadov (29).

1.3.4. Arahidonska kislina

Svojo vlogo pri epileptičnih napadih naj bi igrala tudi arahidonska kislina. Spontani napadi so povezani s povečanimi koncentracijami prostaglandinov v korteksu, hipokampusu in striatumu, ter nahajanju levkotrienu podobnih substanc v striatumu. Veliko ciklooksigenaznih-2 (COX-2) inhibitorjev je zmanjšalo pojavnost in trajanje epileptičnih napadov, vendar obstajajo tudi izjeme. Zelo možno je, da je potrebna inhibicija tako COX kot lipooksigenaz (LOX), da pride do zmanjšanega odmiranja nevronov, kar je bilo ugotovljeno pri študiji s fenidonom (26).

1.3.5. Staranje

Pri starostnikih se incidenca epileptičnih napadov poveča od 2 do 3-krat. Razlog za to naj bi bil v povečanju oksidativnih poškodb pri starejših ljudeh. Tudi oksidativni stres povzročen med epileptičnim napadom naj bi bil pri starejših večji. Starejši so bolj dovetni za neurotoksične efekte pred začetkom napadov in jih oksidativni stres bolj prizadene. Tudi encimi naj bi bili manj prilagodljivi in zato neuspešno odstranjevali ROS (26).

1.4. PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA IN OKSIDATIVEN STRES

Številne študije v zadnjem času kažejo, da je oksidativni stres neizpodbitno povezan z epilepsijo. Kljub temu pa je vpliv protiepileptičnih učinkov na oksidativne poškodbe in na antioksidativne sisteme še relativno slabo raziskan. Zdravila za epilepsijo, ki so trenutno na tržišču, delujejo v glavnem tako, da zmanjšajo pojavnost epileptičnih napadov, torej ne zdravijo vzroka, ampak le posledico. Poškodbe tkiv 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 je aromatskih struktur in med te spada tudi karbamazepin. Presnavljajo se lahko do reaktivnih presnovkov, ki imajo sposobnost kovalentne vezave na biološke makromolekule. Poleg neposrednega delovanja teh reaktivnih metabolitov na makromolekule je možno tudi posredno delovanje, kjer CBZ tvori ROS, te pa potem delujejo naprej (30). Obstaja pa tudi možnost, da metabolni produkti karbamazepina, poškodujejo mitohondrije, ki lahko tvorijo povečane količine ROS (31). Zato lahko PEU poleg preprečitve epileptičnih napadov izzovejo tudi sistemsko toksičnost (28). Po drugi strani pa obstajajo študije, ki predvidevajo neke vrste antioksidativen učinek karbamazepina na epileptogenezo. Karbamazepin naj bi izboljšal razmerje med antioksidanti in oksidanti na račun povečane koncentracije SOD ter glutation peroksidaz in tako naj bi bile oksidativne poškodbe pri ljudeh tretiranih s CBZ manjše v primerjavi z netretiranimi kontrolami (32).

Predvideva se, da naj bi novejše PEU povzročale manj neželenih učinkov v oksidantno-antioksidantnem sistemu. Poleg antikonvulzivne funkcije tako levetiracetamu predpisujejo celo nevroprotективno vlogo. Študija je pokazala, da naj bi LEV deloval nevroprotективno zaradi selektivnega zmanjšanja koncentracij glutamata v hipokampusu, ter sinergistično povečal antioksidativno aktivnost alfa-tokoferola in askorbinske kisline preko povečanega izločanja nitroksidnega radikala (33). Tudi topiramatu nekateri pripisujejo pozitivne učinke na zdravljenje, saj naj bi pomagal ohranjati integriteto bariere med krvjo in možgani (34).

2. NAMEN

Cilj naloge je opredeliti vpliv protiepileptičnih učinkovin (PEU) in njihovih kombinacij na nastanek oksidativnega stresa v perifernih krvnih mononuklearnih celicah (PBMC). Protiepileptične učinkovine novejših generacij se za razliko od prve generacije ne presnavljajo do reaktivnih metabolitov, ki bi lahko v celicah povzročili oksidativni stres. V nalogi bomo z označevalcema lipidne peroksidacije in statusa celičnih antioksidantov primerjali vpliv predstavnikov prve in druge generacije PEU na nastanek oksidativnega stresa.

V sklopu diplomske naloge bomo izolirali PBMC celice zdravih prostovoljcev iz trombocitno-levkocitne plasti krvi, ki jo bomo dobili na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

Celice bomo izpostavili trem PEU: karbamazepinu (CBZ), topiramatu (TOP) in levetiracetamu (LEV) ter kombinacijam slednjih dveh s CBZ. Celice bomo tretirali s PEU v dveh različnih koncentracijskih območjih (območje terapevtske in povišane koncentracije). Med inkubacijo celic bomo z opazovanjem in štetjem celic pod invertnim mikroskopom spremljali preživetje celic in njihovo živost. Izvedli pa bomo tudi test metabolne aktivnosti celic-MTS, ki je ocena za živost celic.

V celicah bomo z že postavljeni LC-MS/MS metodo določali koncentracijo malondialdehida (MDA), ki je najpogosteje uporabljan označevalec lipidne peroksidacije. Prav tako pa bomo poskusili določiti reducirano kot tudi oksidirano obliko glutationa, ki je eden izmed glavnih neencimskih znotrajceličnih antioksidantov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Standardi	Proizvajalec
Epoksi-karbamazepin	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA</i>
Goveji serumski albumin, liofiliziran	<i>Bio-Rad Laboratories, Nemčija</i>
Malondialdehid tretrabutilamonijeva sol	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA</i>
Karbamazepin	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA</i>
L-glutation oksidirani	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA</i>
L-glutation reducirani	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA</i>
Topiramat	<i>Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Velika Britanija</i>
Levetiracetam	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA</i>
Valprojska kislina	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA</i>
N-etilmaleimid	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA</i>

Reagenti in topila	Proizvajalec
2,4-dinitrofenilhidrazin 97 %	<i>Sigma-Aldrich Chemie; Steinheim, Nemčija</i>
2,4-dinitrofenilhidrazin, raztopina s fosforno kislino	<i>Sigma-Aldrich Chemie; Steinheim, Nemčija</i>
70 % etanol	<i>Merk Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
Acetonitril	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis ZDA</i>
Antibiotik/antimikotik 100 x	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis ZDA</i>
Bio-rad Protein Assay Dye Reagent koncentrat	<i>Bio-Rad, Nemčija</i>
BSA (goveji serumski albumin)	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis ZDA</i>
DMSO (dimetilsulfoksid)	<i>Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
EDTA (etilendiamintetraocetna kislina)	<i>Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
FBS (fetalni govejii serum)	<i>Invitrogen; Auckland, Nova Zelandija</i>
Fikol (Ficoll-Paque Plus)	<i>GE Healthcare Bio-Science AB; Uppsala, Švedska</i>
Gojišče RPMI 1640, HEPES Modification	<i>Sigma-Aldrich; Ayrshire, Velika Britanija</i>
H ₂ O ₂ (vodikov peroksid), 30 % wt. vodna raztopina	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis ZDA</i>

H ₂ SO ₄ (žveplova kislina), 98 %	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis ZDA</i>
HCl (klorovodikova kislina), 37 % kadeča	<i>Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
Ledocet (ocetna kislina), 100 %	<i>Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
Mravljična kislina, 100 %	<i>Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
NaOH (natrijev hidroksid)	<i>Fluka Analytical; St. Louis, ZDA</i>
Raztopina tripanskega modrila, 0,4 % (angl. Trypan Blue Solution)	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis ZDA</i>
Reagent MTS (Cell Titer 96® Aqueous One Solution Reagent)	<i>Promega, Madison, WI, ZDA</i>
TCA (triklorooacetna kislina)	<i>Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
Ultračista voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10 (pri pravi vseh reagentov in vzorcev smo uporabili ultračisto vodo, v nadaljevanju: voda)	<i>Millipore Corp., Billerica, MA</i>

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Analitična tehnika	<i>Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica</i>
Avtoklav A-21	<i>Kambič laboratorijska oprema; Semič, Slovenija</i>
Avtomatske pipete: 0,1 – 2,5 µl 0,5 – 10 µl 20 – 200 µl 100 – 1000 µl	<i>Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija</i>
Avtomatski števec celic COUNTESS	<i>Invitrogen; Auckland, Nova Zelandija</i>
Centrifuga	<i>CENTRIC 322 A Tehnica; Železniki, Slovenija. 5415 R Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija. Heraeus MEGAFUGE 16R; Langenselbong, Nemčija</i>
Centrifugirke (15 in 50 ml)	<i>Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija</i>
Grelnik in stresalnik VORTEMP 56 EVC	<i>Tehnica; Železniki, Slovenija</i>
Hemocitometer	<i>Brand Neubauer (Blau Brand)</i>
Hladilnik (+5 °C)	<i>LTH; Škofja Loka, Slovenija</i>
Injekcijske igle FINE-JECT	<i>Henke Sass Wolf; Tuttingen, Nemčija</i>
Inkubator	<i>HERAUS Holding GmbH; Hanau, Nemčija</i>
Inserti za viale 0,1 ml	<i>Machrey-Nagel; Düren, Nemčija</i>
Invertni svetlobni mikroskop OLYMPUS CK40	<i>Olympus Optical Co.; Hamburg, Nemčija</i>
Komora z laminarnim pretokom zraka	<i>Waldner Electronics FAZ 3; Wangen, Nemčija</i>
LC-MS/MS Sistem Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole	<i>Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA</i>

Jeatstream® LC/MS	
Mešalo	<i>LAB DANCER, IKA; Staufen, Nemčija VIBROMIX 10, Tehnica; Železniki, Slovenija</i>
Mikrotiterski čitalci Safire ² TM Genios	<i>Tecan, Genios; Zürich, Švica</i>
Mikrotitrskie ploščice za gojenje celičnih kultur (z 6 vdolbinami)	<i>TPP; Trasadingen, Švica</i>
Multikanalne pipete	<i>Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija</i>
Nastavki za pipete (do 10, 200, 300 in 1000 µl)	<i>Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija</i>
Plastične brizge 5 mL, 10mL	<i>Becton Dickinson, Madrid, Španija</i>
Plastične posode z mikrofiltratom, 50 mL 250 mL	<i>TPP; Trasadingen, Švica</i>
Plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke: 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	<i>Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija</i>
Serološke pipete za enkratno uporabo (za 5, 10, 25 in 50 mL)	<i>TPP; Trasadingen, Švica</i>
Steklovina (steklene čaše in bučke)	
Stresalnik VIBROMIX 403 EVIT	<i>Tehnica; Železniki, Slovenija</i>
Škatle za zamrzovanje vzorcev	<i>Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija</i>
Tehnica AG 245	<i>Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica</i>
TURBOVAP®LV	<i>Caliper; Hopkinton, ZDA</i>
Ultrazvočna kadička: Sonis 4	<i>Iskra; Kranj, Slovenija</i>
Vodna kopel	<i>Memmert; Schwabach, Nemčija</i>
Zamrzovalnik (-20 °C)	<i>Gorenje; Velenje, Slovenija</i>
Zamrzovalnik (-80 °C)	<i>Forma Scientific; Midland, ON, Kanada Sanyo Electric Co., Ltd.; Japonska</i>

Medij za delo s celicami	Sestava
Gojišče	<i>500 mL medija RPMI 1640, HEPES Modification 50 mL FBS 5,5 mL L-glutamin 5,5 mL antibiotik/antimikotik 100x (10000 enot penicilina, 10 mg streptomicina in 25 µg amfotericina B na mL)</i>
Medij za zamrzovanje	<i>10 % DMSO 40 % FBS 50 % medija RPMI 1640, HEPES Modification</i>

Pufri in raztopine	Sestava
10 × PBS (fosfatni pufer); natehtamo sestavine, raztopimo v vodi, uravnamo pH na 7,4 in sterilno filtriramo (0,22 µm)	$NaCl$ 80 g KCl 2 g $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ 36,3 g KH_2PO_4 2,4 g Ultračista H_2O dopolnimo do 1,0 L
1 x PBS Sterilno filtriramo	10 x PBS redčimo 1:10 z avtoklavirano vodo, uravnamo pH na 7,4

3.2. BIOLOŠKI MATERIAL

Kot osnovni biološki material smo uporabljali **periferne mononuklearne celice (ang. : peripheral blood mononuclear cells) – PBMC**. Celice smo pridobili s postopkom ekstrakcije s fikolom iz polne krvi zdravih darovalcev. Shranjevali smo jih zamrznjene in jih odmrznili en dan pred načrtovnimi eksperimenti ter jim zagotovili ustrezne pogoje, saj relativno hitro odmrejo (5% CO₂, 37 °C).

V raziskovalnem delu smo delali prav tako s **humano celično linijo Ramos (ATCC 604)**. Celice so bile pridobljene leta 1972 iz peritonealne tekočine 3-letnega španskega dečka, ki je razvil Burkittov limfom. Celice izražajo nezreli fenotip limfocitov B in so Epstein-Barr virus (EBV) negativne (35). Značilnost Ramos celic je, da so nesmrtnе in so se sposobne deliti neštetokrat.

3.3. METODE

3.3.1. Metode dela s celicami

Poskuse na celicah smo opravljali v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komora), ki omogoča delo v aseptičnih pogojih. Zagotavlja namreč stalen pretok laminarnega filtriranega zraka na delovno površino, ki onemogoča prehod mikroorganizmov v notranjost komore. V prostorih, kjer je vgrajena LAF komora, velja poseben režim oblačenja in čistoče (obvezna uporaba zaščitnih rokavic in prevleke za obuvala). Pol ure pred uporabo komore smo prižgali ultravijolično svetolobo, ki deluje baktericidno, tik

pred začetkom uporabe komore pa smo le to razkužili s 70-odstotnim etanolom. Prav tako smo vso opremo, reagente in vsebnike za topila, ki smo smo jih uporabljali pri delu (serološke pipete, nastavke za pipete, pipete, centrifugirke, mikrocentrifugirke ter stekleničke za gojenje celičnih kultur), pred uporabo v LAF komori razkužili z etanolom. Mikrocentrifugirke in nastavke za pipete smo predhodno avtoklavirali. Po končanem delu smo površine komore prav tako razkužili z etanolom.

3.3.2. Priprava osnovnih raztopin protiepileptičnih učinkovin

Celice smo tretirali z raztopinami protiepileptičnih učinkovin pripravljenih v dveh različnih koncentracijah. Kot topilo smo izbrali DMSO, saj so bile vse izbrane učinkovine v njem topne v dovolj visokih koncentracijah. Le za valprojsko kislino smo kot topilo uporabili etanol. DMSO je citotoksičen v koncentracijah višjih od 0,1 %, zato smo osnovne raztopine pripravili v 1000-krat večji koncentraciji od želene končne in jih nato dodali v celične suspenzije v razmerju 1:1000.

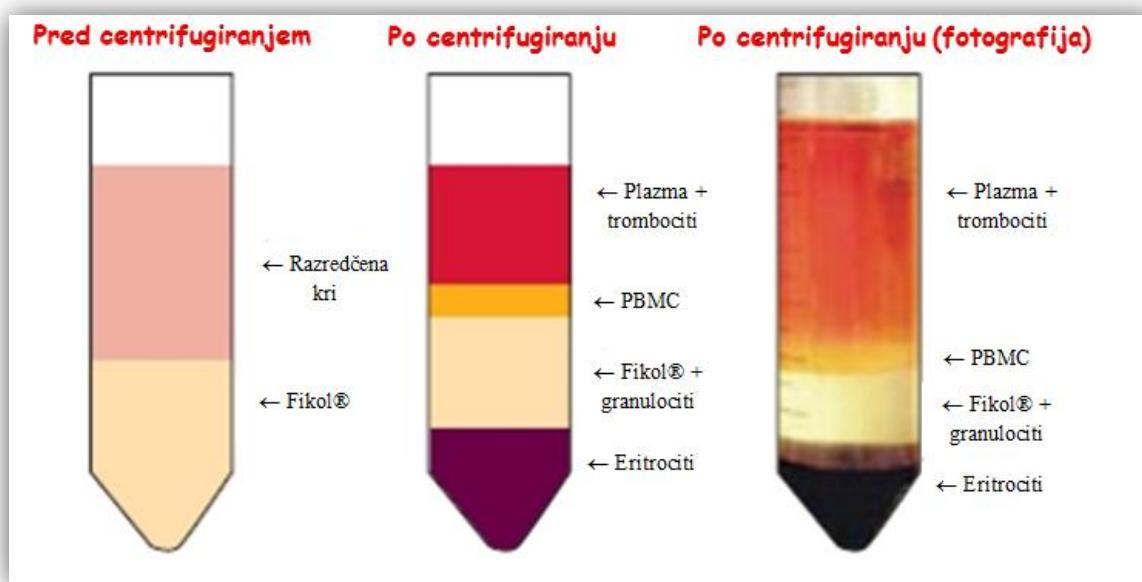
Raztopine smo najprej pripravili v koncentraciji, ki je predstavljala povišano (visoko) koncentracijo (50 mg/mL (CBZ), 75 mg/mL (TOP) ter 150 mg/mL (LEV)) in jih nato ustrezno redčili, da smo dobili še terapevtske (nizke) koncentracije (10 mg/mL (CBZ), 10 mg/mL (TOP) in 25 mg/mL (LEV)). Od tu naprej v diplomi uporabljamo visoke in nizke koncentracije, kot sklic na zgoraj omenjene koncentracije. Učinkovine smo sterilno prenesli v mikrocentrifugirke, ki smo jih predhodno stehtali na analitski tehnični. Stehtali smo polne mikrocentrifugirke in v LAF komori pripravili raztopine. Raztopine smo razdelili na več alikvotov in jih shranjevali pri -20 °C.

3.3.3. Izolacija perifernih mononuklearnih celic

(i) Iz trombocitno-levkocitne plasti krvi (BC)

Iz Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino smo dobili vrečko BC. Celice smo nato izolirali po protokolu pripravljenem na Katedri za klinično biokemijo. Vrečko s 50 mL BC smo dobro očistili s 70-odstotnim etanolom ter jo prerezali s sterilnim skalpelom in vsebino prenesli v 250 mL stekleničko za gojenje celičnih kultur ter jo razredčili do 150 mL z gojiščem. Nato smo v 6 konusnih centrifugirk (50 mL) odpipetirali približno 12,5 mL fikola, ki je hidrofilni polisaharid, s pomočjo katerega s

centrifugiranjem ločimo posamezne plasti krvi. Sledilo je nanašanje krvi na fikol, kar je zahteven in pomemben korak, zato smo morali biti pri tem delu še posebno previdni. Dobro zaprte centrifugirke smo nato centrifugirali 15 minut pri 2300 obratih/min brez zavore. Po centrifugiranju predstavlja zgornja plast plazmo, srednja plast so PBMC-ji in na dnu še spodnja plast z večjedrnimi celicami in eritrociti. Plast PBMC se nahaja nad fikolom, tako da smo s sterilno pipeto odpipetirali to plast celic. Slika 7 prikazuje razredčen BC pred in po centrifugiranju. Obročke PBMC smo združevali v nove centrifugirke, jih dispergirali v mediju in ponovno centrifugirali 7 minut pri 1700 obratih/min z zavoro. Supernatant smo zavrgli in celice razredčili z gojiščem. Nato smo celice resuspendirali tako, da smo gojišče zamenjali z medijem za zamrzovanje. Celice smo zamrznili in hranili na -80 °C v koncentraciji 1×10^6 celic/mL.



Slika 7: Razredčen BC pred (levo) in po (sredina in desno) po centrifugiranju (36).

(ii) Iz venske krvi

Prav tako izvajamo v sodelovanju z Nevrološko klinikou UKC v Ljubljani tudi klinično študijo na bolnikih, ki se zdravijo za epilepsijo. Klinični študiji je izdala soglasje Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko dne 15. 6. 2010 (št. 152/06/10). Rezultati te študije bodo predmet druge diplomske naloge.

Protokol izolacije je zelo podoben izolaciji iz BC. Le da smo tu dobili polno kri v epruvetah Vacutainer® z dodanim EDTA. Po centrifugiranju smo odstranili vrhnjo plast, ki predstavlja plazmo in jo zmrznili na -80 °C. Krvne celice smo nato redčili s PBS in jih postopoma nanesli na fikol, kot je to opisano že v zgornjem protokolu. Po centrifugiranju smo plast PBMC nato redčili z gojiščem ter ponovno centrifugirali. Supernatant smo odstranili, celice sprali s PBS ter prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirke. Te smo še enkrat centrifugirali, odstranili supernatant in sedimentirane celice (t.i. peleta) zmrznili pri -80 °C za kasnejšo analizo (37).

3.3.4. Štetje celic

Štetje celic smo izvajali na hemocitometru z invertnim mikroskopom. Hemocitometer omogoča štetje v znanem volumnu in tako dobimo rezultat v obliki koncentracije (št. celic/mL). V LAF komori smo v najmanjše mikrocentrifugirke odmerili suspenzijo celic, kateri smo želeli izmeriti koncentracijo. Celice smo dobro premešali s serološko pipeto. Nato smo odpipetirali 10 µL celične suspenzije in dodali proporcionalen volumen tripanskega modrila, ki obarva poškodovane in mrtve celice modro. Zmes smo dobro premešali in 10 µL prenesli na hemocitometer. Prešteli smo celice v štirih kvadratih in po enačbi:

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

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

FR – faktor redčenja

izračunali število celic na mililiter. Za vsak poskus smo prešteli celice ob začetku inkubacije in ob koncu ter izračunali odstotek preživelih celic.

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

3.3.5. Odmrzovanje in gojenje celic

Celice so shranjene na -80 °C v mediju za zmrzovanje, ki je sestavljen iz 10-odstotnega DMSO. Ta je pri temperaturi nad 4 °C toksičen za celice, zato je potrebno odmrzovanje izvesti hitro. Za en eksperiment smo odmrznili približno 50×10^7 celic/mL. Celice smo odtajali v vodni kopeli, odmrznjeno suspenzijo pa smo takoj prenesli v 15 mL centrifugirko ter ji dodali gojišča do vrha. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/min in odstranili supernatant. Sedimentirane celice pa smo resuspendirali z ustreznim volumnom gojišča, da smo dobili koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL. Pred tretiranjem s PEU smo celice inkubirali 24 ur, da so si opomogle.

Gojenje PBMC celic zahteva ustreerne pogoje, ki jih zagotovimo z medijem RPMI 1640 z dodatki, segretim na 37 °C. Celice smo gojili v stekleničkah za gojenje celičnih kultur, shranjenih v inkubatorju s temperaturo 37 °C, 100-vlažnostjo in atmosfero s 5-odstotnim CO₂. Celice celične linije RAMOS rastejo v suspenziji in ker se njihovo število podvoji v 48-ih urah, jih je potrebno ustrezzo redčiti. Celice smo gojili v koncentraciji od 2×10^5 celic/mL do 1×10^6 celic/mL.

3.3.6. Izpostavljanje celic PEU

Celice PBMC (1×10^6) smo izpostavili različnim PEU in njihovim kombinacijam v dveh različnih območjih koncentracij (nizka in visoka koncentracija). Celice smo dobro premešali in prenesli v mikrotitrsko ploščico s 6 vdolbinami. Načrt tretiranja je bil vselej enak. Glede na potrebno število celic za mertive smo ustreznemu volumnu suspenzije celic dodali odmrznjeno osnovno raztopino PEU v razmerju 1:1000. Tako smo pri tretiraju PBMC-jev zdravih prostovoljcev v prvih 5 vdolbin dodali po 3 posamezne PEU (CBZ, TOP, LEV) ter 2 kombinaciji PEU (CBZ/TOP, CBZ/LEV), zadnja vdolbinica pa je predstavljala kontrolo brez PEU. V predhodnih raziskavah na naši katedri so namreč ugotovili, da čas tretiranja vpliva na odstotek preživelih celic kot tudi na spremembo izbranih označevalcev oksidativnega stresa (37). Nismo pa se poslužili pozitivne kontrole, za katero so prav tako že uspeli dokazati, da statistično signifikatno poviša koncentracijo izbranih označevalcev (38).

Ena ploščica je predstavljala en poskus. Poskusi so bili izvedeni na štirih različnih prostovoljcih (A, B, C, D), v vsaj 2 paralelah (število odvisno od števila izoliranih celic

PBMC). Testirali smo 2 različni območji koncentracij (nizko in visoko). Ob času nič smo pri vsakem poskusu prešteli celice in določili začetno koncentracijo. Potem je sledila 48 urna inkubacija in po koncu smo celice ponovno prešteli in jih zamrznili.

3.3.7. Zamrzovanje celičnih pelet

Celice smo zamrzovali v obliki pelet. Podoben postopek je opisan že pri izolaciji iz venske krvi. Iz vdolbinic mikrotiterske ploščice smo suspenzijo celic prenesli v 15 mL centrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 1500 obratih/min. Supernatant smo odstranili, sediment pa resuspendirali v PBS. Predhodno smo celice prešteli in jim določili koncentracijo in nato preračunali volumen PBS, ki ga je potrebno dodati, da dobimo 2×10^6 celic/mL. Tako pripravljeni suspenziji celic smo odvzeli 10 μL , da smo natančneje določili koncentracijo celic, po 100 μL pa smo odpipetirali v mikrocentrifugirke in zamrznili za kasnejšo analizo koncentracije proteinov. Iz preostale suspenzije smo pripravili vsaj po dve eno-mililiterski ter po dve pol-mililiterski mikrocentrifugirki za analizo MDA, oziroma GSH. 1,5 mL mikrocentrifugirke za analizo MDA in GSH smo potem še centrifugirali 7 minut na 1700 obratih/min in zavrgli supernatant, ki ga je bilo potrebno previdno odpipetirati, da nismo poškodovali nastale pelete na dnu mikrocentrifugirke.

3.3.8. Priprava celičnega lizata za analizo

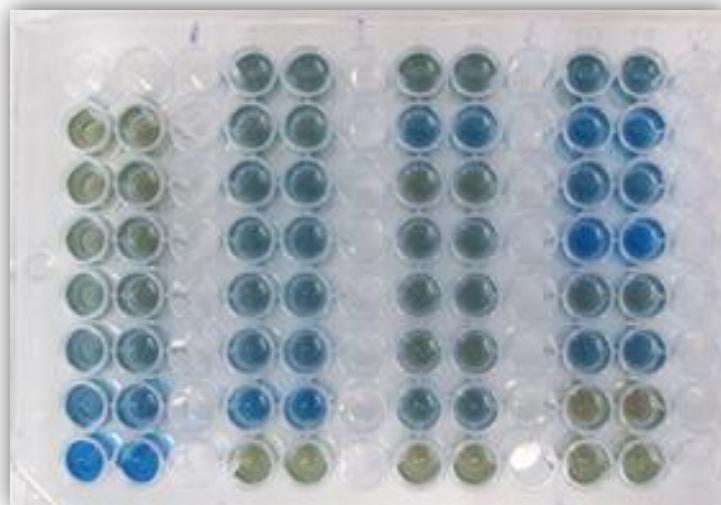
Priprava celic se razlikuje odvisno od analize. Tako pri analizi MDA kot pri analizi GSH smo celice najprej lizirali. Pri analizi MDA smo to naredili tako, da smo zamrznjenim vzorcem dodali 200 μL 0,1 M HCl in vzorce 30 sekund mešali na stresalniku Vibromix.

Mikrocentrifugirke pripravljene za določanje GSH smo odtalili in jim dodali 100 μL HCl z dodatkom 1 mM EDTA in jih mešali na stresalniku Vibromix 10 sekund. Vzorce smo nato ponovno zamrznili na -80 °C in jih ponovno odtalili ter ta postopek ponovili trikrat. Nato smo vzorcem dodali 200 μL ohlajenega acetonitrilia in vzorce centrifugirali 10 minut pri temperaturi 4 °C in 13100 obratih/min. Za nadaljno analizo smo uporabili supernatant.

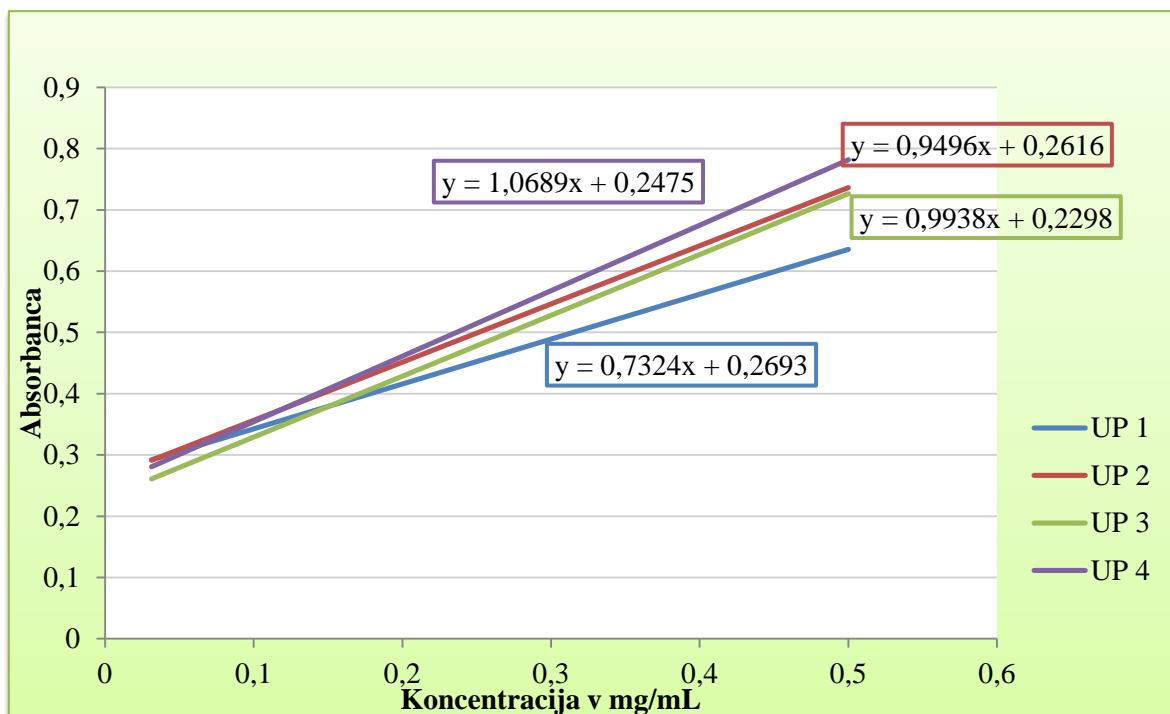
3.3.9. Določanje proteinov z metodo po Bradfordu

Meritev smo izvajali z vnaprej pripravljenim kompletom za določanje koncentracij proteinov v vzorcih imenovanim Bio-Rad Protein Assay. Postopek temelji na Bradfordovi

metodi določanja proteinov. Barvilo Coomassie® Brilliant Blue G-250 namreč ob vezavi na proteine spremeni absorpcijski maksimum iz 465 nm na 595 nm in tu lahko merimo porast absorbance, ki je linearen s koncentracijo. Glede na našo ciljno koncentracijo proteinov v krvi smo izbrali standardni protokol določevanja koncentracij proteinov za mikrotiterske ploščice. V našem primeru smo imeli 4 mikrotiterske ploščice s po 96 vdolbinicami. Na vsako od njih smo v prva dva stolpca v 7 različnih koncentracijah nanesli standardne raztopine govejega serumskega albumina (glej sliko 8), ki so nam služile kot umeritvena premica, v ostale vdolbinice pa smo nanesli naše vzorce. Tako standardi kot vzorci so bili pripravljeni enako. 100 µL standarda oziroma vzorca smo dodali 100 µL razredčenega barvila (priložen v kompletu) in dobljeno raztopino nanesli na mikrotiterske ploščice. Po 5 min inkubacije smo izmerili absorbanco na mikrotiterskem čitalcu Safire² TM Genios. Delali smo v dveh paralelah in za izračune uporabili povprečja (39). Slika 9 prikazuje 4 različne umeritvene premice (UP) s katerimi smo izračunali koncentracijo proteinov na vsaki od 4 ploščic.



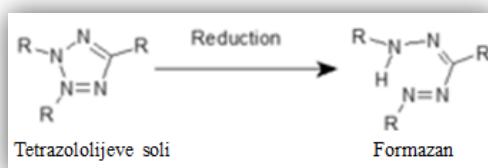
Slika 8: Primer mikrotiterske ploščice za določevanje proteinov po Bradfordu (40).



Slika 9: Umeritvene premice za določanje koncentracije proteinov.

3.3.10. MTS test za določanje presnovne aktivnosti

Reagent MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazolium) in njegovi analogi (XTT, MTT, WSTs) so tetrazolijeve soli, ki se v živih celicah s kemijsko reakcijo pretvorijo v formazan. Gre za kolometrično reakcijo (Slika 10), s katero lahko izmerimo aktivnost celičnih encimov, natančneje NAD(P)H-odvisnih celičnih oksidoreduktaz. Iz tetrazolijevih barvil nastane netopni formazan, ki daje vijolično barvo in ga lahko spektrofotometrično kvantificiramo na mikrotiterskem čitalcu pri 492 nm (41). Test presnovne aktivnosti nam služi kot dobra ocena za živost celic.



Slika 10: Reakcija reagenta MTS (42).

MTS test smo izvajali po protokolu napisanem za potrebe naše fakultete na Katedri za klinično biokemijo. Izvajali smo poskuse na celicah Ramos (enkraten poskus 24 h in 48 h) in PBMC (dvakraten poskus 24 h in 48 h). Najprej smo pripravili celice v koncentraciji 1×10^6 celic/mL, dobro premešali s pipeto in nato razdelili na mikrotiterske ploščice s 24 vdolbinicami, kjer smo jih tretirali z različnimi PEU v različnih koncentracijah in kombinacijah. Celice smo nato dobro premešali, saj test temelji na enaki začetni koncentraciji celic v 96 vdolbinicah. $100 \mu\text{L}$ tako pripravljenih celičnih suspenzij smo nato prenesli na mikrotiterske ploščice s 96 vdolbinicami, s pomočjo multikanalnih pipet. Vsako PEU oziroma kombinacije PEU smo nanesli v triplikatu. Poleg tretiranih celic, smo v vdolbinice nanesli samo suspenzijo celic (netretirana kontrola) ter medij (slepa kontrola). Za 24 h eksperiment smo celice inkubirali 21 h, za 48 h eksperiment pa 45 h. Po inkubiranju smo odmrznili MTS reagent, ga dobro premešali s pipetiranjem in z multikanalno pipeto $10 \mu\text{L}$ dodali v vse vdolbinice s celično suspenzijo oziroma medijem. Potem smo ploščice še za 3h inkubirali v inkubatorju. Z mikrotiterskim čitalcem Safire² TM Genios smo izmerili absorbance in od rezultatov najprej odšteli slepo, izračunali povprečje in standardni odklon in nato vse rezultate podali kot razmerja na kontrolo. Vse meritve smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih.

3.3.11. Določanje malondialdehida v celicah z LC-MS/MS metodo in predhodno derivatizacijo z DNPH

Preglednica III: Priprava reagentov.

Reagent	Priprava
0,1 M HCl (klorovodikova kislina)	V 100 mL bučko smo odpipetirali 0,829 mL 37% HCl in dopolnili z vodo do oznake.
4 M 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 pipravili iz 0,829 mL 37% HCl in dopolnili z vodo do oznake.
6 M NaOH (natrijev hidroksid)	V 10 mL bučko smo nalili približno 5 mL vode in med mešanjem počasi dodajali predhodno natehtani NaOH (2,40g), ki se je sproti raztpljal. Ko se je ves NaOH raztopil, smo dolili vodo do oznake in še enkrat premešali.
20 % TCA (trikloroacetna kislina)	V 25 mL bučko smo natehtali 5,00 g TCA in dopolnili z vodo do oznake.
1 mg/mL raztopina DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin)	Uporabili smo raztopino DNPH s fosforno kislino ($c= 0,2 \text{ M}$). 250 μL te raztopine smo odpipetirali v 10 mL bučko ter dopolnili s 4 M HCl do oznake.
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 malondialdehida

V 10 mL bučko smo natehtali 43,50 mg malondialdehid tetrabutilamonijeve soli ter dopolnili do oznake z acetonitrilom. Tako smo dobili 1 mg/mL osnovno raztopine I (OR I) malondialdehida. 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 in tako dobili standard MDA s koncentracijo 50 $\mu\text{mol/L}$ in jo poimenovali osnovna raztopina II (OR II). Ta standard smo ustrezno 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 IV so prikazane pripravljeni redčitve 50 μM OR II in 1,25 μM standarda z 0,1 M HCl, s katerimi smo pripravili standarde MDA z ustrezno koncentracijo.

Preglednica IV: Priprava MDA standardov.

50 µM OR II [µL]	Priprava standardov		Koncentracija standarda MDA [µmol/L]
	1,25 µM standardna ratopina MDA [µL]	Volumen 0,1 M HCl [µL]	
50	/	950	2,5
25	/	975	1,25
/	500	500	0,625
/	375	635	0,469
/	250	750	0,313
/	188	812	0,235
/	125	875	0,156
/	63	937	0,078
/	31	969	0,039
/	/	100	0

Poleg priprave standardnih raztopin smo vsak dan, ko je potekala priprava vzorcev, pripravili še tri kontrolne vzorce (QC) v nizki (QC_l), srednji (QC_m) in visoki (QC_h) koncentraciji. Njihove koncentracije so bile 0,1 µmol/L (QC_l) 0,4 µmol/L (QC_m) ter 1 µmol/L (QC_h), tako, da smo pokrili celotno koncentracijsko območje umeritvene krivulje. Te raztopine smo pripravljali posebej in preverjali, če njihova točnost in ponovljivost ustrezata zahtevam smernic za validacijo bioanaliznih metod (43). Točnost QC vzorcev mora bit med 85 in 115% v primerjavi z nomilano koncentracijo, ponovljivost pa znotraj 15%.

Priprava vzorcev

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 200 µL vzorca (oz. standarda) in dodali 50 µL 6 M NaOH, premešali in inkubirali 30 minut v termostatiranem stresalniku pri 60 °C in 20 obratih/min (alkalna hidroliza na proteine vezanega MDA). Vzorce smo nato hladili v hladilniku 10 minut. Potem smo vzorcem dodali 250 µL ohlajene 20 % TCA 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 µL te raztopine smo prenesli v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke ter dodali 150 µL 1 M HCl in 50 µL raztopine DNPH ter ju premešali. Nato smo jih inkubirali 60 minut pri 50 °C na termostatiranem stresalniku pri 20 obratih/min, zaščiteno pred svetlobo. Poteče derivatizacija MDA. Iz 2,4-dninitrofenilhidrazina (DNPH) se tvori hidrazon (MDA-DNPH) in ta produkt ni stabilen v prisotnosti svetlobe, zato smo derivatizirane vzorce ohladili na sobni temperaturi (10 minut), zaščitene pred svetlobo. Vzorcem smo nato dodali 150 µL acetatnega pufra ter premešali. Približno 150 µL raztopine smo odpipetirali v inserte, ki smo jih nato vstavili v obarvane viale. Označene viale z vzorci smo zložili v avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema ohlajenega na 10 °C. Postopek priprave je bil razvit v sklopu diplomske naloge na Katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko (38), povzet in prirejen po članku Czauderne in sod. (44).

Metoda tekočinske kromatografije (LC) in MS/MS

Metodo LC-MS/MS smo povzeli po predhodno izdelani diplomski nalogi na Katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko (45). Uporabili smo HPLC sistem Agilent 1290 Infinity s kolono Kinetex C18 (50 x 2,1 mm, velikost delcev 5 µm) na katero smo injicirali 5 µL vzorca. Vzroci pa so bili hranjeni na 4 °C v avtomatskem vzorčevalniku. 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 analize (t_r) pa je bil 1,23 minute. Analiza se je izvajala z gradientno elucijo s pretokom 0,5 mL/min, po shemi predstavljeni v preglednici V.

Preglednica V: Shema gradientne elucije.

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

Sistem Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem smo uporabili za naš masni analizator. 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 VI.

Preglednica VI: Nastavitev masnega analizatorja za analizo MDA.

Sušilni plin	<i>300 °C, 5 l/min</i>
Nebulizacijski plin	<i>45 psi</i>
Jetstream® plin	<i>320 °C, 11 l/min</i>
Napetost na kapilari	<i>3500 V</i>
Nozzle voltage®	<i>500 V</i>
MDA:SRM prehod	<i>235,1→159,2</i>
Kolizijska energija (CE)	<i>20 eV</i>
Fragmentor (FR)	<i>100 V</i>

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

3.3.12. Določanje glutationa v celicah z LC-MS/MS metodo

Preglednica VII: Priprava reagentov.

Reagent	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.
4 M HCl	50 mL 4 M HCl smo pripravili iz 16,57 mL 37% HCl in dopolnili z vodo do oznake.

Priprava standardov GSH in GSSG

V 10 mL bučko smo natehtali 6,15 mg GSH in dodali 1 mM HCl z 1 mM EDTA do oznake (GSH I). V drugo 10 mL bučko smo natehtali 6,12 mg GSSG in dodali 1 mM HCl z 1 mM EDTA 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 z 1 mM EDTA do oznake. Tako smo dobili osnovno raztopino GSH in GSSG (OR I) s koncentracijami 200 µmol/L in 8 µmol/L. To osnovno raztopino smo redčili z 1 mM HCl z 1 mM EDTA v razmerju 1:10 in dobili raztopino s koncentracijo 20 µmol/L GSH in 0,8 µmol/L GSSG (OR II). Na enak način

smo pripravili raztopine samo z GSH in samo z GSSG, tako da smo dodali le eno komponento in redčili kot zgoraj. Pri večini poskusov smo tako pripravili 6 osnovnih raztopin (v neredčeni in redčeni koncentraciji). Te raztopine smo uporabili za pripravo standardov, v preglednici VIII je prikazana priprava.

Preglednica VIII: Priprava standardov.

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

Priprava vzorcev

K 100 µL vzorca (ali standarda) smo dodali 300 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. Postopek priprave smo povzeli po člankih in ga pripredili (46,47), prav tako pa tudi pogoje za LC in MS/MS analizo (48).

Metoda tekočinske kromatografije (LC) in MS/MS

Za LC smo uporabili 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.

Kot masni analizator smo uporabili 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 IX.

Preglednica IX: Nastavitev masnega analizatorja za analizo GSH in GSSH.

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

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

Metoda standardnega dodatka brez in z derivatizacijo GSH z NEM (N-etilmaleimid)

V predhodnih merjenjih glutationa na naši fakulteti je vselej prišlo do težav z meritvami oksidirane oblike glutationa (GSSG). Zato smo poskušali optimizirati meritve koncentracije le tega. Prvi poskus je bila že uporaba standardnih raztopin reduciranega glutationa, oksidiranega glutationa in kombinacije obeh, ter primerjanje njihovih umeritvenih premic. Ker smo domnevali, da GSH med meritvijo, kljub kislemu mediju in

dodanemu EDTA prehaja v oksidirano obliko, smo se poslužili še metode standardnega dodatka in to preverili.

Poskus smo izvedli tako, da smo najprej pripravili umeritveno premico z redčenimi standardi GSH (koncentracije 0 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM ter 30 µM). Poleg tega pa smo vzeli še 5 mikrocentrifugirk s peletkami PBMC-jev iz netretiranih kontrol, ki so izhajale iz iste vdolbinice mikrotiterske plošče. Te pelete smo raztopili v 1 mM HCl z 1 mM EDTA in dodali standardne dodatke GSH standarda. V eno mikrocentrifugirko nismo dodali nič, v drugo 5 µM GSH, v tretjo 10 µM GSH, četrto 15 µM GSH in peto 20 µM GSH. S pomočjo umeritvene premice smo izračunali koncentracije glutationa v celicah in odšteli vse dobljene vrednosti od kontrole, ki ji nismo dodali standardnega dodatka.

Pri drugem poskusu smo izvedli derivatizacijo glutationa z N-etilmaleimidom (NEM). Pripravo vzorca in analitske pogoje smo povzeli in priredili po literurnih podatkih (47,49). Sama priprava se je od prvotne razlikovala v 45 minut dolgi derivatizaciji vzorcev z NEM. Osnovno raztopino NEM smo pripravili tako, da smo vzeli 5 mg NEM-a, ga raztopili v 1 mL in potem še dodatno redčili 500 µL te raztopine v 1 mL. Vsem vzorcem smo nato dodali 50 µL osnovne raztopine NEM-a in dopolnili z 1 mM HCl do 200 µL. Tako smo dobili molarno razmerje NEM-a proti GSH-ju 125:1.

3.3.13. Obdelava podatkov in statistična analiza

Podatke meritev in izračune smo zbrali in obdelali s programom Microsoft Excel 2010. Uporabili smo ga za izdelavo opisne statistike podatkov. Podatke smo predstavili kot razmerja proučevanega parametra poskusov s PEU s kontrolo ter podali še njihove aritmetične sredine in standardne deviacije.

Statistično analizo smo izvedli s programom IBM Statistical Package for Social Sciences za Windows (verzija 20.0; SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA). Naredili smo parametrični test analize variance s ponovljenimi meritvami R-M ANOVA (angl. Repeated Measures ANOVA), s katerim smo ugotavljali ali je proučevan parameter (preživetje, MDA ali GSH) v eksperimentih s PEU različen od kontrole. Za post-hoc multiple primerjave smo uporabili Tukeyev HSD test. Kot statistično značilne smo upoštevali p vrednosti, ki so bile manjše od 0,05.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. VPLIV PROUČEVANIH PEU NA PRESNOVNO AKTIVNOST CELIC

Vse meritve smo z mikrotiterskim čitalcem Safire² TM Genios izvedli v dveh paralelah (iste mikrotiterske plošče smo pomerili dvakrat) in rezultate podali kot povprečje. Rezultati prikazujejo presnovno aktivnost celic tretiranih s PEU ter kombinacijami PEU, primerjano na kontrolo. Test z reagentom MTS je dobra ocena živosti celic.

Test MTS smo izvajali na začetku laboratorijskega dela diplomske naloge in nam je služil na nek način tudi kot sito, katere učinkovine in kakšno časovno okno sta najbolj relevantna za kasnejše poskuse. Kot PEU je bila vključena tudi valprokska kislina (VAL). Poskus je bil izведен tako na celicah Ramos, kot tudi na perifernih mononuklearnih krvnih celicah prostovoljcev. Na celicah iz celične linije Ramos smo poskus izvedli enkrat, na prostovoljcih A in B pa smo vsa tretiranja izvedli dvakrat in to ne na isti dan, ampak tako, da smo odmrznili nove alikvote celic. Rezultati so prikazani v preglednicah X, XI in XII. Podani so kot povprečje meritev v razmerju s kontrolo.

Preglednica X: Test živosti Ramos celic. Rezultati MTS testa za celice Ramos, po 24 in 48 urni inkubaciji z različnimi koncentracijami in kombinacijami PEU, kot razmerja v primerjavi s kontrolo.

Posamezne PEU							
Čas inkubiranja		24 ur	48 ur	Čas inkubiranja		24 ur	48 ur
nizke konc. [mg/L]	CBZ 10	0,88	0,81	visoke konc. [mg/L]	CBZ 50	0,80	0,56
	TOP 10	0,96	0,83		TOP 75	1,04	0,77
	LEV 25	1,06	0,95		LEV 150	1,07	0,86
	VAL 75	0,98	0,83		VAL 300	0,81	0,49
Kombinacije PEU							
Čas inkubiranja		24 ur	48 ur	Čas inkubiranja		24 ur	48 ur
nizke konc. [mg/L]	CBZ/TOP 10/10	0,84	0,82	visoke konc. [mg/L]	CBZ/TOP 50/75	0,69	0,53
	CBZ/LEV 10/25	1,09	0,94		CBZ/LEV 50/150	1,01	0,77
	CBZ/VAL 10/75	0,82	0,71		CBZ/VAL 50/300	0,71	0,35

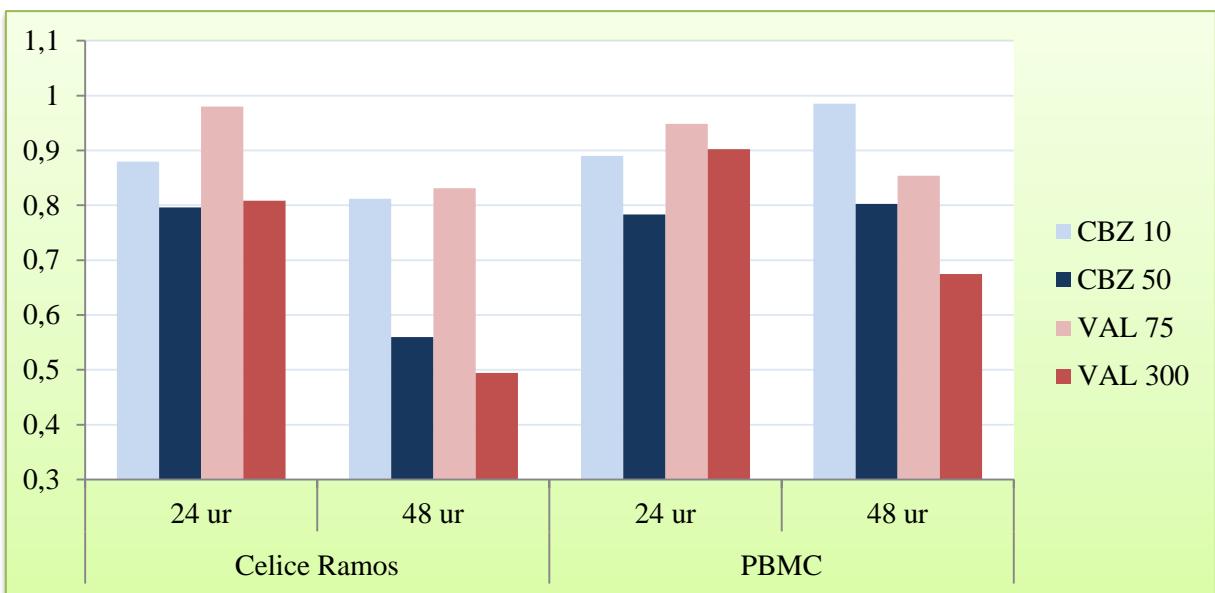
Preglednica XI: Test živosti PBMC-jev. Rezultati MTS testa za PBMC-je prostovoljca A po 24 in 48 urni inkubaciji z različnimi koncentracijami in kombinacijami PEU, kot razmerja v primerjavi s kontrolo.

posamezne PEU							
čas inkubiranja		24 ur	48 ur	čas inkubiranja		24 ur	48 ur
nizke konc. [mg/L]	CBZ 10	1,34	0,94	visoke konc. [mg/L]	CBZ 50	1,04	0,93
	TOP 10	1,35	1,42		TOP 75	1,40	1,32
	LEV 25	1,41	1,48		LEV 150	1,46	1,39
	VAL 75	0,95	0,81		VAL 300	0,95	0,54
kombinacije PEU							
čas inkubiranja		24 ur	48 ur	čas inkubiranja		24 ur	48 ur
nizke konc. [mg/L]	CBZ/TOP 10/10	0,98	1,01	visoke konc. [mg/L]	CBZ/TOP 50/75	0,80	0,83
	CBZ/LEV 10/25	0,87	0,85		CBZ/LEV 50/150	0,77	0,74
	CBZ/VAL 10/75	1,02	0,91		CBZ/VAL 50/300	0,77	0,51

Preglednica XII: Test živosti PBMC-jev. Rezultati MTS testa za PBMC-je prostovoljca B po 24 in 48 urni inkubaciji z različnimi koncentracijami in kombinacijami PEU, kot razmerja v primerjavi s kontrolo.

posamezne PEU							
čas inkubiranja		24 ur		48 ur		čas inkubiranja	
nizke konc. [mg/L]	CBZ 10	0,89	0,99	visoke konc. [mg/L]	CBZ 50	0,78	0,80
	TOP 10	1,06	0,98		TOP 75	1,00	0,94
	LEV 25	1,01	1,05		LEV 150	1,02	1,09
	VAL 75	0,95	0,85		VAL 300	0,90	0,67
kombinacije PEU							
čas inkubiranja		24 ur		48 ur		čas inkubiranja	
nizke konc. [mg/L]	CBZ/TOP 10/10	0,91	0,83	visoke konc. [mg/L]	CBZ/TOP 50/75	0,79	0,65
	CBZ/LEV 10/25	0,94	0,91		CBZ/LEV 50/150	0,70	0,80
	CBZ/VAL 10/75	1,03	0,92		CBZ/VAL 50/300	1,05	0,59

Iz metabolne aktivnosti celic po 48 urah primerjane na kontrolo smo ugotovili, da časovno obdobje izpostavljanja PEU ni predolgo (če se omejimo na PBMC-je, ki so celice izbora v našem primeru). Pri Ramos celicah se vplivi učinkovin precej bolj pozna, to pa verjetno zato, ker se v 48 urah vsaj enkrat delijo in PEU lahko ovirajo njihovo rast. Tako na primer karbamazepin v visokih koncentracijah zelo zniža metabolno aktivnost celic in razlog je v zmanjšani proliferaciji celic (50). Prav tako so Perez Martin in sod. ugotovili, da CBZ lahko povzroči zastoj mitotske delitve celic (51). Podoben efekt je pri VAL še močnejši, ob kombinaciji obeh (CBZ/VAL) pa se še dodatno poveča (slika 11).



Slika 11: Metabolna aktivnost celic Ramos in celic PBMC. Predstavljena v dveh časovnih točkah za nizke in visoke koncentracije CBZ in VAL, kot razmerja v primerjavi s kontrolo.

Na podlagi teh primerjav smo se odločili, da VAL ne dodamo v našo študijo, saj je njen vpliv na preživetje celic premočan. TOP in LEV ne kažeta večjih razlik glede zmanjšane živosti v primerjavi s kontrolami. Prav tako ni vidnega efekta proliferacije pri celicah Ramos. Le visoke koncentracije v kombinaciji s karbamazepinom nekoliko zmanjšajo metabolno aktivnost, kar spet pride najbolj do izraza pri celicah iz celične linije Ramos. Tak odziv pripisujemo učinku karbamazepina in ne topiramatu oziroma levetiracetamu.

4.2. UGOTAVLJANJE TOKSIČNIH UČINKOV PEU S POMOČJO ODSTOTKA PREŽIVELIH CELIC

Štetje celic je imelo velik pomen pri osnovanju naših poskusov, saj smo vse rezultate meritev MDA in GSH normirali na število živih celic. Prav tako bi vse naše analize analitov v vzorcih bile brezpredmetne, če bi prihajalo do prevelikega odmiranja celic (iz mrtvih celic bi se sproščalo več MDA in GSH). Do tega bi lahko prišlo zaradi poškodb, za celico ključnih in pomembnih struktur, ki imajo lahko vzrok v neprimernem okolju celic. Zato smo vzporedno s pripravo vzorcev za merjenje MDA in GSH, vselej prešteli tudi število celic. Celice smo šteli na začetku poskusa (preden smo v celične suspenzije dodali protiepiletične učinkovine) in ob koncu inkubacije po 48 urah (prav tako v mediju s celicami). 48 urno obdobje smo izbrali, ker smo pričakovali, da efekta zmanjšanega

preživetja zaradi slabih okoljskih pogojev (npr. izčrpanost medija) še ne bo (kot ustrezeno smo upoštevali vsaj 80 % preživetje). Pričakovali pa smo, da bodo vidne kakršnekoli spremembe v rezultatih meritev naših označevalcev oksidativnega stresa. Pred poskusi na PBMC, smo izvedli nekaj zgolj informativnih poskusov na celicah Ramos, ki smo jih prav tako tretirali s PEU in spremljali odstotek preživelih celic. Preverjali pa smo tudi metabolno aktivnost na Ramos celični liniji s testom MTS (podpoglavlje 4.1.). Z opazovanjem in štetjem celic pod invertnim mikroskopom smo ugotovili, da odmiranje celic ni kritično. Glede na to, da se PBMC ne množijo, nam podatek o živosti celic ne pove veliko in smo se odločili za podajanje zgolj odstotka preživelih celic. Prav tako mrtvih celic dostikrat ni mogoče videti pod mikroskopom, saj odmirajo na različne načine. Lahko na primer pride do programirane celične smrti (apoptoze) ali pa do nekontroliranega izlitja celice (nekroza) (52). Zato se nismo spuščali v štetje mrtvih celic in ocenili, da je primarnega pomena število živih celic, ki pa je zelo pomembno in se lahko posledično odraža tudi v spremembah koncentracij celičnih označevalcev oksidativnega stresa.

Po enačbi, ki je navedena v poglavju 3, smo izračunali odstotek živih celic glede na začetek in konec inkubacije. Rezultate bomo predstavili ločeno za posamezne učinkovine ter kombinacije učinkov in jih primerjali z netretiranimi kontrolami.

4.2.1. Nizke in visoke koncentracije PEU

Preglednici XIII in XIV prikazujeta povprečen odstotek preživelih celic in standardni odklon za nizke in visoke koncentracije PEU. Predstavljeni so rezultati za štiri različne prostovoljce. Koncentracije protiepileptičnih učinkovin, s katerimi smo tretirali, so bile za vse prostovoljce enake, prav tako tudi časovni točki štetja celic (začetek in konec inkubacije po 48 urah).

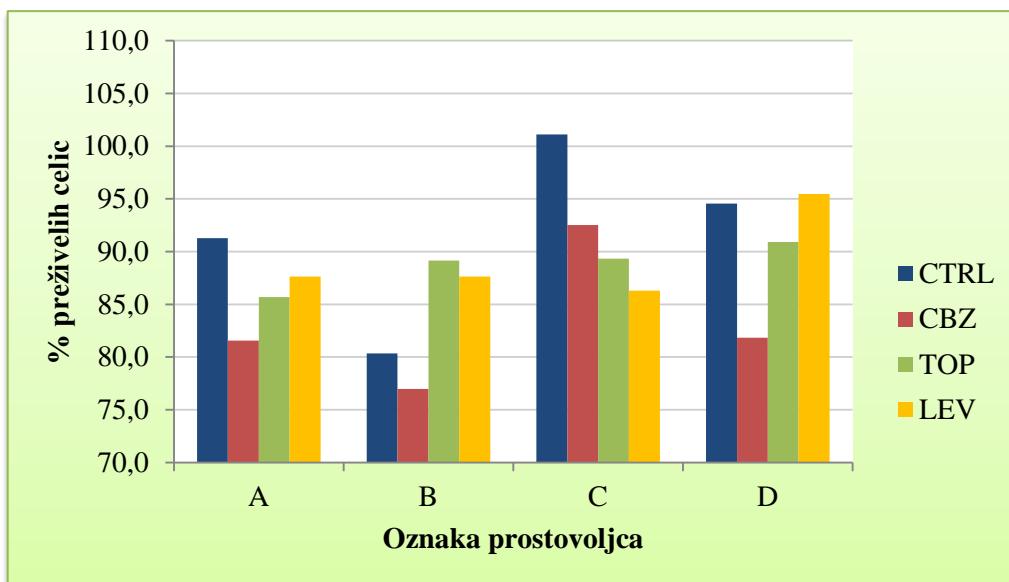
Preglednica XIII: Živost primarnih limfocitov. Odstotek preživelih celic tretiranih z nizkimi koncentracijami PEU.

% preživelih celic		Oznaka prostovoljca			
Nizke koncentracije protiepileptičnih učinkovin	A CBZ in CTRL (n=3), TOP in LEV (n=2)	B (n=3)	C (n=2)	D (n=2)	povprečje
CTRL	70,9±14,6	89,4±16,0	91,3±3,1	91,9±7,2	85,9±10,1
CBZ 10 mg/L	76,7±19,8	90,2±6,9	71,7±9,1	91,3±4,5	82,5±9,8
TOP 10 mg/L	71,2±9,2	88,7±2,6	81,4±4,5	95,3±3,8	84,1±10,4
LEV 25 mg/L	68,7±5,8	88,0±1,3	78,4±18,6	95,0±1,4	82,5±11,5

Preglednica XIV: Živost primarnih limfocitov. Odstotek preživelih celic tretiranih z visokimi koncentracijami PEU.

% preživelih celic		Oznaka prostovoljca			
Visoke koncentracije protiepileptičnih učinkovin	A (n=2)	B (n=1)	C (n=2)	D (n=1)	povprečje
CTRL	91,3±35,7	80,3	101,1±4,1	94,5	91,8±8,7
CBZ 50 mg/L	81,6±19,2	77,0	92,5±7,7	81,8	83,2±6,6
TOP 75 mg/L	85,7±25,1	89,2	89,3±22,2	90,9	88,8±2,2
LEV 150 mg/L	87,6±24,4	87,6	86,3±10,9	95,5	89,3±4,2

Na podlagi rezultatov prikazanih v razpredelnicah in vseh predhodno narejenih poskusih je razvidno, da časovno obdobje ni predolgo in celice v veliki meri preživijo 48 urno inkubacijo. Če izvzamemo prostovoljca A (nizke koncentracije PEU), je preživetje celic v kontroli pri vseh prostovoljcih primerljivo. Ni opaznih razlik, če primerjamo preživetje celic kontrole in ostalih celic podvrženim različnim PEU. Prav tako ni večjih razlik oziroma se ne kažejo kakršnikoli trendi, če primerjamo vrednosti istih prostovoljcev pri nizki in visoki koncentraciji. Manjši upad preživelih celic je opazen le pri zvišani koncentraciji CBZ (50 mg/L), tudi ta pa ni statistično značilen (slika 12). To bi lahko kazalo na potencialno toksičnost CBZ.



Slika 12: Delež preživelih celic tretiranih z visokimi koncentracijami PEU.

4.2.2. Nizke in visoke koncentracije kombinacij PEU

Preglednici XV in XVI prikazujeta povprečen odstotek preživelih celic in standardni odklon za nizke in visoke koncentracije kombinacij PEU. Predstavljeni so rezultati za štiri različne prostovoljce. Koncentracije protiepileptičnih učinkovin, s katerimi smo tretirali celice so bile za vse prostovoljce enake in sicer CBZ/TOP 10/10 mg/L in CBZ/LEV 10/25 mg/L, ki so predstavljale nizke koncentracije, ter CBZ/TOP 50/50 mg/L in CBZ/LEV 50/150 mg/L, ki so predstavljale visoke koncentracije. Prav tako sta bili enaki tudi časovni točki štetja celic (začetek in konec inkubacije po 48 urah). Številke za kontrole so iste kot v primeru posameznih PEU, saj so bili poskusi izvedeni v istih mikrotiterskih ploščicah.

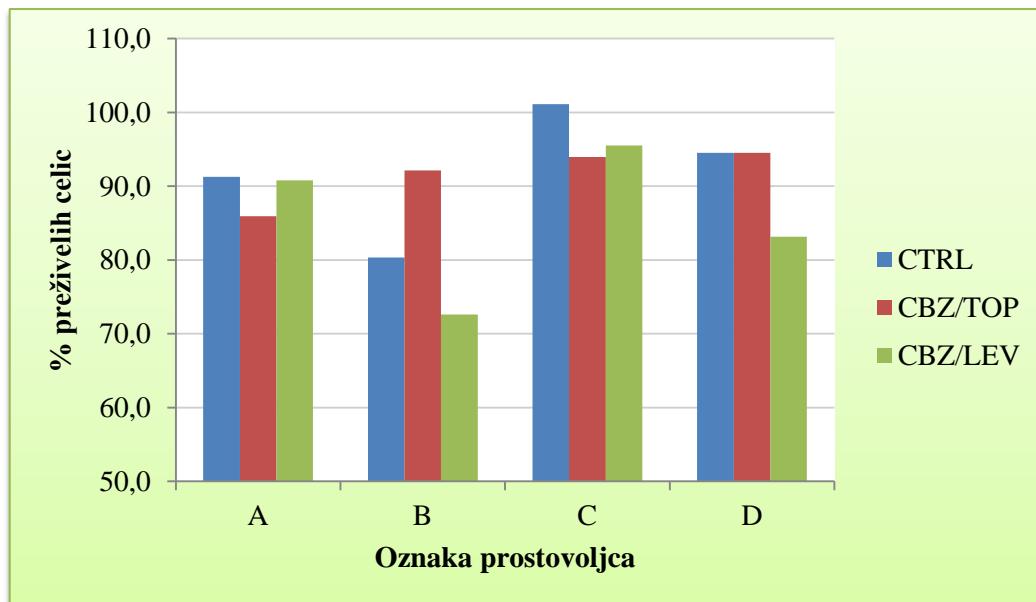
Preglednica XV: Živost primarnih limfocitov. Odstotek preživelih celic tretiranih s kombinacijami nizkih koncentracij PEU.

Nizke koncentracije protiepileptičnih učinkovin	% preživelih celic				Oznaka prostovoljca	povprečje
	A (n=3)	B (n=3)	C (n=2)	D (n=2)		
CTRL	70,9±14,6	89,4±16,0	91,3±3,1	91,9±7,2	85,9±10,1	
CBZ/TOP	80,3±18,8	91,5±15,0	86,9±6,6	93,9±2,3	88,1±6,0	
CBZ/LEV	74,8±19,5	93,5±2,0	87,4±7,3	98,6±4,4	88,6±10,3	

Preglednica XVI: Živost primarnih limfocitov. Odstotek preživelih celic tretiranih s kombinacijami visokih koncentracij PEU.

Visoke koncentracije protiepileptičnih učinkovin	% preživelih celic				Oznaka prostovoljca povprečje
	A (n=2)	B (n=1)	C (n=2)	D (n=1)	
CTRL	91,3±35,7	80,3	101,1±4,1	94,6	91,8±8,7
CBZ/TOP	85,9±31,6	92,1	94,0±19,9	94,6	91,6±4,0
CBZ/LEV	90,8±26,8	72,6	95,5±12,0	83,2	85,5±10,0

Podobno kot pri posameznih učinkovinah, lahko tudi pri kombinaciji učinkovin ugotovimo, da do bistvenih razlik ne prihaja. Preživetje celic med različnimi kontrolami ter med kontrolami in tretiranimi celicami je primerljivo in tudi odstotek preživelih celic je visok (okrog 90%). Mogoče je vredno izpostaviti le manjši upad živosti pri kombinaciji visokih koncentracij karbamazepina in levetiracetama v primerjavi s kontrolami (slika 13). Podoben trend se je pokazal tudi pri visoki koncentraciji karbamazepina, kar nakazuje na njegove potencialne toksične učinke. Število celic pri kombinaciji karbamazepina in topiramata v visokih koncentracijah pa se ni razlikovalo v primerjavi s kontrolami, kar bi lahko nakazovalo na ugoden medsebojni vpliv teh dveh učinkovin na preživetje celic (53).



Slika 13: Delež preživelih celic tretiranih z visokimi koncentracijami kombinacij PEU.

4.3. REZULTATI MERITEV MDA IN GSH

4.3.1. Optimizacija metod za določanje izbranih označevalcev oksidativnega stresa.

Metoda za določanje MDA je bila že postavljena in s stališča analitike ni povzročala težav, tako da smo prevzeli obstoječo. Drugače je bilo pri določevanju obeh oblik glutationa. Želeli smo optimirati pripravo in meritve GSH-ja, da bi bilo možno določiti tako reducirano kot oksidirano obliko, saj je podajanje razmerja obeh najbolj realen pokazatelj redoks stanja celice (54,55). Z metodo standardnega dodatka smo želeli preveriti ali se biološkemu vzorcu (celicam), ki mu dodamo znano količino GSH, proporcionalno poveča tudi odziv. Rezultati poskusa so na kratko opisani v preglednici XVII. Iz prvih dveh stolpcev smo izračunali umeritveno premico za GSH z enačbo (determinacijski koeficient $R^2 = 0,998$):

$$\text{odziv} = 66718,1 \times \text{koncentracija GSH} - 79829,4.$$

Na podlagi umeritvene premice izračunani standardni dodatki niso ekvivalentni dejanskim dodatkom standardov GSH, kar nakazuje na neke vrste izgubljanje. Tudi odziv GSSG narašča z višanjem koncentracije standardnega dodatka GSH, kar prav tako kaže na prehajanje med temo dvema oblikama med samo analizo.

Preglednica XVII: Podatki standardov in vzorcev za izvedbo izračuna po metodi standardnega dodatka.

konc. standarnega dodataka GSH [μM]	odziv standarda GSH	odziv GSSG za standard GSH	odziv GSH biološkega vzorca s standardnim dodatakom	$C_{\text{GSH}} [\mu\text{M}]^{\text{a}}$	točnost [%] ^b
0	776	953	326322		
5	245597	7435	356359	1,6	32,9
10	604456	14812	713906	7,0	70,1
15	889857	15636	817115	8,6	57,0
20	1287360	21002	977660	11,0	54,8
30	1911029	30510			

a) C_{GSH} predstavlja izračunan standardni dodatek iz biološkega vzorca.

b) Točnost predstavlja razmeje med dejanskim dodanim ter izračunanim standardnim dodatkom.

Eksperiment smo ponovili in uporabili metodo derivatizacije reducirane oblike glutationa z N-etilmaleimidom (NEM). NEM alkilira tiolne skupine in tako naj bi preprečil oksidacijo reduciranega glutationa med samo pripravo in potekom analize. Iz preglednice XVIII, kjer smo spremljali reducirano obliko glutationa je razvidno, da so odzivi v izbranem območju sicer linearni, a z naraščanjem koncentracije dodanega GSH odziv/koncentracija GSSG prav tako narašča. Točnost pridelanih standardnih dodatkov GSH v primerjavi z dejanskimi dodanimi je še slabša kot v poskusu brez derivatizacije, zato smo za nadaljnje meritve uporabili staro že preverjeno metodo za merjenje GSH z LC-MS/MS brez derivatizacije. Enačba umeritvene premice (determinacijski koeficient $R^2 = 0,998$):

$$\text{odziv} = 6359,1 \times \text{koncentracija GSH} - 4398,9.$$

Preglednica XVIII: Podatki standardov in vzorcev za izvedbo izračuna po metodi standardnega dodatka (derivatizacija).

konc. standarnega dodataka GSH [μM]	odziv standarda GSH	odziv GSSG za standard GSH	odziv GSH biološkega vzorca s standardnim dodatkom	$C_{\text{GSH}} [\mu\text{M}]^a$	točnost [%] ^b
0	143	3189	23772		
5	35128	2846	62855	9,2	183,9
10	68002	5189	37357	5,2	51,8
15	98238	7361	36201	5,0	33,3
20	136539	8736	50805	7,3	36,5
30	192811	11556			

a) C_{GSH} predstavlja izračunan standardni dodatek iz biološkega vzorca.

b) Točnost predstavlja razmeje med dejanskim dodanim ter izračunanim standardnim dodatkom.

Standardne raztopine GSSG so sicer v našem želenem koncentracijskem območju dajale linearne odzive. Tako smo se rešili problema odzivov pod mejo kvantifikacije. Vseeno smo na podlagi zgornjih poskusov, kjer smo ugotovili, da dodan GSH dvigne odzive endogenega GSSG v celičnem vzorcu, izbrali le podajanje rezultatov v obliki razmerja koncentracije GSH tretiranih vzorcev v primerjavi s kontrolo.

Zaradi dolgotrajne priprave vzorcev in meritev smo analize MDA izvedli v 11 dneh. Umeritvenih premic nismo delali vsak dan, temveč le 5-krat (te smo povprečili in tvorili le dve umeritveni premici). Ostale dni smo v meritve vključili le 3 QC standardne raztopine v

koncentracijah 0,1 µmol/L, 0,4 µmol/L ter 1 µmol/L, s katerimi smo potrjevali ustreznost metode. Vse točke na umeritvenih premicah so znotraj želenega intervala točnosti. QC odstopajo največ za 20 odstotkov. Vse koncentracije MDA smo nato preračunali na dve povprečni umeritveni premici (preglednica XIX).

Preglednica XIX: Umeritvene premice za določanje koncentracij MDA.

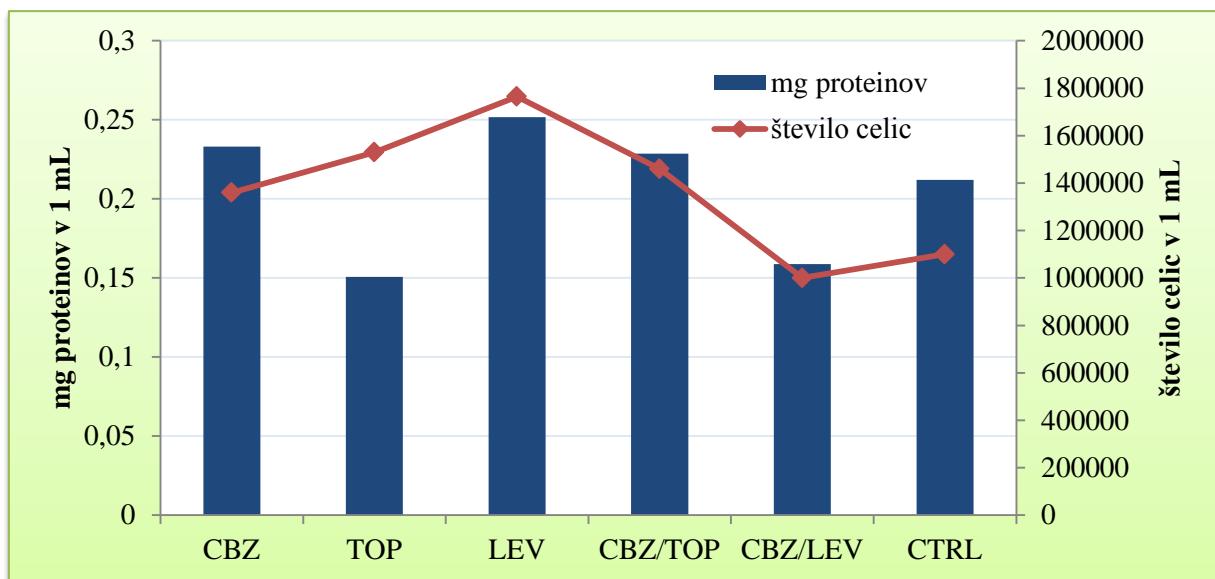
	MDA	UP 1	UP 2
k	2758,3	4259,9	
n	164,5	371,9	
r ²	0,998	0,999	

Enostavnejše in hitrejše priprave vzorcev za analizo GSH so nam omogočale, da smo ta parameter lahko pomerili v samo dveh dneh. Obakrat smo pripravili še umeritveni premici tako za GSH, kot za GSSG (preglednica XX). Točnost vseh standardov je bila znotraj 15 odstotkov.

Preglednica XX: Umeritvene premice za določanje koncentracij GSH in GSSG.

GSH	UP 1	UP 2	GSSG	UP 1	UP 2
k	94951,8	97275,6	k	136548	14276,3
n	4420,7	-374,7	n	2006,4	2632,2
r ²	0,999	0,999	r ²	0,998	0,990

Rezultate MDA in GSH smo želeli čim bolj reprezentativno predstaviti. Izmerjene koncentracije MDA in GSH smo spremenili v množine in jih predstavili kot množino MDA in GSH na število celic oziroma mg proteinov. Odločili smo se, da izberemo normiranje na celice namesto normiranja na proteine. Na sliki 14 vidimo primerjavo med maso (mg) proteinov (stolpci) in številom celic (povezane točke) za prostovoljca »1«. Celice so bile tretirane z nizko koncentracijo učinkovin. V tem primeru se je s spremenjanjem mase proteinov sorazmerno spremenjalo tudi število celic. Izjema je bil le topiram, kjer je bila relativno gledano masa proteinov nižja od števila celic. Podoben trend je opazen tudi pri drugih vzorcih, a vselej prihaja do razlik med proteini in celicami, predvsem na račun meritev proteinov, kjer določene meritve precej odstopajo.



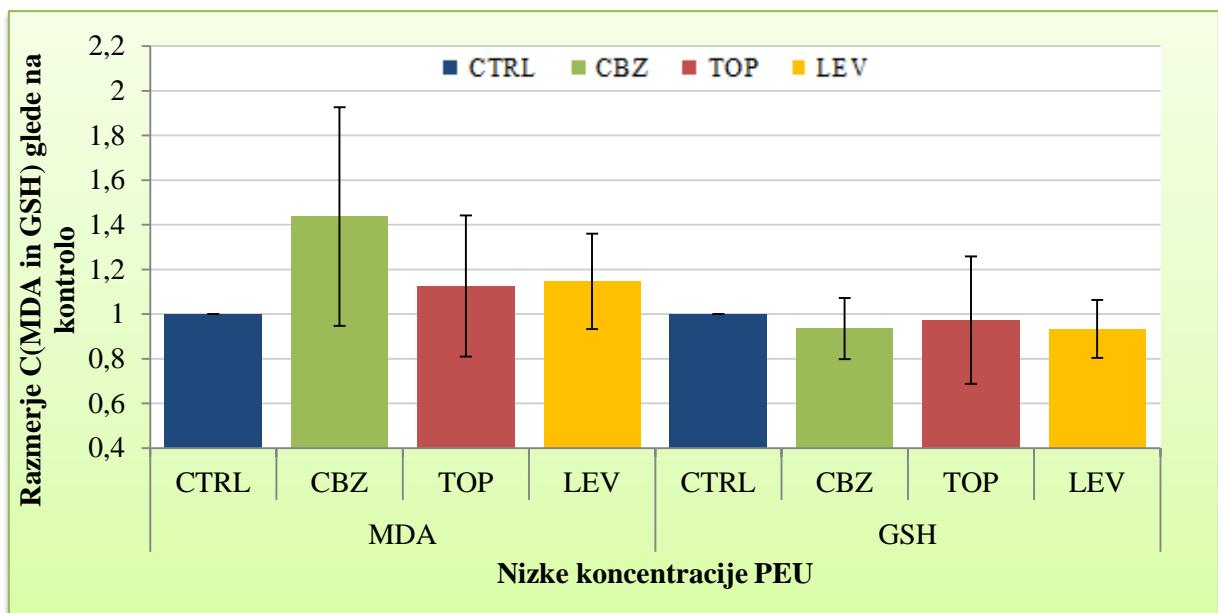
Slika 14: Primerjava med maso (mg) proteinov in številom celic za prostovoljca »C« v poskušu tretirnja PBMC s protipileptičnimi učinkovinami v nizki koncentraciji.

4.3.2. Nizka in visoka koncentracija PEU

Preglednica XXI in slika 15 prikazujeta rezultate meritev MDA in GSH pri nizki koncentraciji PEU za štiri različne prostovoljce. Rezultati v tabeli so povprečja posameznih paralelk \pm standardni odkloni, podana kot razmerje glede na kontrolo. V oklepajih je podano število paralel za vsako meritev.

Preglednica XXI: Rezultati meritev MDA in GSH za nizke koncentracije PEU.

prostovoljec		A	B	C	D	povprečje (n=4)
		MDA (n=2) GSH (n=3)	MDA (n=4) GSH (n=3)	MDA (n=4) GSH (n=2)	MDA (n=2) GSH (n=2)	
MDA	CTRL	1	1	1	1	1
	CBZ	2,16 \pm 0,20	1,22 \pm 0,28	1,07 \pm 0,11	1,29 \pm 0,02	1,44 \pm 0,49
	TOP	1,32 \pm 0,13	1,47 \pm 0,12	0,84 \pm 0,25	0,88 \pm 0,08	1,13 \pm 0,32
	LEV	1,27 \pm 0,03	1,38 \pm 0,25	1,03 \pm 0,21	0,91 \pm 0,14	1,15 \pm 0,21
GSH	CTRL	1	1	1	1	1
	CBZ	0,98 \pm 0,04	0,75 \pm 0,20	0,93 \pm 0,26	1,08 \pm 0,02	0,93 \pm 0,14
	TOP	0,72 \pm 0,46	0,95 \pm 0,52	0,84 \pm 0,27	1,38	0,97 \pm 0,29
	LEV	0,74 \pm 0,66	1,01 \pm 0,60	0,96 \pm 0,47	1,02 \pm 0,42	0,93 \pm 0,13



Slika 15: Rezultati meritev MDA in GSH za nizke koncentracije PEU.

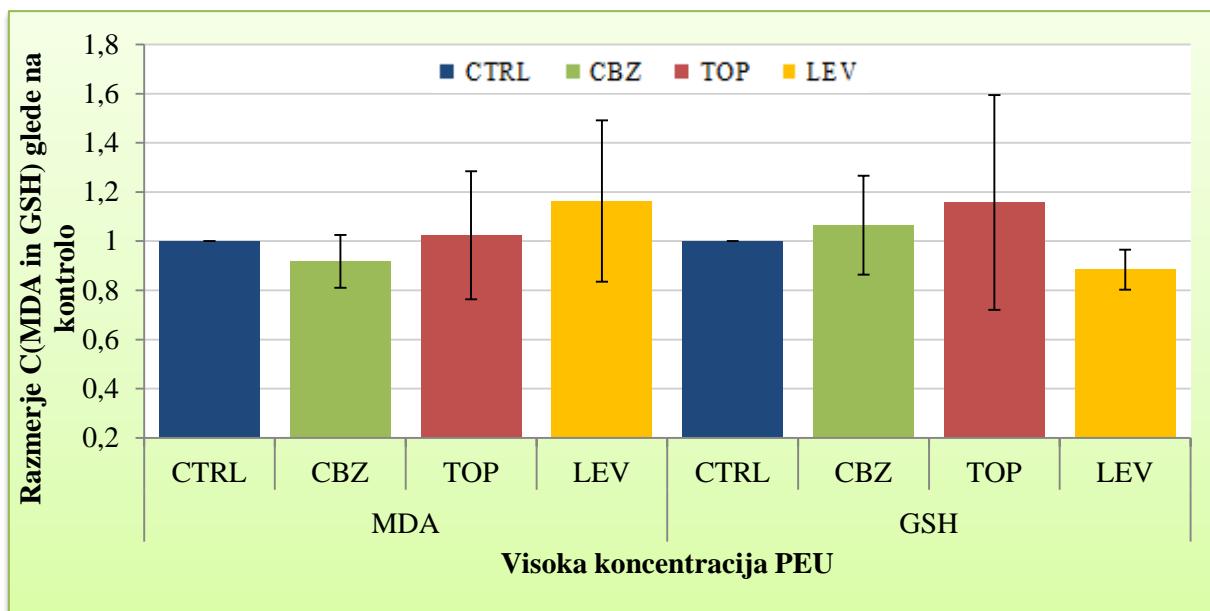
Vrednosti P za MDA (PEU proti CTRL): 0,357 (CBZ); 0,949 (TOP); 0,725 (LEV).

Vrednosti P za GSH (PEU proti CTRL): 0,963 (CBZ); 0,984 (TOP); 0,977 (LEV).

V preglednici XXII in sliki 16 so predstavljeni rezultati meritev MDA in GSH pri visoki koncentraciji PEU za štiri različne prostovoljce. Rezultati v tabeli so povprečja posameznih paralelk \pm standardni odkloni, podana kot razmerje glede na kontrolo. V oklepajih je podano število paralel za vsako meritev.

Preglednica XXII: Rezultati meritev MDA in GSH za visoke koncentracije PEU.

prostovoljec		A MDA (n=2) GSH (n=2)	B MDA (n=1) GSH (n=2)	C MDA (n=3) GSH (n=2)	D MDA (n=3) GSH (n=2)	povprečje (n=4)
MDA	CTRL	1	1	1	1	1
	CBZ	0,95 \pm 0,36	1,02	0,94 \pm 0,16	0,77 \pm 0,18	0,91 \pm 0,11
	TOP	0,72 \pm 0,22	/	1,18 \pm 0,06	1,17 \pm 0,24	1,02 \pm 0,26
	LEV	1,51 \pm 0,63	0,73	1,28 \pm 0,23	1,14 \pm 0,57	1,16 \pm 0,33
GSH	CTRL	1	1	1	1	1
	CBZ	1,27 \pm 0,98	1,13 \pm 0,41	1,08 \pm 0,11	0,79 \pm 0,06	1,07 \pm 0,20
	TOP	1,76 \pm 1,44	1,09 \pm 0,79	0,71 \pm 0,56	1,07 \pm 0,13	1,16 \pm 0,44
	LEV	0,92 \pm 0,28	0,97	0,79 \pm 0,65	0,85 \pm 0,17	0,88 \pm 0,08



Slika 16: Rezultati meritev MDA in GSH za visoke koncentracije PEU.

Vrednosti P za MDA (PEU proti CTRL): 0,945 (CBZ); 1,000 (TOP); 1,000 (LEV).

Vrednosti P za GSH (PEU proti CTRL): 0,998 (CBZ); 1,000 (TOP); 1,000 (LEV).

(i) Karbamazepin

Karbamazepin je v koncentraciji 10 mg/L povzročil dvig koncentracije MDA za približno 44% v primerjavi s kontrolo. V višjih koncentracijah (50 mg/L) pa ni prišlo do razlik koncentracij MDA v primerjavi s kontrolo. Zanimivo je, da smo zelo podobne rezultate dobili v prejšnjih poskusih meritev MDA na celični liniji Ramos (38). Nekako pa ti rezultati niso skladni z ugotovitvami drugih raziskovalcev. Naše rezultate smo primerjali z rezultati raziskav Pavone in sod. Imeli so zelo podoben načrt poskusa in koncentracije učinkovin, bistvena razlika je bila, da so delali z astrociti. Ugotovili so statistično signifikantno povišanje nivojev MDA in tudi drugih označevalcev oksidativnega stresa za naslednje PEU: gabapentin, topiram, karbamazepin, tiagabin in levetiracetam. Dokazali so naraščanje MDA, ROS in NO v odvisnosti od koncentracije (56). Vse več pa je člankov, kjer ugotavljajo, da CBZ v primerjavi s kontrolo ne povzroča oksidativnega stresa in posledično ne poviša koncentracije MDA. Takšne rezultate so dobili tudi Araujo in sod., kjer so na podganah, za razliko od CBZ izmerili precejšnje povišanje ROS pri metabolitih CBZ (57). To je predmet za nadaljne raziskave, saj je podobnih študij, kjer ugotavljajo toksičnost metabolitov CBZ še veliko. Lu in sod. so prav tako merili ROS na podganjih hepatocitih in primerjali med sabo CBZ in 2 njegova hidroksilirana metabolita. Rezultati

so bili podobni, kot pri prej omenjenih študijah. Ugotovili so namreč, da CBZ sam ne povzroča oksidativnega stresa, ampak da to v veliki meri povzročijo njegovi metaboliti (karbamazepin epoksid) (30). Arhan in sod. so v svoji raziskavi na limfocitih prišli celo do spoznanja, da naj bi na dolgi rok CBZ nivoje MDA znižal, medtem ko valprojska kislina nivoje MDA zviša (58).

Pri meritvah GSH smo sicer zaznali manjši padec reducirane oblike pri nizkih koncentracijah CBZ, vendar padec ni bil statistično značilen. Ta rezultat sovpada s tem, da je količina MDA pri nizki koncentraciji CBZ v primerjavi s kontrolo porasla. Predvidevamo, da zaradi oksidativnega stresa povzročenega s strani CBZ pade koncentracija reducirane oblike in nastaja več oksidirane oblike. Za potrditev te hipoteze bi potrebovali še nadaljnje raziskave. Pri visoki koncentraciji CBZ v primerjavi s kontrolo ni prišlo do razlik nivojev GSH. Na medicinski fakulteti v Turčiji so izvedli študijo na otrocih, kjer so Yüksel in sod. ugotovili, da CBZ ni porušil oksidativnega ravnovesja in da so GSH in nekateri encimi, ki delujejo kot antioksidanti, na zelo primerljivih nivojih s kontrolami (59). Podobne rezultate so dobili Arhan in sod., ki pri istem koncentracijskem območju kot mi, na limfocitih niso zaznali nobenih razlik v koncentraciji GSH med tretiranimi vzorci in kontrolami (58). Arora s sod. pa je na možganih podgan ugotovil, da se GSH po določem času zniža, a tega ni uspel statistično dokazati (60).

(ii) Topiramat

Pri topiramatu smo opazili manjše povišanje vrednosti MDA v primerjavi s kontrolo pri nizkih koncentracijah in pravzaprav nobenih sprememb v primerjavi s kontrolo pri visokih koncentracijah. Prav tako večjih razlik nismo dobili pri GSH, katerega vrednost se je zvišala v primerjavi s kontrolo za 16% pri tretiranju naših celic z visoko koncentracijo. Zvišano koncentracijo GSH težko razložimo, mogoče se po 48 urah celice odzovejo na stres in pospešijo sintezo glutationa. Agarwal in sod., so na živalih ugotavliali spremembe v nastalih produktih lipidne peroksidacije in koncentracijah pomembnejših antioksidantov po uporabi TOP in še nekaterih PEU. Ravno za TOP so pri analizi MDA dobili signifikanten porast v primerjavi s kontrolo, medtem ko je pri GSH prišlo do nižje koncentracije reducirane oblike v primerjavi s kontrolo (61). Tudi poskusi na astrocitih, ki so jih izvedli Pavone in sod., so pokazali značilen porast MDA v primerjavi s kontrolo (56). V nedavni raziskavi na celicah PC12 je Demirca s sod. ugotovil, da povišane

koncentracije TOP ne vodijo do sprememb v koncentracijah MDA in GSH. Če pa so v eksperimentih sočasno uporabili še dodatek vodikovega peroksida, je bil porast MDA pri vzorcih s TOP manjši kot v primeru kontrole. Prav tako je tudi znižanje koncentracije GSH v primeru TOP manjše kot v primeru dodatku samega vodikovega peroksida (62).

(iii) Levetiracetam

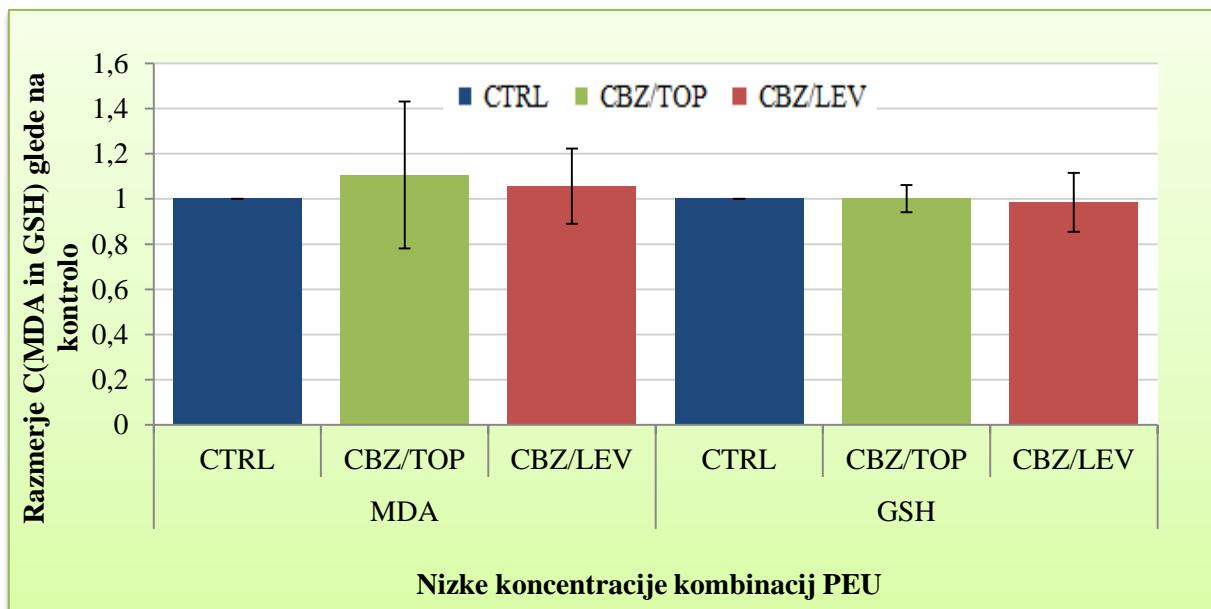
Zanimivo je, da je tudi levetiracetam povzročil manjše povišanje koncentracij MDA po 48 urah v primerjavi s kontrolo, vendar dvig koncentracij ni statistično značilen. Povišanje je opazno tako pri nizkih (~15%), kot pri visokih koncentracijah (~16%). Prav tako pa sorazmerno s povišanjem MDA nekoliko pada koncentracija GSH (pri nizkih ~7%, pri visokih pa ~12%), vendar tudi te razlike niso statistično značilne. V literaturi najdemo nasprotne rezultate za levetiracetam. Dobimo lahko veliko člankov o tem, da naj bi deloval nevroprotективno. Haghikia in sod. so preučevali njegov protivnetni učinek na astrocitih in ugotovili ugodno delovanje levetiracetama (63). So pa nekateri merili tudi iste parametre, kot so bili uporabljeni v naši raziskavi in prav tako ugotovili ugodno delovanje levetiracetama. Marini s sod. je tako meril MDA in GSH ter pri njiju zaznal zmanjšanje dviga MDA in zmanjšanje padca GSH v primerjavi s kontrolo ob tretiranju celic s kainsko kislino. Ta se uporablja za indukcijo epileptičnih napadov v eksperimentalnih modelih epilepsije (64). Do podobnih zaključkov je prišel tudi Ueda s sod., ki je ugotovil, da levetiracetam pospešuje antioksidativno delovanje v hipokampusu podgan in vzdržuje raven GSH (33). Med tem ko Pavone in sod. niso zaznali sprememb med astrociti tretiranimi z levetiracetamom in kontrolnimi vzorci (56).

4.3.3. Nizke in visoke koncentracije kombinacij PEU

Preglednica XXIII in slika 17 prikazujeta rezultate meritev MDA in GSH pri nizki koncentraciji kombinacij karbamazepina s topiramatom in karbamazepina z levetiracetamom za štiri različne prostovoljce. Rezultati so povprečja posameznih paralelk ± standardni odkloni, podana kot razmerje glede na kontrolo. V oklepajih je podano število paralel za vsako meritev.

Preglednica XXIII: Rezultati meritev MDA in GSH za kombinacije nizkih koncentracij PEU.

prostovoljec		A MDA (n=2) GSH (n=3)	B MDA (n=4) GSH (n=3)	C MDA (n=4) GSH (n=2)	D MDA (n=2) GSH (n=2)	povprečje (n=4)
MDA	CTRL	1	1	1	1	1
	CBZ/TOP	1,11 ± 0,26	1,56 ± 0,74	0,83 ± 0,14	0,92 ± 0,12	1,11 ± 0,32
	CBZ/LEV	1,16	1,23 ± 0,19	0,95 ± 0,24	0,88 ± 0,04	1,06 ± 0,17
GSH	CTRL	1	1	1	1	1
	CBZ/TOP	0,92 ± 0,53	1,07 ± 0,42	1,01 ± 0,27	1,01 ± 0,24	1,00 ± 0,06
	CBZ/LEV	1,10 ± 0,21	0,80 ± 0,23	0,99 ± 0,02	1,05 ± 0,36	0,98 ± 0,13



Slika 17: Rezultati meritev MDA in GSH za kombinacije nizkih koncentracij PEU.

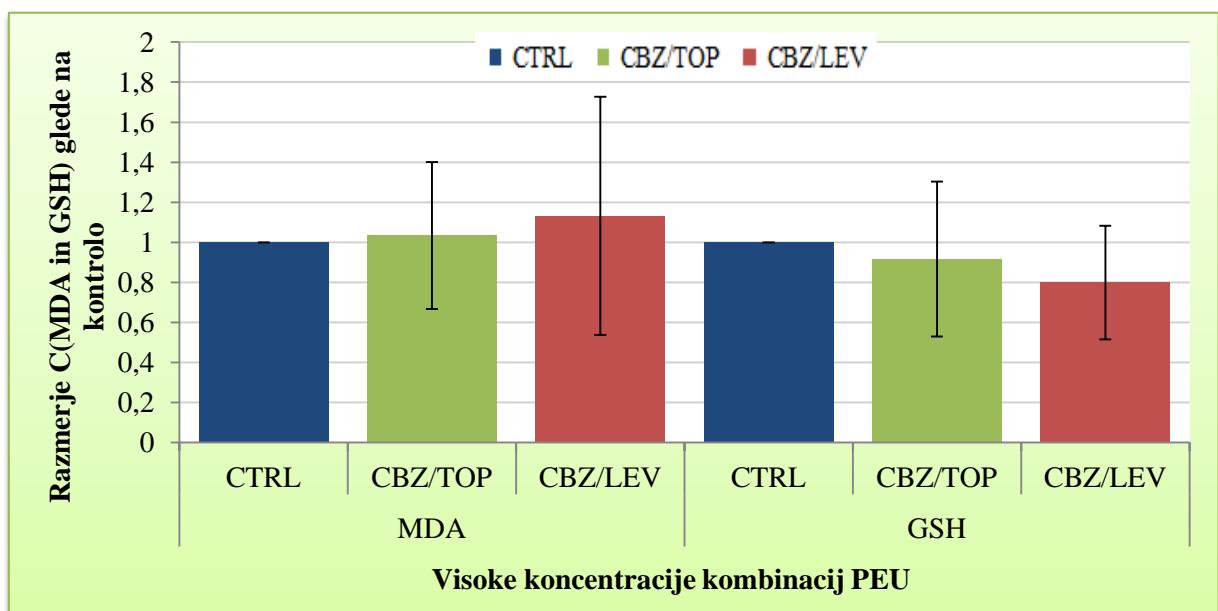
Vrednosti P za MDA (PEU proti CTRL): 0,834 (CBZ/TOP); 0,949 (CBZ/LEV).

Vrednosti P za GSH (PEU proti CTRL): 1,000 (CBZ/TOP); 0,980 (CBZ/LEV).

V preglednici XXIV in sliki 18 so predstavljeni rezultati meritev MDA in GSH pri kombinaciji visokih koncentracij karbamazepina in topiramata, ter karbamazepina in levetiracetama za štiri različne prostovoljce. Rezultati so povprečja posameznih paralel ± standardni odkloni, podana kot razmerje glede na kontrolo. V oklepajih je podano število paralel za vsako meritev.

Preglednica XXIV: Rezultati meritev MDA in GSH za kombinacije visokih koncentracij PEU.

prostovoljec		A MDA (n=2) GSH (n=2)	B MDA (n=1) GSH (n=2)	C MDA (n=3) GSH (n=2)	D MDA (n=3) GSH (n=2)	povprečje (n=4)
MDA	CTRL	1	1	1	1	1
	CBZ/TOP	$1,56 \pm 0,27$	0,71	$0,91 \pm 0,07$	$0,95 \pm 0,28$	$1,03 \pm 0,37$
	CBZ/LEV	$1,98 \pm 1,47$	0,90	$1,04 \pm 0,13$	$0,61 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,59$
GSH	CTRL	1	1	1	1	1
	CBZ/TOP	$0,68 \pm 0,43$	$1,48 \pm 1,12$	$0,84 \pm 0,06$	$0,66 \pm 0,10$	$0,92 \pm 0,39$
	CBZ/LEV	$1,00 \pm 0,76$	0,53	$1,08 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,28$



Slika 18: Rezultati meritev MDA in GSH za kombinacije visokih koncentracij PEU.

Vrednosti P za MDA (PEU proti CTRL): 0,991 (CBZ/TOP); 0,924 (CBZ/LEV).

Vrednosti P za GSH (PEU proti CTRL): 0,678 (CBZ/TOP); 0,962 (CBZ/LEV).

(iv) Kombinacija PEU

Pri nizkih koncentracijah kombinacij ni prišlo do večjih sprememb v nivojih merjenih označevalcev oksidativnega stresa. Opazili smo sicer trend povišanja (~11%) koncentracij MDA pri kombinaciji CBZ/TOP v primerjavi s kontrolo, vendar so standardni odkloni preveliki, da bi lahko dokazali kakršnekoli razlike. Prav tako ni večjih sprememb pri

visokih koncentracijah PEU. Opazimo pa trend upadanja GSH, ki lahko vodi do znižanega redoks potenciala celic. Najbolj opazen je ~20% padec koncentracije GSH pri CBZ/LEV v primerjavi s kontrolo. Vseeno lahko na podlagi naših rezultatov zaključimo, da kombinacije učinkovin nimajo negativnega aditivnega učinka posameznih PEU na celice. Karbamazepin v kombinaciji s topiramatom in levetiracetamom deluje manj stresno na celice, kot pa v monoterapiji.

Člankov, kjer se omenjajo vplivi kombinacij PEU na oksidativno stanje v celici je v primerjavi s članki o monoterapijah s PEU precej manj. Varoglu in sod. so v študiji izvedeni na bolnikih z epilepsijo prišli do spoznanja, da CBZ v kombinaciji z LEV, v nasprotju z monoterapijo CBZ ne spremeni antioksidantno/oksidantnega razmerja (65).

5. SKLEPI

Namen diplomske naloge je bil, da ugotovimo vpliv PEU na nastanek oksidativnega stresa v celicah. To smo ugotavljali tako, da smo merili spremembe koncentracij GSH in MDA v PBMC, ki smo jih izpostavili delovanju PEU. V diplomski nalogi smo primerjali vpliv različnih koncentracij PEU, kot tudi njihovih kombinacij na PBMC različnih prostovoljcev, tako smo imeli vpleten tudi faktor biološke variabilnosti.

S testom presnovne aktivnosti smo ugotovili, da predvsem CBZ in VAL, v še večji meri pa njuni kombinaciji, vplivata na presnovno aktivnost celic v 48 urnem časovnem obdobju. Ob štetju preživelih celic po koncu tretiranj s CBZ, TOP in LEV ter CBZ/TOP in CBZ/LEV smo prišli do ugotovitve, da je preživetje v vseh primerih večje od 80 odstotkov.

Pri meritvah označevalcev oksidativnega stresa smo zaznali trende povišanja koncentracij MDA v primerjavi s kontrolo, ob tretiranju s CBZ v območjih terapevtskih koncentracij. Medtem, ko do teh razlik ne pride ob tretiranju s TOP in LEV, ter pri kombinaciji CBZ in drugih PEU. Iz tega lahko sklepamo na ugodno delovanje kombinacij TOP in LEV s CBZ na nastanek oksidativnega stresa v primerjavi z monoterapijo s CBZ. Manjše razlike v primerjavi s kontrolo so se pojavljale tudi pri meritvah GSH, predvsem v smer zmanjšanja koncentracije tega znotraj-celičnega antioksidanta. Do največje razlike pri zmanjšanju koncentracije GSH je prišlo pri kombinaciji CBZ/LEV. Pri višjih koncentracijah PEU nismo dokazali razlik v koncentraciji MDA in GSH pri tretiranju celic v primerjavi s kontrolami. Razlike med rezultati meritev MDA in GSH niso bile statistično signifikantne.

Za nadaljnje poskuse bi bilo potrebno optimirati pripravo vzorcev. Domnevamo, da se lahko različno velik delež celic ob centrifugiranju, pipetiranju in tvorbi peletk izgubi. Poleg tega bi lahko uporabili kakšne druge metabolno bolj oziroma drugače aktivne celice (hepatociti ali astrociti), ki prav tako dobro oponašajo »*in vivo*« pogoje kot PBMC. Za prihodnje delo na celicah in ugotavljanje oksidativnega stresa povzročenega s strani PEU predlagam, da se raziskava usmeri v merjenje še drugih parametrov, kot so na primer ROS, interlevikini ter različni encimski antioksidanti. Lahko bi uporabili tudi druge tehnike merjenja teh označevalcev, ena izmed njih je na primer pretočna citometrija. Lahko pa bi sočasno poleg označevalcev v celicah merili tudi koncentracije metabolitov učinkovin in s tem pokazali, da je oksidativni stres povezan s presnovou PEU.

6. LITERATURA

1. Halliwell B, Gutteridge MCJ. Free radicals in biology and medicine, fourth edition. Oxford University Press Inc., 2007.
2. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? Trends in pharmacological sciences. 2011;32(3):125–30.
3. Sardina JL, López-Ruano G, Sánchez-Sánchez B, Llanillo M, Hernández-Hernández A. Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? Critical reviews in oncology/hematology. 2012;81(3):257–74.
4. Osredkar J. Oksidativni stres/Oxidative stress. Zdravniški vestnik. 2012;81(5):393–406.
5. Mravljak J, Mašič LP. Resnice in polresnice o antioksidantih. Prehranska dopolnila II. 2010:1–31.
6. Pečar S. Ultravijolični stres in fotostaranje. Fakulteta za farmacijo. 2012:17–32.
7. Foote CS. Active oxygen in chemistry. 1995:343.
8. Jiang C, Gao Z, Qu H, Li J, Wang X, Li P, et al. A new insight into Fenton and Fenton-like processes for water treatment: Part II. Influence of organic compounds on Fe(III)/Fe(II) interconversion and the course of reactions. Journal of hazardous materials. 2013;250-251:76–81.
9. Ribarič S, Šuput D. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 2009: 19–24, 291–307.
10. Vitte J, Michel B, Bongrand P. Oxidative stress level in circulating neutrophils in linked to neurodegenerative disease. Journal of Clinical Immunology. 2004;Vol. 24(No. 6):683–92.
11. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. Epilepsy research. 2010;88(1):23–45.
12. Fisher R, Boas W, Blume W, Elger G, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia. 2005;46(4):470–2.
13. Stephen J, Brodie M. Selection of Antiepileptic Drugs in Adults. Neurologic Clinics. 2009;27(4):967–92.
14. Panayiotopoulos C. The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: critical review and contribution. Epilepsia. 2012;53(3):399–404.

15. Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. Rang and Dale's Pharmacology. 6th edition. Elsevier limited. 2007: 575–87.
16. Lemke T, Williamsm D. Foye's principles of medicinal chemistry. 6th. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 2007: 521–46.
17. Zgonc V, Čebular B. Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. Farmacevtski vestnik. 2006;75:379–88.
18. Reynolds J. Martindale, the extra pharmacopoeia. 36th. The pharmaceutical press. London. 2009: 465–508.
19. Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. Seizure : the journal of the British epilepsy association. 2010;19(10):650–5.
20. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser T a, Johannessen SI, et al. Antiepileptic drugs--best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on therapeutic strategies. Epilepsia. 2008;49(7):1239–76.
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Carbamazepine> [dostop 19.04.2013].
22. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Carbamazepine.svg> [dostop 17.08.2013].
23. Bialer M, Johannessen SI, Levy RH, Perucca E, Tomson T, White HS. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the tenth eilat conference (EILAT X). Epilepsy research. 2010;92(2-3):89–124.
24. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Topiramate.svg> [dostop 17.08.2013].
25. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Levetiracetam.svg> [dostop 17.08.2013].
26. Shin E-J, Jeong JH, Chung YH, Kim W-K, Ko K-H, Bach J-H, et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. Neurochemistry international. 2011;59(2):122–37.
27. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. Biochemical and biophysical research communications. 2010;393(4):561–4.
28. Aycicek A, Iscan A. The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. European Neurology. 2007;57:65–9.
29. Ashrafi R. A Probable causative factor for an old Problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. Epilepsia. 2007;48(9):1750–5.
30. Lu W, Utrecht JP. Peroxidase-mediated bioactivation of hydroxylated metabolites of carbamazepine and phenytoin. 2008;36(8):1624–36.

31. Santos N a G, Medina WSG, Martins NM, Rodrigues M a C, Curti C, Santos a C. Involvement of oxidative stress in the hepatotoxicity induced by aromatic antiepileptic drugs. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* 2008;22(8):1820–4.
32. Ercegovac M, Jović N, Simić T, Beslać-Bumbaširević L, Sokić D, Savić-Radojević A, et al. Antiepileptic drugs affect protein, lipid and DNA oxidative damage and antioxidant defense in patients with epilepsy. *journal of medical biochemistry.* 2013;32(2):121–30.
33. Ueda Y, Doi T, Takaki M, Nagatomo K, Nakajima A, Willmore LJ. Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: in vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. *Brain research.* 2009;1266:1–7.
34. Price OT. Topiramate treatment protects blood-brain barrier pericytes from hyperglycemia-induced oxidative damage in diabetic mice. *endocrinology.* 2012;153(1):362–72.
35. Andrejc D. Indukcija apoptoze v humanih celičnih linijah limfocitov B s stimulacijo receptorja EP4, Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
36. <http://www.biocompare.com/Application-Notes/118624-Human-PBMC-Isolation-and-Counting-Using-the-Scepter-2-0-Handheld-Automated-Cell-Counter/> [dostop 24.08.2013].
37. 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.
38. Čvan M. Vpliv protiepileptičnih učinkovin na oksidativni stres v celični liniji limfocitov B, Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.
39. Biorad. Navodila za določanje proteinov - Biorad.
40. <http://www.bmglabtech.com/images/promotion/bradford-colorimetric-assay-2.jpg> [dostop 26.08.2013].
41. http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay#cite_note-pmid6606682-2 [dostop 21.07.2013].
42. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/24/Tetrazolium-chloride-chemical.png/200px-Tetrazolium-chloride-chemical.png> [dostop 17.08.2013].
43. Guidance for industry, Bioanalytical method validation U. S. Department of health and human services FDA, Center for drug evaluation and research, Rockville, MD, May 2001.

-
44. Czauderna M. The simple and sensitive measurement of malondialdehyde in selected specimens of biological origin and some feed by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2011;879(23):2251–8.
 45. Titan A. Določanje malondialdehida v plazmi konj z derivatizacijskimi metodami in tekočonsko kromatografijo, Diplomska naloga.
 46. Polson C, Sarkar P, Incledon B. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2003;785:263–75.
 47. 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. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications.* 2001;757(1):69–78.
 48. Squellerio I, Caruso D, Porro B. Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2012;71:111–8.
 49. Steghens J-P, Flourié F, Arab K, Collombel C. Fast liquid chromatography–mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact. *Journal of Chromatography B.* 2003;798(2):343–9.
 50. Ambrósio a F, Silva a P, Araújo I, Malva JO, Soares-da-Silva P, Carvalho a P, et al. Neurotoxic/neuroprotective profile of carbamazepine, oxcarbazepine and two new putative antiepileptic drugs, BIA 2-093 and BIA 2-024. *European journal of pharmacology.* 2000;406(2):191–201.
 51. Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Labrador V, Hazen MJ. Carbamazepine induces mitotic arrest in mammalian Vero cells. *Mutation research.* 2008;637(1-2):124–33.
 52. Lee Y, Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *Journal of biological chemistry.* 1999;274(19792-8).
 53. Lee S-R. Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. *Neuroscience letters.* 2000;Volume 281(2-3):183–6.
 54. Díaz-Flores M, Angeles-Mejía S, Baiza-Gutman L a, Medina-Navarro R, Hernández-Saavedra D, Ortega-Camarillo C, et al. Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *Journal of ethnopharmacology.* 2012;144(1):101–8.
 55. Shafer C. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine.* 2001;30(11):1191–212.

-
56. Pavone A, Cardile V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 1:34–9.
 57. Araújo IM, Ambrósio AF, Leal EC, Verdasca MJ, Malva JO, Soares-da-Silva P, et al. Neurotoxicity induced by antiepileptic drugs in cultured hippocampal neurons: a comparative study between carbamazepine, oxcarbazepine, and two new putative antiepileptic drugs, BIA 2-024 and BIA 2-093. *Epilepsia*. 2004;45(12):1498–505.
 58. Arhan E, Serdaroglu A, Ozturk B, Ozturk HS, Ozcelik A, Kurt N, et al. Effects of epilepsy and antiepileptic drugs on nitric oxide, lipid peroxidation and xanthine oxidase system in children with idiopathic epilepsy. *Seizure : the journal of the British epilepsy association*. 2011;20(2):138–42.
 59. Yüksel A. Erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children with valproate and carbamazepine monotherapy. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2000;11(1):73–81.
 60. Arora T. Effect of carbamazepine and lamotrigine on cognitive function and oxidative stress in brain during chemical epileptogenesis in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2010;106(5):372–7.
 61. Agarwal NB, Agarwal NK, Mediratta PK, Sharma KK. Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. *Seizure : the journal of the British epilepsy association*. 2011;20(3):257–62.
 62. Demirci S. Effects of selenium and topiramate on cytosolic Ca^{2+} influx and oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Neurochemical Research*. 2013;38(1):90–7.
 63. Haghikia A, Ladage K, Hinkerohe D, Vollmar P, Heupel K, Dermietzel R, et al. Implications of antiinflammatory properties of the anticonvulsant drug levetiracetam in astrocytes. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(8):1781–8.
 64. Marini H, Costa C, Passaniti M, Esposito M, Campo GM, Lentile R, et al. Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sciences*. 2004;74(10):1253–64.
 65. Varoglu AO. Effects of valproate, carbamazepine, and levetiracetam on the antioxidant and oxidant systems in epileptic patients and their clinical importance. *Clinical neuropharmacology*. 2010;33(3):155–7.