

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
**FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**POLONA PUKŠIČ**

**PROUČEVANJE VPLIVA STAREJŠE GENERACIJE  
PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN NA NASTANEK  
OKSIDATIVNEGA STRESA V CELIČNIH LINIJAH**

**DIPLOMSKA NALOGA**  
**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Ljubljana, 2014**

Univerza v *Ljubljani*  
Fakulteta *za farmacijo*



**POLONA PUKŠIČ**

**PROUČEVANJE VPLIVA STAREJŠE GENERACIJE  
PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN NA NASTANEK  
OKSIDATIVNEGA STRESA V CELIČNIH LINIJAH**

**THE INFLUENCE OF OLD-GENERATION OF  
ANTIEPILEPTIC DRUGS ON OXIDATIVE STRESS  
DEVELOPMENT IN CELL LINES**

Ljubljana, 2014

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

#### ZAHVALA

*Najlepša hvala mentorju doc. dr. Tomažu Vovku, mag. farm. in somentorici asist. dr. Martini Gobec, mag. farm. za vso strokovno pomoč, potrpežljivost in usmerjanje med izdelavo diplomske naloge. Zahvaljujem se Nevenki Lilik, dipl. ing. kem. tehn. za vse ure, ki jih je z menoj preživela v laboratoriju in mi pomagala pri delu s celicami ter vsem ostalim zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi kakorkoli pomagali pri diplomskem delu.*

*Iskrena hvala staršem, da so mi omogočili ta študij ter me podpirali v vseh teh letih. Hvala Grega, Blažka in Samo za vso pomoč in podporo.*

#### IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

Ljubljana, september 2014

Polona Pukšič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	II
<b>KAZALO SLIK</b> .....	III
<b>KAZALO ENAČB</b> .....	III
<b>SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV</b> .....	VIII
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. PRESNOVA UČINKOVIN.....	1
1.1.1. Jetra kot glavni presnovni organ .....	1
1.1.2. Mehanizem in glavne poti presnove učinkovin.....	2
1.1.3. Aktivni/reaktivni presnovki.....	5
1.2. OKSIDATIVNI STRES IN LIPIDNA PEROKSIDACIJA .....	6
1.2.1. Radikali in drugi pokazatelji lipidne peroksidacije .....	7
1.2.2. Zaščita pred oksidativnimi poškodbami.....	8
1.3. EPILEPSIJA IN OKSIDATIVNI STRES.....	9
1.4. PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE IN OKSIDATIVNI STRES .....	10
1.4.1. Karbamazepin (CBZ).....	10
1.4.2. Preobčutljivost karbamazepina.....	11
1.4.3. Valprojska kislina (VAL).....	12
<b>2. NAMEN</b> .....	13
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	14
3.1. MATERIALI.....	14
3.2. Biološki material .....	18
3.2.1. Celične kulture .....	18
3.3. METODE .....	19
3.3.1 Metode dela s celicami .....	19
3.3.2. Gojenje celic.....	19
3.3.3 Odmrzovanje celic.....	19
3.3.4. Štetje celic .....	20
3.3.5. Test za določanje celične presnovne aktivnosti z reagentom MTS.....	20
3.3.6. Merjenje nastanka ROS.....	21
3.3.7. Izpostavljanje celic PEU .....	22
3.3.8. Določanje malondialdehida v celicah z LC-MS/MS metodo in predhodno derivatizacijo z DNPH .....	23
3.3.9. Analizni postopek za določanje koncentracij karbamazepina in presnovkov v plazmi ..	27
3.3.10. Analiza VAL in 4-en VPA .....	30
3.3.11. Obdelava podatkov in statistična analiza .....	33
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	34
4.1. VPLIV KARBAMAZEPINA IN VALPROJSKE KISLINE NA PRESNOVNO AKTIVNOST CELIC .....	34
4.2. VPLIV CBZ IN VAL NA NASTANEK ROS .....	36
4.3. REZULTATI MERITEV MDA.....	39

---

4.3.1. Vpliv vrste in koncentracije PEU na nastanek MDA.....	39
Karbamazepin.....	41
Valprojska kislina.....	42
4.4. REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJE KARBAMAZEPINA .....	43
4.5. REZULTATI MERITEV VALPROJSKE KISLINE.....	45
<b>5. SKLEPI .....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>48</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Presnovne reakcije 1. in 2. faze.....	3
Preglednica II: Priprava reagentov.....	23
Preglednica III: Priprava MDA standardov.....	25
Preglednica IV: Shema gradientne elucije.....	26
Preglednica V: Priprava delovnih raztopin za umeritveno krivuljo.....	27
Preglednica VI: Priprava raztopin za umeritveno krivuljo.....	28
Preglednica VII: HPLC pogoji.....	30
Preglednica VIII: Priprava koncentracijskih raztopin glede na VAL.....	31
Preglednica IX: Priprava koncentracijskih raztopin glede na 4-en VPA.....	31
Preglednica X: Natehte posameznih reagentov za pripravo standardnih raztopin.....	32
Preglednica XI: Umeritvena premica za določanje koncentracij MDA.....	39
Preglednica XII: Umeritvena premica za določanje koncentracij CBZ in njegovih presnovkov.....	44
Preglednica XIII: Rezultati meritev koncentracije karbamazepina in internega standarda v vzorcih celičnih gojišč po končani izpostavljenosti celic s CBZ.....	44
Preglednica XIV: Umeritvena premica za določanje koncentracije VAL in 4-en VPA.....	45
Preglednica XV: Izračuni s koncentracij VAL in 4-en VPA.....	45

## KAZALO SLIK

Slika 1: Reakcije 1. in 2. faze presnove. ....	5
Slika 2: Poti 1. faze presnove zdravilnih učinkovin, ki vodijo do detoksikacije ali aktivacije matičnega zdravila ali kemične spojine iz okolja.....	6
Slika 3: Struktura karbamazepina. ....	11
Slika 4: Reakcijska shema derivatizacije MDA z DNPH. ....	23
Slika 5: Reakcijska shema derivatizacije valprojske kisline s kumarinom. ....	30
Slika 6: Presnovna aktivnost THP-1 in HepG <sub>2</sub> celične linije po 24 h tretiranju s karbamazepinom. ....	35
Slika 7: Presnovna aktivnost THP-1 in HepG <sub>2</sub> celične linije po 24 h tretiranju z valprojsko kislino. ....	36
Slika 8: Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti. ....	37
Slika 9: Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti. Medij iz HepG <sub>2</sub> celic smo prenesli na THP-1 celice in spremljali nastanek ROS v treh časovnih intervalih. ....	38
Slika 10: Določanje koncentracije MDA. ....	40
Slika 11: Določanje koncentracije MDA. Medij iz HepG <sub>2</sub> celic smo prenesli na THP-1 celice. ....	40
Slika 12: Korelacija ROS in MDA. Prikazani so pari točk za iste vzorce in parametri linearne regresije.....	43

## KAZALO ENAČB

Enačba 1: Računanje koncentracije celic s hemocitometrom .....	20
Enačba 2: Računanje odstotka presnovne aktivnosti celic .....	21

## POVZETEK

Eden izmed mehanizmov, ki naj bi bil vpleten v nastanek epilepsije, je oksidativen stres. Po nekaterih podatkih naj bi v oksidativni stres vodile tudi nekatere protiepileptične učinkovine (PEU). V diplomskem delu smo proučevali ali predstavnika starejše generacije PEU (karbamazepin (CBZ) in valprojska kislina (VAL)) oz. njuni presnovki povzročajo oksidativen stres v celicah. Izbrali smo monocitno celično linijo z nizko presnovno aktivnostjo (THP-1) in celično linijo z visoko presnovno aktivnostjo (HepG<sub>2</sub>) ter najprej s pomočjo testa presnovne aktivnosti preverili pri kateri koncentraciji izbrani PEU vplivata na viabilnost celičnih linij. Celični liniji smo tretirali s CBZ ali VAL v koncentracijah od 100  $\mu\text{M}$  do 4000  $\mu\text{M}$ . Upad presnovne aktivnosti celic THP-1 v prisotnosti CBZ je pokazal, da je le-ta v koncentracijah višjih od 1000  $\mu\text{M}$  toksičen za omenjene celice, medtem ko tega učinka nismo zasledili na celicah HepG<sub>2</sub>. VAL pri uporabljenih koncentracijah ni imela vpliva na živost THP-1 ali HepG<sub>2</sub>. V nadaljevanju smo določali dva kazalnika oksidativnega stresa, in sicer reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in malondialdehid (MDA). Celično linijo THP-1 smo 24 h tretirali s CBZ (200  $\mu\text{M}$  in 1000  $\mu\text{M}$ ) ali VAL (200  $\mu\text{M}$  in 2000  $\mu\text{M}$ ) in s pretočno citometrijo ter ustrezno fluorescenčno sondo določali prisotnost ROS. THP-1 celice smo izpostavili CBZ ali VAL 1 h, 3 h ali 6 h. Ugotovili smo, da le VAL povzroči povečan nastanek ROS glede na kontrolne celice.

V naslednjem koraku smo želeli proučiti ali presnovki izbranih PEU povzročijo oksidativen stres. HepG<sub>2</sub> celice, ki so presnovno aktivne, smo zato izpostavili CBZ in VAL 24 h ter nato celični medij prenesli na THP-1 celice. Na le-teh smo določali ROS po 1 h, 3 h in 6 h in ugotovili, da ponovno le VAL povzroči njihov povečan nastanek. Na istih vzorcih smo določali tudi MDA, ki je kazalnik lipidne peroksidacije. Pokazali smo, da je CBZ na THP-1 celični liniji povzročil trend upada koncentracije MDA v primerjavi s kontrolo. Pri izpostavljanju celic VAL smo opazili trend večanja koncentracije MDA pri višji koncentraciji VAL. Povišanje MDA je bilo še bolj izrazito v drugem poskusu, ko smo na celice THP-1 dodali medij z VAL, ki je bil predhodno na HepG<sub>2</sub> celicah. Meritve koncentracij CBZ in VAL v HepG<sub>2</sub> celičnih gojiščih, so pokazale znaten upad koncentracije učinkovin v celičnem mediju v primerjavi z njuno začetno koncentracijo, a presnovkov izbranih PEU nismo zaznali. Za bolj natančno opredelitev povezave med presnavljanjem CBZ in VAL ter oksidativnim stresom v celicah, bi bili potrebni še

nadaljnji poskusi, s katerimi bi s povečanjem števila celic oz. podaljšanjem časa poskusov povečali nastajanje njunih presnovkov.



## ABSTRACT

One of the mechanisms, which are involved in the occurrence of epilepsy, is oxidative stress. According to some data, therapy with antiepileptic drugs (AEDs) can also lead to development of oxidative stress. In the thesis, we investigated whether a representative of the older generation of AEDs carbamazepine (CBZ) or valproic acid (VAL) and their metabolites lead to development of oxidative stress in cells. We selected the monocyte cell line with a low metabolic activity (THP-1) and the cell line with a high metabolic activity (HepG<sub>2</sub>) and tested the viability dependence of cell lines with selected AEDs concentration. The cell lines were treated with CBZ or VAL at concentrations ranging from 100  $\mu$ M to 4000  $\mu$ M. The decline in metabolic activity of THP-1 cells in the presence of the CBZ has shown that concentrations higher than 1000  $\mu$ M are toxic to cells, whereas this effect was not detected in the HepG<sub>2</sub> cells. VAL at the used concentrations had no effect on the viability of THP-1 or HepG<sub>2</sub> cells. In the following experiment we measured two indicators of oxidative stress, namely reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA). Cell line THP-1 was treated for 24 h with CBZ (200  $\mu$ M and 1000  $\mu$ M) or VAL (200  $\mu$ M and 2000  $\mu$ M) and with flow cytometry and the appropriate fluorescent probe we measured ROS. THP-1 cells were exposed to CBZ or VAL for 1 h, 3 h or 6 h. We have found that only VAL lead to increased formation of ROS with respect to control cells.

In the next experiment, we wanted to examine whether metabolites of selected AEDs can cause oxidative stress. HepG<sub>2</sub> cells, which have high metabolic activity, were exposed to VAL and CBZ for 24 h and after that cell medium was transferred to THP-1 cells. After 1, 3 or 6 h of incubation ROS were measured. We found that only VAL caused the increase of ROS formation. In the same samples was also determined the MDA, which is an indicator of lipid peroxidation. We have shown that CBZ on THP-1 cell line caused the trend of decline in the concentration of MDA in comparison with the control. In cells treated with VAL, we have noticed a trend of increased concentration of MDA at a higher concentration of VAL. The increase in the MDA concentration was even more pronounced in the second experiment, where the medium with VAL first added to the HepG<sub>2</sub> cells was transferred to THP-1 cells. Measurements of concentrations of CBZ and VAL in HepG<sub>2</sub> cell culture media showed a significant decline in the concentration of substances in the cell media compared to their initial levels, but no metabolites were detected. To obtain

more precise association between metabolism of CBZ and VAL and oxidative stress development in cells, new experiments would be required to increase the formation of drugs metabolites either with increased concentrations of cells or with increased time of cell incubation with drugs.

---

## SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

4-en VPA	2-propil-4-pentenojska kislina
CBZ	karbamazepin
CŽS	centralni živčni sistem
DCF	diklorofluorescein
DiolCBZ	karbamazepin-diol (10,11-dihidro-10,11-trans-dihidroksi-karbamazepin)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EpoCBZ	karbamazepin-10,11-epoksid
ESI	elektrozaprševalna ionizacija, ang. »electrospray ionization«
GPx	glutation peroksidaza
GSH	reducirani glutation
H <sub>2</sub> DCFDA	barvilo 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Pressure Liquid Chromatography)
IS	interni standard
LAF	laminarni pretok zraka (laminar air flow)
LC	tekočinska kromatografija
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LiCBZ	likarbazepin (( <i>R,S</i> )-10,11-dihidro-10-hidroksi-5 <i>H</i> -dibenz[b,f]azepin-5-karboksamid)
LP	lipidna peroksidacija
MDA	malondialdehid

---

MF	mobilna faza
MPO	mieloperoksidaza
MTS	(3-(4,2-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazol
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
OR	osnovna raztopina
PBMC	periferne mononuklearne celice
PBS	raztopina fosfatnega pufra (ang. phosphate buffered saline)
PEU	protiepileptične učinkovine
PEZ	protiepileptična zdravila
PMK	polinenasičene maščobne kisline
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RS	reaktivne zvrsti
SD	standardna deviacija
SOD	superoksid dismutaza
sgPEZ	starejša generacija protiepileptičnih zdravil
TBH	<i>tert</i> -butil hidroperoksid
UV	ultravijolična svetloba (Ultraviolet)
VAL	valprojska kislina (2-propil-pentanojska kislina)

# 1. UVOD

## 1.1. PRESNOVA UČINKOVIN

V človeškem organizmu nenehno poteka presnova oz. metabolizem snovi, ki prihajajo v telo (hrana) in tistih snovi, ki so v telesu že prisotne (1). Presnova je pogosto vzrok velikih razlik med posameznimi bolniki v odzivu na zdravilo in tudi trajanju ter jakosti njegovega učinka. Večina današnjega poznavanja presnove zdravil izvira iz poskusov na izoliranih sistemih in živalih. (2). Obravnavamo jo lahko kot del obrambnega mehanizma organizma, ki ščiti homeostatsko ravnotežje sistema pred posledicami vdora tujih substanc (3). Presnova učinkovin poteka v različnih predelih organizma z različno intenzivnostjo (3,4). Najpogosteje prihaja do presnavljanja v jetrih (3,4,5,6), kjer so prisotne mnoge encimske in neencimske poti biotransformacije (5), v ledvicah, možganih, krvi, mišicah, vranici, steni prebavnega trakta in celo v plazmi (2,3,4).

### 1.1.1. Jetra kot glavni presnovni organ

Najpogostejše mesto presnavljanja so jetrne parenhimske celice, predvsem zaradi dobre prekrvavljenosti ter presnovnih encimov, ki se nahajajo v endoplazemskem retikulumu, lahko pa tudi zaradi same sestave njihovega endoplazemskega retikuluma (3), čeprav se biotransformacija zdravilnih učinkovin pojavlja tudi v mitohondrijskih in jedrnih ovojnica ter v plazemski membrani (4). Učinkovina, ki po hepatici arteriji ali portalni veni prihaja v jetra, sledi eni ali večim možnim potem:

- a.) nespremenjena preide jetra in vstopi v hepatici veno ter skozi v sistemski krvni obtok,
- b.) nespremenjena se skozi žolčne poti izloči v prebavni trakt in od tod iz telesa ali ponovno absorbira v kri (enterohepatici obtok),
- c.) presnovi se v primarni ali sekundarni presnovek in izloči v hepatici veno,
- d.) presnovi se v primarni ali sekundarni presnovek in izloči skozi žolčne prebavne poti (2).

### 1.1.2. Mehanizem in glavne poti presnove učinkovin

#### a) MEHANIZEM PRESNOVE

Pomemben delež pri usodi zdravila v telesu imajo mehanizmi presnove (biotransformacije ali detoksikacije) (7). Osnovni namen tega mehanizma je encimska sprememba snovi, ki so sorazmerno topne v lipidih (zdravila in druge snovi, ki jih sprejme telo iz okolja), v sorazmerno vodotopne. To naj bi pospešilo izločanje in olajšalo prehod skozi ledvice, kar naj bi sočasno vodilo do zmanjšanja farmakološke/biološke učinkovitosti ali toksičnosti (detoksikacija) (1,3,5,7,8). Takšne presnovne reakcije se obravnavajo kot "reakcije razstrupljanja" (5). Prav tako pa lahko povečana hidrofilitnost presnovkov preprečuje njihov prehod skozi membrane (krvno-možganska pregrada), pri strukturno specifičnih učinkovinah pa je že sama biokemična transformacija prevladujoči razlog za izgubo afinitete ali intrinzične aktivnosti (3). Zdravilne učinkovine so podvržene štirim možnim načinom biotransformacije: aktivna zdravilna učinkovina do neaktivnega presnovka, aktivna zdravilna učinkovina do aktivnega presnovka, neaktivna zdravilna učinkovina do aktivnega presnovka in aktivna zdravilna učinkovina do toksičnega presnovka (8). Nekateri ksenobiotiki pa se lahko biokemično transformirajo v toksične presnovke (5), ki vplivajo na celične funkcije in pri nekaterih makromolekulah izzovejo toksičen učinek. Toksični presnovki imajo sposobnost interakcij s celičnimi beljakovinami, lipidi in nukleinskimi kislinami, kar lahko posledično vodi do poškodbe in izgube funkcije proteinov, lipidne peroksidacije, poškodbe DNA in v nekaterih primerih tudi do oksidativnega stresa. Prav tako lahko presnovki povzročajo motnje ionskih gradientov in znotrajceličnih zalog kalcija, kar pa vodi do motnje v delovanju mitohondrijev in do izgube pri proizvodnji energije. Oslabitev celične funkcije lahko povzroči njeno smrt in možnost odpovedi jeter (5).

#### b) GLAVNE POTI PRESNOVE

Presnovne reakcije učinkovin potekajo v dveh različnih fazah (1,4,5,7,8). V prvi fazi potekajo oksidacije, redukcije ali hidrolize učinkovin, ko se v molekulo zdravilnih učinkovin uvedejo polarne skupine (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>), ki se v drugi fazi konjugirajo z endogeno spojino (glukuronsko kislino, sulfati, glicinom, acetati) (1,7,4). Večina produktov prve faze so farmakološko aktivne snovi (vendar praviloma

manj kot matična zdravila), medtem ko so produkti druge faze farmakološko neaktivni. V procesu biotransformacije sočasno narašča tudi polarnost ali vodotopnost snovi, kar omogoča njihovo izločanje iz telesa s sečem, žolčem ali blatom (4,7,9). Najpogostejše izločanje zdravilnih učinkovin je s sečem (4,8): s filtracijo skozi glomerule, z aktivno tubulno sekrecijo in s pasivno difuzijo iz področja visoke na področje nizke koncentracije (4). Nekatere učinkovine so podvržene spremembam v obeh fazah, druge pa, ali samo v prvi ali samo drugi fazi (3). Pri reakcijah prve faze lahko nastajajo radikali (9). Poteka predvsem v jetrih, katalizirana pa je s sistemom citokromov P450 na endoplazmatskem retikulumu hepatocitov. Druga faza presnove je sintetična, konjugacija se z izjemo glukuronidacije odvija v citosolu ali plazmi (10). Reakcije konjugacije v večini primerov niso problematične, saj se na polarno skupino učinkovine ali njenega presnovka kovalentno veže še polarnejša skupina, ki omogoči, da tak konjugat kar najhitreje zapusti telo, večinoma z urinom (1). Pri konjugaciji je najpomembnejši encim uridindifosfat glukuroniltransferaza, ki katalizira prenos glukuronske kisline, aromatskih in alifatskih spojin. Drugi pomembni encimi vključujejo sulfotferazo in N-acetiltransferazo (4). Veliko zanimivejše in bolj zapletene so presnovne reakcije, kjer se polarnost učinkovine poveča z oksidacijo in redukcijo. Oksidacije katalizirajo encimi iz skupine monooksigenaz, ki za svoje delovanje potrebujejo kisik in NADPH kot reducent (1).

### Preglednica I: Presnovne reakcije 1. in 2. faze (3,4).

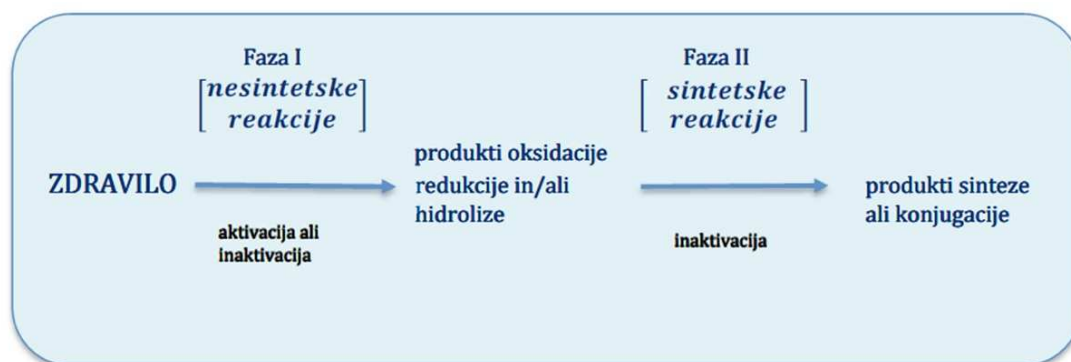
<b>PRESNOVNE REAKCIJE 1. FAZE</b>	<b>PRESNOVNE REAKCIJE 2. FAZE</b>
<b>Oksidacije</b>	<b>Konjugacije</b>
<b>Hidroksiliranje aromatskega obroča</b>	Konjugacija z glukuronsko kislino
<b>Oksidacija stranske verige</b>	R-COOH+glukuronska kislina-- ----R-CO-glukuronid
<b>N-dealkiliranje</b>	Konjugacija z žveplovo kislino
<b>O-dealkiliranje</b>	Acetiliranje
	Konjugacija z glicinom

Konjugacija z glutationom
<b>S-dealkiliranje</b>
<b>Oksidativno deaminiranje</b>
<b>Sulfoksidiranje</b>
<b>N-oksidacija oksidacija alkoholov</b>
<b>Redukcije</b>
<b>Redukcija nitro skupine</b>
<b>Redukcija azo skupine</b>
<b>Hidrolize</b>
<b>Hidroliza estrov</b>
<b>Hidroliza amidov</b>
<b>Hidrolitična cepitev obroča</b>
<b>Dehalogeniranje</b>
<b>Metiliranje</b>

Iz medicinskega vidika so te reakcije pomembne zaradi:

- a.) upočasnjene razgradnje (deaktivacije) in izločanja zdravil zaradi bolezenskih motenj v delovanju jeter (akutna parenhimska okvara jeter, ciroza jeter) in starostnih spremembah, ali pa zaradi pospešene razgradnje in izločanja zdravil. Dolgotrajno pitje alkohola, ki je encimski induktor, zviša aktivnost citokroma P450 in tako pospeši biotransformacijo nekaterih zdravil. Pri istem odmerku zdravila lahko torej upočasnjena razgradnja zdravil povzroči prevelik, pospešena razgradnja zdravil pa premajhen učinek zdravila.
- b.) morebitne hepatotoksičnosti intermediatov razgradnje in reaktivnih radikalov, ki sprožijo verižno reakcijo lipidne peroksidacije in akutno nekrozo hepatocitov (9).



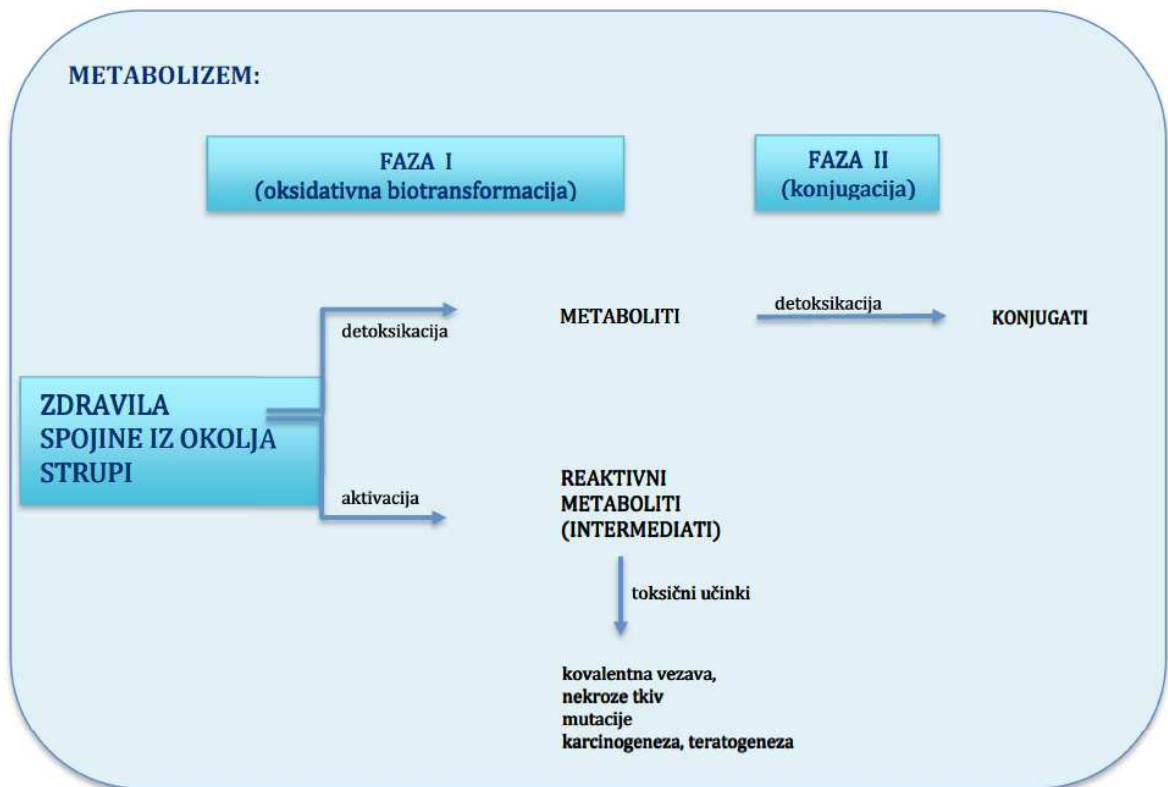


**Slika 1: Reakcije 1. in 2. faze presnove (7).**

### 1.1.3. Aktivni/reaktivni presnovki

Presnovki prve faze presnove so običajno farmakološko učinkoviti, vendar se glede na spremenjene fizikalno-kemične lastnosti obnašajo drugače kot matično zdravilo. Prve študije so se pojavile že po letu 1930 (farmakološko aktivnost presnovkov kloralhidrata in lidokaina v poskusih na živalih). Največ je k osvetlitvi tega problema pripomogel Williams z izdajo knjige Detoksikacija zdravil v telesu leta 1959, ki prva obravnava biokemične mehanizme biotransformacije zdravil in listo petnajstih zdravil, katerih učinkovitost je treba delno ali popolnoma pripisati aktivnim presnovkom.

Študije zadnjih let so pokazale, da je predvsem za aktivacijo ksenobiotikov, ki vodi do potencialno toksičnih, mutagenih in karcinogenih presnovkov pogosto odgovorna spremenjena pot prve faze presnove, ki pa je kot pri detoksikaciji ne katalizira encim citokrom P450, temveč citokrom P448. Ti novo nastali presnovki prve faze, ki jih imenujemo reaktivni presnovki ali intermediati (za razliko od aktivnih presnovkov, ki nastajajo pri procesu detoksikacije), so zelo slabi substrati za nadaljnji proces inaktivacije v drugi fazi presnove. Reaktivni presnovki se kovalentno vežejo na tkivne makromolekule (nukleinske kisline, proteine), kar izzove njihove različne toksične učinke. Do tega tipa presnove prihaja le izjemoma pri učinkovinah, bolj pogosto pa se na ta način reaktivirajo kemične spojine, ki smo jim izpostavljeni v okolju oz. na delovnem mestu (7).



**Slika 2: Poti 1. faze presnove zdravilnih učinkovin, ki vodijo do detoksikacije ali aktivacije matičnega zdravila ali kemične spojine iz okolja (7).**

## 1.2. OKSIDATIVNI STRES IN LIPIDNA PEROKSIDACIJA

### a) OKSIDATIVNI STRES

V navedeni literaturi je oksidativni stres definiran kot vrsta kemičnega stresa, ki se zaradi povečanja potencialno škodljivih dejavnikov (npr. reaktivnih kisikovih zvrsti, ROS) pojavi v živih organizmih. Je patološko stanje, ki nastane zaradi prekomerne produkcije radikalov in/ali slabše učinkovitosti antioksidativnih sistemov (11,12). Njegov nastanek je povezan s prisotnostjo kisika v zemljskem ozračju (11), kateri je nujen za življenje, in ki s procesom dihanja prehaja v telo. Pri tem pa hkrati nastajajo tudi ROS (11). Produkcija reaktivnih zvrsti (RS) je v zdravih aerobnih organizmih uravnotežena z obrambnim sistemom antioksidantov. Nekatere poškodbe, ki so povzročene z RS, se dogajajo redno, zato to ravnotežje ni popolno (12). V patofiziologiji nevroloških bolezni (npr. pri epilepsiji) se vse pogosteje kot pomembna dejavnika pojavljata mitohondrijska disfunkcija in oksidativni stres (13).

Najučinkovitejša in najpomembnejša vira nastanka ROS sta v fagocitih (NADPH-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidaža) in v mitohondrijih (elektronska transportna veriga oksidativne fosforilacije). Prav tako pa ROS nastajajo tudi pri številnih drugih reakcijah (14).

#### *b) LIPIDNA PEROKSIDACIJA (LP)*

Radikali, ki nastajajo pri presnovi učinkovin in ksenobiotikov, so odgovorni za peroksidacijo lipidov (predvsem nenasičenih) v membranah in s tem za njihovo okvaro (1). Lipidna peroksidacija je definirana kot oksidativna okvara polinenasičenih lipidov (12), ki ruši membransko strukturo, pri čemer so prizadeti membranski encimi in preko njih celična presnova (1), povečana je prepustnost membrane za snovi, ki normalno ne prehajajo membrane kot skozi specifične kanale, poškodovani so membranski proteini ter inaktivirani ionski kanali. Od kisika odvisne poškodbe lipidov vodijo v žarkost maščob. Zaradi lipofilnosti kisika je njegova koncentracija v membranski fazi višja kot v vodni fazi, zato ima lahko lipidna peroksidacija za celico tragične posledice (15). Celica manjše okvare še lahko odpravi, večje pa neizogibno vodijo v njeno smrt (1). Pri lipidni peroksidaciji se nastali lipidni peroksilni radikali še naprej pretvarjajo do aldehydov, ketonov in krajših alkanov. Verižna reakcija, ki jo sproži en sam hidroksilni radikal, lahko vodi v peroksidacijo več tisoč verig maščobnih kislin. Struktura membrane in s tem tudi njena funkcija sta tako porušeni in celica v večini primerov propade. Mehanizem lipidne peroksidacije je temelj za mnoga patološka stanja (15).

#### *1.2.1. Radikali in drugi pokazatelji lipidne peroksidacije*

Po definiciji so radikali atomi, ioni ter molekule ali njihovi deli z nesparsenim spinskim kvantom številom. To pomeni, da imajo na vsaj enem od energijskih nivojev elektronov prost, nesparsen elektron. Zelo reaktivni so radikali, ki imajo liho število elektronov. Pogosto je njihov razpolovni čas med milijoninko in milijardinko sekunde, lahko pa tudi krajši (9).

Najpomembnejše radikalske vrste kisika so hidroksilni radikal, superoksidni radikal in tripletni kisik. Tripletni kisik ima v dveh različnih  $\pi$  orbitalah dva nesparsena elektrona, zato ga prav tako uvrščamo med radikale. Izjemno reaktiven radikal je hidroksilni radikal, ki ima zaradi svoje reaktivnosti lokalno delovanje in v okolici

svojega nastanka oksidira vse molekule. V primerjavi s hidroksoilnim radikalom je superoksidni radikal mnogo manj reaktiven in z biomolekulami skorajda ne reagira (9,11).

Pravila, ki veljajo pri učinkih radikalov in ne le kisikovih reaktivnih spojin so: reaktivne spojine imajo ponavadi intenzivnejše učinke, ki so le lokalni na mestu nastanka, pri manj reaktivnih spojinah pa je njihov radij delovanja večji, odvisen pa je seveda od potencialnih difuzijskih ovir (9).

Malondialdehid (MDA), se kot najpogosteje uporabljen kazalec LP v bioloških vzorcih, uporablja prav tako kot indeks žarkosti v hrani in indeks oksidacije. Pri peroksidaciji PMK je eden od glavnih produktov (16). Najpogosteje nastaja pri peroksidaciji tistih PMK, ki vsebujejo več kot dve dvojni vezi (arahidonska, linolenska in dokozaheksaenojska kislina). Nastaja pa tudi encimatsko pri sintezi eikozanoidov in pri pogojih, ko so različne aminokisliline in ogljikovi hidrati (2-deoksiriboza, saharoza) izpostavljeni hidroksilnemu radikalumu (12). V manjših količinah nastaja v vseh tkivih, v večjih količinah pa med peroksidacijo v mikrosomalnih jetrnih frakcijah (17).

### *1.2.2. Zaščita pred oksidativnimi poškodbami*

Literatura definira od kisika odvisne poškodbe tkiva kot biomolekularne poškodbe, ki jih gradnikom živih organizmov povzročajo RS (12). Strukturna in funkcijska celična integriteta, kjer so reparacijski sistemi sposobni obnavljanja oksidativno poškodovanih bioloških makromolekul (npr. deoksiribonukleinske kisline) ter zaščite pred radikali, je njena temeljna zaščita (9). Mnogi reaktivni presnovki lahko preko redoks kroženja neposredno ustvarjajo ROS, ki oksidirajo beljakovine, lipide, deoksiribonukleinsko kislino (DNK) in druge makromolekule, tako da prekinejo celične procese in povzročijo poškodbe hepatocitov. Nekateri reaktivni presnovki pa lahko posredno povzročijo nastajanje ROS preko izčrpanja GSH v mitohondrijih (5,12). Različne vrste ROS lahko aktivirajo ali inhibirajo signalne poti preko redoks spremembe proteinov ali preko celičnih poškodb z radikali (12), lahko pa sprožijo tudi peroksidacijo lipidov (5). Kovalentne vezi ali oksidativni vpliv na elektronski transport lahko še dodatno povečata proizvodnjo ROS. ROS so pomembni aktivatorji signalov celične smrti in pomembnih škodljivih snovi, ki posredujejo okvaro jeter,

povzročeno z zdravili (12). Če sistemi za odstranjevanje radikalov normalno delujejo, in če radikalov ni preveč, ne bo prišlo do okvar. V vseh drugih primerih pa so učinkovine, ki v procesu presnove lahko tvorijo RS, potencialno nevarne ne samo zaradi poškodb celic, ampak tudi zaradi možnosti maligne preobrazbe celic (1).

Celice so se tekom evolucije aerobnega življenja zaščitile pred RS. Določeni encimi predstavljajo specifično zaščito, saj so sposobni odstranjevanja radikalov in drugih ROS, prav tako pa zaščito celice predstavljajo tudi neencimski antioksidanti, kateri z radikali povzročene verižne oksidacije zmanjšujejo, preprečujejo ali jih celo ustavljajo (9). Antioksidantni encimski sistem sestavljajo encimi: glutation peroksidaza (GPx) superoksid dismutaza (SOD) in katalaza (CAT), kateri preprečujejo z RS povzročeno iniciacijo verižne reakcije in predstavljajo najpomembnejšo obrambo pred RS. Sposobni so podvojevanja in samoobrambe v njihovem aktivnem mestu z redoks elementi. Neencimski antioksidanti z radikali tvorijo nove, manj nevarne in reaktivne radikalske spojine. Kot celični antioksidanti delujejo reduciran glutation (GSH), askorbat in  $\alpha$ -tokoferol (9, 12).

Antioksidante definirajo avtorji knjige *Free Radicals in Biology and Medicine* kot snovi, ki na tarčnih molekulah odstranijo oksidativne poškodbe. V primerjavi s koncentracijami oksidirajočega substrata lahko antioksidanti v nizkih koncentracijah signifikantno preprečijo ali zakasnjijo oksidacijo substrata. Nivo RS mora antioksidativna zaščita znižati na minimalne vrednosti. Hkrati s tem, pa jih mora dovolj dopuščati, saj so RS za določene naloge bistvene (12).

### 1.3. EPILEPSIJA IN OKSIDATIVNI STRES

Epilepsija pomeni nagnjenost k ponavljajočim se napadom krčev (prehodne nevrološke nenormalnosti, ki jih povzroča nenormalna električna aktivnost v možganih) ali začasni spremembi ene ali več možganskih funkcij (18). Dejavniki, ki morajo biti prisotni, da lahko govorimo o epilepsiji so: pojaviti se mora vsaj en epileptični napad, priti mora do sprememb v možganih, ki so trajne in ki povečajo verjetnost za nadaljnje epileptične napade, ter priti mora tudi do psiholoških posledic, ki so povezane z epilepsijo (19). Patofiziološke spremembe v možganih, ki prispevajo k epileptogenezi (pridobljena oblika epilepsije) so porušeno razmerje med ekscitacijo in inhibicijo živčnih celic, zvečano izražanje glutamatnih in drugih receptorjev,

motnja homeostaze  $K^+$  v zunajcelični tekočini zaradi motenega delovanja mikroglije, citotoksični učinek glutamata in citotoksični učinek radikalov (9). Možganske poškodbe, ki nastanejo ob napadih pri epilepsiji so lahko posledica ekscitotoksično vzpodbujene disfunkcije mitohondrijev, sprememb v koncentraciji citokinov, genetskih sprememb in oksidativnega stresa. So dinamičen proces, ki lahko pripelje do smrti živčnih celic (20).

## 1.4. PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE IN OKSIDATIVNI STRES

Protiepileptične učinkovine razdelimo v prvo in drugo generacijo. V starejšo generacijo spadajo karbamazepin, valprojska kislina, fenobarbital, fenitoin, etosukcimid in benzodiazepini (21).

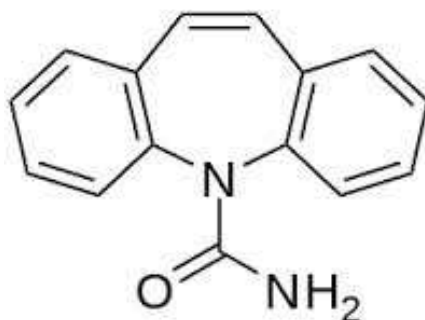
V novejšo generacijo PEU pa spadajo topiramata, levetiracetam, pregabalin, vigabatrin, okskarbazepin, gabapentin, felbamat, lamotrigin, tiagabin in zonisamid (3). Za te učinkovine v splošnem velja, da povzročajo manj neželenih učinkov, se v manjši meri presnavljajo in zato povzročajo manjše število farmakokinetičnih interakcije z drugimi zdravilnimi učinkovinami (22).

Veliko PEU (CBZ, VAL) se presnavlja do RS, katere se lahko kovalentno vežejo na biomolekule. PEU preprečujejo epileptične napade, ker pa so njihovi presnovki prav tako zmožni kovalentne vezave na proteine in druge biomolekule, lahko pride tudi do sistemske toksičnosti. Imajo različne učinke na antioksidativne sisteme. Preko več mehanizmov lahko PEU povzročijo oksidativne poškodbe, ki imajo najverjetneje pomembno vlogo tako pri začetku epilepsije, kot pri njenem napredovanju (23).

### 1.4.1. Karbamazepin (CBZ)

CBZ je predstavnik prve generacije PEZ in se uporablja za zdravljenje žariščnih napadov pri epilepsiji (24). CBZ se presnavlja v več kot 30 presnovkov, ki jih zaznamo v človeškem in podganjem urinu. Ena glavnih presnovnih poti je oksidacija do stabilnega CBZ-10,11-epoksida (25,26), ki je odgovoren tako za učinkovitost kot za toksičnost CBZ-ja (27). Sledi hidroliza do CBZ-10,11-trans-diola. Glavna presnovka CBZ sta 2- in 3-hidroksi-CBZ, ki se nadalje oksidirata z mieloperoksidazo (MPO)/ $H_2O_2$ . Oksidacija 3-hidroksi-CBZ je veliko hitrejša kot oksidacijo 2-hidroksi-

CBZ ali sama oksidacija CBZ. Prav tako so proučevali sposobnost teh presnovkov za nastanek ROS in ugotovili, da 3-hidroksi-CBZ povzroči več ROS kot 2-hidroksi-CBZ. 2-Hidroksi-CBZ lahko nadalje oksidiramo do iminokinona, oba, 2- in 3-hidroksi-CBZ pa lahko oksidiramo do katehola. Druge presnovne poti vključujejo krčenje obroča z oblikovanjem akridanskih derivatov. Ti presnovki se konjugirajo v N- ali O-glukuronide. Reaktivni presnovki CBZ vključujejo okside, ki nastanejo s pomočjo citokroma P450, karbokation, tvorjen z MPO, iminokinon z 2-hidroksi-CBZ, CBZ-10,11-epoksid in o-kinon iz ustreznega katehola (26). CBZ oz. njegovi presnovki lahko povzročijo nastanek hiponatremije in vodijo do motenj pri pomnjenju. Zaradi preobčutljivostne reakcije, ki lahko nastane, pa moramo pri približno 10-20 % pacientih zdravljenje prekiniti (28).



**Slika 3: Struktura karbamazepina (8).**

#### 1.4.2. Preobčutljivost karbamazepina

CBZ spada med PEZ z aromatičnim obročem. Njihova uporaba je v nekaterih primerih usodna, saj lahko pripelje do sicer redke idiosinkratske hepatotoksičnosti (5,25,26,29). Številne študije so ugotovile, da do idiosinkratskih učinkov, ki jih povzročata CBZ-10,11-epoksid in 3-hidroksi-CBZ (5,25,26), lahko pripelje akumulacija epoksida, kjer encim epoksid hidrolaza epoksida ni sposoben odstraniti v dovolj veliki meri (29). Po opisanem mehanizmu toksičnosti povzročajo presnovki CBZ-ja povečanje ROS (30).

V nekaterih primerih je CBZ prekurzor za razvoj preobčutljivostnega sindroma, za katerega so značilni sistemski znaki, kot sta povišana telesna temperatura in eozinofilija (5). Redko lahko CBZ povzroči mehurjaste kožne reakcije, kot pri Stevens-Johnsonovem sindromu (SJS), in toksično epidermalno nekrolizo, ki sta povezana z visoko stopnjo umrljivosti (5,25,26). Prav tako se lahko pri s CBZ

zdravljenimi bolniki pojavita agranulocitoza in pri 10 % bolnikov tudi nevtropenija (26).

### 1.4.3. Valprojska kislina (VAL)

VAL prav tako spada v starejšo generacijo PEU in ima širok spekter delovanja. Uporablja se za zdravljenje generaliziranih epileptičnih napadov, delnih epileptičnih napadov, specifičnih sindromov (West sindrom, Lennox-Gastaut), vročinskih krčev (31) ter z bipolarno motnjo povezanih maničnih epizod. Uporablja se lahko prav tako za preprečevanje migren (32), nekatere študije pa celo prikazujejo njeno učinkovitost intravenskega zdravljenja epileptičnega statusa (33).

VAL se skoraj v celoti in precej hitro presnavlja preko jeter. Obseg nastanka farmakološko najbolj aktivnih presnovkov VAL (2-en in 4-en VPA) lahko povečajo nekatere druge protiepileptične učinkovine (induktorji encimov). VAL se v plazmi v 90 % veže na proteine (34,35), zaradi česar vpliva na ostale učinkovine (fenitoin, acetilsalicilna kislina), katere se prav tako vežejo na proteine v plazmi in njihovo prosto frakcijo poveča (33). Razpolovni čas izločanja VAL je zelo variabilen. Ko pacient prejema skupaj z VAL še druge PEU (npr. CBZ), ki so induktorji jetrnih encimov, se njen razpolovni čas znatno skrajša (33,34,35), prav tako pa induktorji jetrnih encimov zmanjšajo njeno plazemsko koncentracijo (33,35).

Terapevtsko spremljanje VAL je tako pri pacientih, ki prejemajo hkrati še induktorje encimov, nujno potrebno. Prav tako pa je pomembno pri preprečevanju toksičnih učinkov (34).



## 2. NAMEN

Protiepileptične učinkovine starejše generacije (karbamazepin in valprojska kislina) se presnavljajo do reaktivnih presnovkov, ki lahko poškodujejo biološke makromolekule in v celicah povzročijo oksidativni stres.

Namen diplomske naloge je dokazati povezavo med sgPEU in oksidativnim stresom ter korelacijo med povečanim oksidativnim stresom v celicah in označevalcem lipidnih poškodb.

Na celičnih linijah THP-1 in HepG<sub>2</sub> bomo s pomočjo testa presnovne aktivnosti določili koncentracije karbamazepina in valprojske kisline, ki še niso toksične za celice. Nadaljnje poskuse bomo osnovali na celični liniji THP-1, ki ima nizko presnovno aktivnost, tako da jo bomo najprej 24 h tretirali z visoko in nizko koncentracijo karbamazepina ali valprojske kisline, nato pa označili z barvilom H<sub>2</sub>DCFDA, ki omogoča detekcijo ROS. Prav tako bomo celično linijo HepG<sub>2</sub>, ki ima visoko presnovno aktivnost, izpostavili karbamazepinu ali valprojski kislini, saj so nekatere študije pokazale, da presnovki teh dveh spojin povzročajo oksidativni stres. Celični medij bomo nato iz HepG<sub>2</sub> celic prenesli na THP-1 celice. Nastanek ROS bomo spremljali v treh časovnih točkah.

V celicah bomo torej ocenjevali oksidativni stres preko prisotnosti reaktivnih kisikovih zvrsti, ki jih bomo dokazovali direktno s pretočno citometrijo in ustrezno fluorescenčno sondo. Hkrati bomo v celičnih lizatih z metodo LC-MS/MS določali koncentracijo najpogosteje uporabljenega označevalca lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA). V celičnem gojišču pa bomo preverili koncentracije PEU in njihovih najpogostejših presnovkov.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1. MATERIALI

Standardi	Proizvajalec
Karbamazepin	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA</i>
Valprojska kislina	<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>
Antibiotik/antimikotik 100 × (10000 enot penicilina, 10 mg streptomicina in 25 µg amfotericina B na mL)	<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 goveji serum)	<i>Invitrogen; Auckland, Nova Zelandija</i>
Gojišče DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<i>Sigma-Aldrich Chemie; Steinheim, Nemčija</i>
Gojišče RPMI 1640, HEPES Modification	<i>Sigma-Aldrich; Ayrshire, Velika Britanija</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (vodikov peroksid), 30 % wt. vodna raztopina	<i>Sigma-Aldrich; St. Louis ZDA</i>
<i>tert</i> -butil hidroperoksid	<i>Sigma-Aldrich Chemie; MO, ZDA</i>
HCl (klorovodikova kislina), 37 % kadeča	<i>Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
Ledocet (ocetna 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>

<b>Reagent MTS (Cell Titer 96® Aqueous One Solution Reagent)</b>	<i>Promega, Madison, WI, ZDA</i>
<b>TCA (trikloroocetna kislina)</b>	<i>Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija</i>
<b>Ultračista voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10 (pri pravi vseh reagentov in vzorcev smo uporabili ultračisto vodo, v nadaljevanju: voda)</b>	<i>Millipore Corp., Billerica, MA</i>

<b>Laboratorijska oprema</b>	<b>Proizvajalec</b>
<b>Analitična tehtnica</b>	<i>Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica</i>
<b>Avtoklav A-21</b>	<i>Kambič laboratorijska oprema; Semič, Slovenija</i>
<b>Avtomatske pipete:</b> <b>0,1 – 2,5 µL</b> <b>0,5 – 10 µL</b> <b>20 – 200 µL</b> <b>100 – 1000 µL</b>	<i>Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija</i>
<b>Centrifuga</b>	<i>CENTRIC 322 A Tehnica; Železniki, Slovenija.</i> <i>5415 R Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija.</i> <i>Heraeus MEGAFUGE 16R; Langenselbond, Nemčija</i>
<b>Centrifugirke (15 in 50 mL)</b>	<i>Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija</i>
<b>Grelnik in stresalnik VORTEMP 56 EVC</b>	<i>Tehnica; Železniki, Slovenija</i>
<b>Hemocitometer</b>	<i>Brand Neubauer (Blau Brand)</i>
<b>Hladilnik (+5 °C)</b>	<i>LTH; Škofja Loka, Slovenija</i>
<b>Inkubator</b>	<i>HERAUS Holding GmbH; Hanau, Nemčija</i>
<b>Inserti za vialo 0,1 mL</b>	<i>Machrey-Nagel; Düren, Nemčija</i>
<b>Invertni svetlobni mikroskop OLYMPUS</b>	<i>Olympus Optical Co.; Hamburg, Nemčija</i>

<b>CK40</b>	
<b>Komora z laminarnim pretokom zraka</b>	<i>Waldner Electronics FAZ 3; Wangen, Nemčija</i>
<i>Krioviale</i>	<i>TPP, Trasadingen, Švica</i>
<i>Krovna stekla</i>	<i>Assistent, Sondheim, Nemčija</i>
<b>LC-MS/MS Sistem Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jeatstream® LC/MS</b>	<i>Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA</i>
<b>Mešalo</b>	<i>LAB DANCER, IKA; Staufen, Nemčija</i> <i>VIBROMIX 10, Tehnica; Železniki, Slovenija</i>
<b>Mikrotitrski čitalec Safire2™ Genios</b>	<i>Tecan, Genios; Zürich, Švica</i>
<b>Mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (z 12, 24 ali 96 vdolbinami)</b>	<i>TPP; Trasadingen, Švica</i>
<b>Multikanalne pipete</b>	<i>Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija</i>
<b>Nastavki za pipete (do 10, 200, 300 in 1000 µL)</b>	<i>Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija</i>
<b>Pipete (100-1000 µL, 20-200 µL, 2-20 µL, 0,5-10 µL, 0,1-2,5 µL)</b>	<i>Eppendorf Research Plus, Nemčija</i>
<b>Plastične posode z mikrofiltrom, 50 mL 250 mL</b>	<i>TPP; Trasadingen, Švica</i>
<b>Plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke:  0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL</b>	<i>Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija</i>
<b>Serološke pipete za enkratno uporabo (za 5, 10, 25 in 50 mL)</b>	<i>TPP; Trasadingen, Švica</i>
<b>Steklovina (steklene čaše in bučke)</b>	
<b>Stresalnik VIBROMIX 403 EVIT</b>	<i>Tehnica; Železniki, Slovenija</i>
<b>Škatle za zamrzovanje vzorcev</b>	<i>Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija</i>
<b>Tehnica AG 245</b>	<i>Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica</i>
<b>TURBOVAP®LV</b>	<i>Caliper; Hopkinton, ZDA</i>
<b>Ultrazvočna kadička: Sonis 4</b>	<i>Iskra; Kranj, Slovenija</i>

<b>Vsebniki (T-flask) za gojenje celičnih kultur (s 25, 75 in 150 cm<sup>2</sup> rastne površine)</b>	<i>TPP, Trasadingen, Švica</i>
<b>Vodna kopel</b>	<i>Memmert; Schwabach, Nemčija</i>
<b>Zamrzovalnik (-20 °C)</b>	<i>Gorenje; Velenje, Slovenija</i>
<b>Zamrzovalnik (-80 °C)</b>	<i>Forma Scientific; Midland, ON, Kanada</i> <i>Sanyo Electric Co., Ltd.; Japonska</i>

<b>Medij za delo s celicami</b>	<b>Sestava</b>
<b>Gojišče</b>	<i>500 mL medija RPMI 1640, HEPES Modification</i>
	<i>50 mL FBS</i>
	<i>5,5 mL L-glutamin 200 mM L-glutamin</i>
	<i>5,5 mL antibiotik/antimikotik 100 × (10000 enot penicilina, 10 mg streptomicina in 25 µg amfotericina B na mL)</i>
	<i>0,5 mL 50 mM 2-merkaptoetanol</i>
	<i>500 mL medija DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
	<i>50 mL FBS</i>
<b>Medij za zamrzovanje</b>	<i>5,5 mL L-glutamin 200 mM L-glutamin</i>
	<i>5,5 mL antibiotik/antimikotik 100 × (10000 enot penicilina, 10 mg streptomicina in 25 µg amfotericina B na mL)</i>
	<i>10 % DMSO</i>
	<i>40 % FBS</i>
	<i>50 % medija RPMI 1640, HEPES Modification</i>

Pufri in raztopine	Sestava
<b>10 × PBS (fosfatni pufer); natehtamo sestavine, raztopimo v vodi, uravnamo pH na 7,4 in sterilno filtriramo (0,22 μm)</b>	<i>NaCl 80 g</i>
	<i>KCl 2 g</i>
	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O 36,3 g</i>
	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4 g</i>
	<i>Ultračista H<sub>2</sub>O dopolnimo do 1,0 L</i>
<b>1 x PBS Sterilno filtriram</b>	<i>10 x PBS redčimo 1:10 z avtoklavirano vodo, uravnamo pH na 7,4</i>
<b>Pufer za barvanje (celični cikel)</b>	<i>Tris (100 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM), 0,1 % Nonidet P40</i>

## 3.2. BIOLOŠKI MATERIAL

### 3.2.1. Celične kulture

uporabljene humane celične linije izvirajo iz malignega tkiva. So nesmrtni, kar pomeni, da so pridobile sposobnost neskončne delitve. To je tudi njihova glavna prednost v primerjavi s primarnimi celičnimi kulturami, katerih število delitev in s tem življenjska doba sta omejeni. Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali celične linije THP-1 ter HepG<sub>2</sub>.

#### THP-1 celična linija

THP-1 je monocitna humana celična linija pridobljena iz periferne krvi enoletnika z akutno monocitno levkemijo. Celice so velike, okrogle in enocelične. Povprečni podvojevalni čas je od 35 h do 50 h. Človeško monocitno celično linijo THP-1 smo gojili v RPMI 1640 mediju na 37 °C in pri atmosferi 5 % CO<sub>2</sub>.

#### HepG<sub>2</sub> celična linija

HepG<sub>2</sub> je celična linija, ki se je izkazala kot dober sistem za študije presnove *in vitro* in študije hepatotoksičnosti, saj ohranjajo številne specializirane funkcije, ki karakterizirajo človeške hepatocite. Gojimo jih v DMEM mediju na 37 °C in pri atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>.

### 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 stalen pretok filtriranega laminarnega zraka na delovno površino in tako 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 obuvalo). Pol ure pred začetkom dela smo v LAF komori prižgali UV-lučko, saj njena svetloba deluje baktericidno. Pred začetkom uporabe komore pa smo le-to razkužili s 70 % etanolom. Prav tako smo vso opremo, reagente in vsebnike, ki smo jih uporabljali pri delu (serološke pipete, pipete, nastavke za 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 površino komore razkužili z etanolom.

#### 3.3.2. Gojenje celic

Celične linije THP-1 in HepG<sub>2</sub> smo gojili in redčili v vsebnikih za gojenje celičnih kultur ali ploščicah za celične kulture v inkubatorju, ki zagotavlja ustrezne pogoje za rast celic (temperatura 37 °C, 100 % vlažnost ter atmosfera s 5 % CO<sub>2</sub>).

Za doseganje ustreznega števila in optimalne rasti celic smo jih morali subkultivirati vsake dva do tri dni, tako da smo jih redčili z ustreznim medijem, segretim na 37 °C.

#### 3.3.3 Odmrzovanje celic

Celične kulture shranjujemo v kriovialah pri -80 °C v zmrzovalniku ali pri -180 °C v Dewarjevi posodi s tekočim dušikom. Celice so shranjene v mediju za zamrzovanje, ki vsebuje tudi 10 % DMSO. Le-ta je citotoksičen, zato se mora postopek odmrzovanja izvesti hitro. Kriovialo s celicami smo takoj prenesli iz zmrzovalnika oz. tekočega dušika v vodno kopel, segreto na 37 °C in jo rahlo stresali, da smo pospešili odmrzovanje. Odmrznjeno vsebino smo prenesli v 15 mL centrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 10 mL ustreznega celičnega medija, segretega na 37 °C. Suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 1200 obr./min. Nastali supernatant smo

odpipetirali in celice resuspendirali v ustreznem volumnu medija. Celično suspenzijo smo prenesli v vsebnik za gojenje celičnih kultur in jo dali v inkubator.

### 3.3.4. Štetje celic

Ročno 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  $\mu$ L celične suspenzije in dodali proporcionalen volumen tripanskega modrila, ki prehaja le v celice s poškodovano membrano. Zmes smo dobro premešali in 10  $\mu$ L prenesli na hemocitometer. Nato smo pod mikroskopom prešteli število živih celic v štirih velikih kvadratih ter izračunali koncentracijo po spodnji enačbi:

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

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

FR – faktor redčenja

$10^4$ - volumen celične suspenzije nad kvadratom (1/mL)

#### **Enačba 1: Računanje koncentracije celic s hemocitometrom**

### 3.3.5. Test za določanje celične presnovne aktivnosti z reagentom MTS

Reagent MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium) je tetrazolijeva sol, ki se v živih celicah s kemijsko reakcijo pretvori v formazan. Gre za kolorimetrično reakcijo, 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 pri 492 nm na mikrotiterskem čitalcu (36). Večja kot je izmerjena absorbanca, večja je presnovna aktivnost celic oz. število celic, ki so



presnovno aktivne. Test presnovne aktivnosti nam služi kot dobra ocena za živost celic.

### **Postopek:**

Pripravili smo suspenzijo THP-1 celične kulture s koncentracijo  $2 \times 10^5$  celic/mL in jo v naslednjem koraku nanesti po 1000  $\mu$ L na ploščico z vdolbinicami. Nato smo celicam dodali različne koncentracije karbamazepina in valprojske kisline. Kot kontrolo smo uporabili netretirano celično kulturo oz. celično kulturo, ki smo ji dodali enak volumen topila (DMSO) v katerem smo pripravili raztopine učinkovin. Po tretiranju smo celice v triplicatu po 100  $\mu$ L prenesli na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami. Inkubacija je potekala v inkubatorju za gojenje celic (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po 24 h smo v vsako vdolbinico dodali 10  $\mu$ L reagenta MTS in inkubirali še 2-3 h ter nato pomerili absorbanco nastalega formazina pri 492 nm z mikrotitrskim čitalcem Tecan Safire<sup>2</sup>. Večja kot je bila izmerjena absorbanca, večja je bila presnovna aktivnost celic. Istočasno smo test izvedli tudi z medijem RPMI 1640 (brez celic) in 10  $\mu$ L MTS, s čimer smo določili absorbanco ozadja (slepa kontrola) in jo odšteli od absorbance vzorcev. S celicami HepG<sub>2</sub> smo napravili enak poizkus, s tem da je bila koncentracija celic  $1 \times 10^5$  celic/mL.

$$\% \text{ presnovne aktivnosti} = \frac{c(\text{vzorca}) - c(\text{slepe})}{c(\text{kontrola}) - c(\text{slepe})} \times 100$$

### **Enačba 2: Računanje odstotka presnovne aktivnosti celic**

#### *3.3.6. Merjenje nastanka ROS*

V primeru, da spojine povzročajo oksidativni stres, so sposobne povečati nastanek reaktivnih kisikovih spojin, kar lahko določamo z barvilom H<sub>2</sub>DCFDA, ki je kemično reducirana oblika fluoresceina in je indikator reaktivnih kisikovih zvrsti v celicah. Po cepitvi acetatnih skupin z znotrajceličnimi esterazami in po oksidaciji, se nefluorescentni H<sub>2</sub>DCFDA pretvori v visoko fluorescenten 2',7'-diklorofluorescein (DCF), ki ga lahko izmerimo.

**Postopek:**

Najprej smo si pripravili suspenzijo THP-1 celične kulture v koncentraciji  $1 \times 10^6$  celic/mL v mediju RPMI 1640. Nato smo celice centrifugirali 5 min pri 1200 obr./min, odstranili supernatant ter jih resuspendirali v PBS pufru s  $25 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Po 15 min inkubaciji z barvilom smo celično kulturo ponovno centrifugirali, odstranili supernatant in jih resuspendirali v mediju. Tako pripravljeno suspenzijo smo razdelili po  $1000 \mu\text{L}$  in tretirali z učinkovinami ali  $50 \mu\text{M}$  TBH. Prisotnost ROS smo nato določali s pretočnim citometrom po 1 h, 3 h in 6 h.

*3.3.7. Izpostavljanje celic PEU***Postopek:**

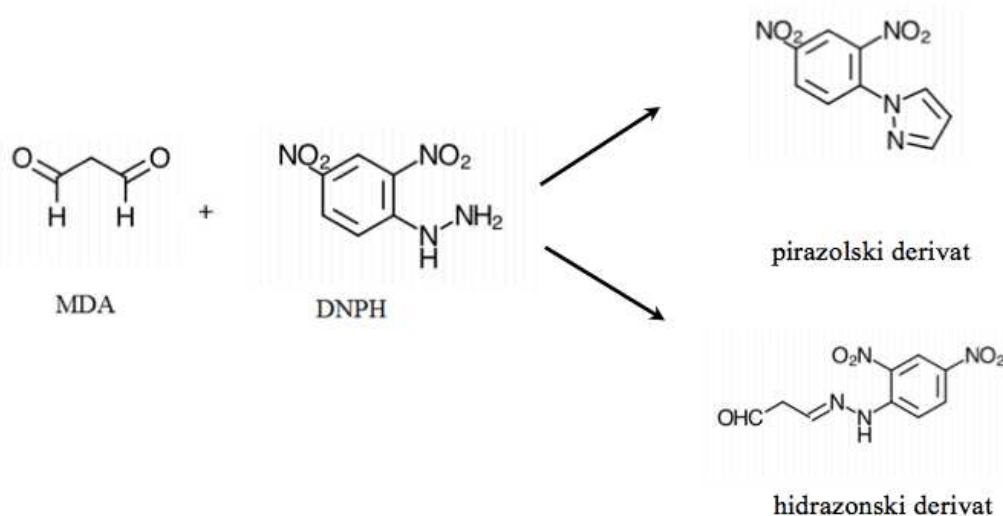
Najprej smo si pripravili suspenzijo THP-1 celične kulture v koncentraciji  $1 \times 10^6$  celic/mL v mediju RPMI 1640. Nato smo celice centrifugirali 5 min pri 1200 obr./min, odstranili supernatant ter jih resuspendirali v PBS pufru s  $25 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Po 15 min inkubaciji z barvilom smo celično kulturo ponovno centrifugirali, odstranili supernatant in jih resuspendirali v mediju. Tako pripravljeno suspenzijo smo razdelili po  $1000 \mu\text{L}$  v 4 tubice in tretirali s karbamazepinom v koncentracijah  $200 \mu\text{M}$  ali  $1000 \mu\text{M}$  ter z valprojsko kislino v koncentracijah  $200 \mu\text{M}$  in  $2000 \mu\text{M}$ . V eno tubico smo dodali  $50 \mu\text{M}$  TBH, v eno ustrezno količino DMSO, v zadnjo tubico pa nismo dodali ničesar.

Celice HepG<sub>2</sub> smo po enakem postopku kot pri THP-1 celicah 24 h tretirali s karbamazepinom v koncentracijah  $200 \mu\text{M}$  in  $1000 \mu\text{M}$  in valprojsko kislino v koncentracijah  $200 \mu\text{M}$  in  $2000 \mu\text{M}$ . Medij smo nato odvzeli celicam HepG<sub>2</sub> in prenesli na THP-1 celice, ki smo jih predhodno označili z barvilom  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Nastanek ROS smo spremljali po 1 h, 3 h in 6 h.

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

DNPH metoda je ena najpogosteje uporabljenih derivatizacijskih metod za določanje MDA. Na Sliki 4 je prikazana reakcija med MDA in 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemer se tvorita hidrazonski in pirazolski derivat, postopek priprave reagentov pa je prikazan v Preglednici II:

**Slika 4: Reakcijska shema derivatizacije MDA z DNPH (CS ChemDraw Drawing program).**



**Preglednica II: Priprava reagentov.**

Reagent	Priprava
<b>0,1 M HCl</b> (klorovodikova kislina)	V 100 mL bučko smo odpipetirali 0,829 mL 37 % HCl in dopolnili z vodo do oznake.
<b>4 M HCL</b>	50 mL 4 M HCl smo pripravili iz 16,57 mL 37 % HCl in dopolnili z vodo do oznake.
<b>1 M HCl</b>	10 mL 1 M HCl pripravili iz 0,829 mL 37 % HCl in dopolnili z vodo do oznake.
<b>6 M NaOH</b> (natrijev hidroksid)	V 10 mL bučko smo nalili približno 5 mL vode in med mešanjem počasi dodajali predhodno natehtani NaOH (2,40 g), ki se je sproti raztapljal. Ko se je ves NaOH raztopil, smo dolili vodo do oznake in še enkrat premešali.

<b>20 % TCA</b> <b>(trikloroocetna</b> <b>kislina)</b>	V 25 mL bučko smo natehtali 5,00 g TCA in dopolnili z vodo do oznake.
<b>1 mg/mL raztopina</b> <b>DNPH (2,4-</b> <b>dinitrofenilhidrazin)</b>	Uporabili smo raztopino DNPH s fosforno kislino ( $c = 0,2 \text{ M}$ ). 250 $\mu\text{L}$ te raztopine smo odpipetirali v 10 mL bučko ter dopolnili s 4 M HCl do oznake.
<b>0,2 M pufer očetna</b> <b>kislina/amonijev</b> <b>acetat</b> <b>(<math>\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-</math></b> <b><math>\text{NH}_4^+</math>)</b>	V 100 mL bučko smo nalili približno 50 mL vode. S pipeto smo dodali 1146 $\mu\text{L}$ 100 % očetne 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 z acetonitrilom dopolnili do oznake. Tako smo dobili 1 mg/mL osnovno raztopine I (OR I) malondialdehida. Nato smo 180  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{mol/L}$ , ki smo 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 III so prikazane pripravljene redčitve 50  $\mu\text{M}$  OR II in 1,25  $\mu\text{M}$  standarda z 0,1 M HCl, s katerimi smo pripravili standarde MDA z ustrezno koncentracijo.

**Preglednica III: Priprava MDA standardov.**

Priprava standardov			Koncentracija standarda MDA [ $\mu\text{mol/L}$ ]
50 $\mu\text{M}$ OR II [ $\mu\text{L}$ ]	1,25 $\mu\text{M}$ standardna ratopina MDA [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen 0,1 M HCl [ $\mu\text{L}$ ]	
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<sub>l</sub>), srednji (QC<sub>m</sub>) in visoki (QC<sub>h</sub>) koncentraciji. Njihove koncentracije so bile 0,1  $\mu\text{mol/L}$  (QC<sub>l</sub>) 0,4  $\mu\text{mol/L}$  (QC<sub>m</sub>) ter 1  $\mu\text{mol/L}$  (QC<sub>h</sub>) tako, da smo pokrili celotno koncentracijsko območje umeritvene krivulje (37).

**Priprava vzorcev**

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

primeru, da je vzorec postal moten, smo ga ponovno centrifugirali. 200  $\mu\text{L}$  te raztopine smo prenesli v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke ter dodali 150  $\mu\text{L}$  1 M HCl in 50  $\mu\text{L}$  raztopine DNPH ter ju premešali. Nato smo jih inkubirali 60 minut pri 50 °C na termostatisanem stresalniku pri 20 obr./min, zaščiten 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), zaščiten pred svetlobo. Vzorcem smo nato dodali 150  $\mu\text{L}$  acetatnega pufra ter premešali. Približno 150  $\mu\text{L}$  raztopine smo odpipetirali v inserte, ki smo jih nato vstavili v obarvane vialice in analizirali s HPLC. Postopek priprave je bil razvit v sklopu diplomske naloge na Katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko (38), povzet in prirejen po članku Czauderne in sod (39).

### Metoda tekočinske kromatografije (LC) in MS/MS

Metodo LC-MS/MS smo povzeli po predhodno izdelani diplomski nalogi na Katedri za biofarmacijo s farmakokinetiko (40). Uporabili smo HPLC sistem Agilent 1290 Infinity s kolono Kinetex C18 (50  $\times$  2,1 mm, velikost delcev 5  $\mu\text{m}$ ) na katero smo injecirali 5  $\mu\text{L}$  vzorca. Vzorci 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 IV.

#### Preglednica IV: 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 oz. elektrorazprševalno ionizacijo–ESI (angl. electrospray ionization). Pri kvantifikaciji smo spremljali prehod 235,1 (pirazolska oblika MDA-DNPH produkta) v 159,2 (fragmentacija z odcepom NO<sub>2</sub> in NO skupine) in za odziv vzeli odziv ionov 159,2.

### 3.3.9. Analizni postopek za določanje koncentracij karbamazepina in presnovkov v plazmi (41)

#### Prilava osnovnih raztopin za umeritveno krivuljo:

V plastičnih epruvetkah smo pripravili osnovne raztopine standardov CBZ-ja, EpoCBZ-ja, LiCBZ-ja ter DiolCBZ-ja za umeritveno krivuljo v koncentraciji 5 mg/mL. Osnovna raztopina internega standarda kloramfenikola je bila 1 mg/mL. Vse standarde smo raztopili v metanolu. Pripravili smo delovne raztopine in raztopine za umeritveno krivuljo, ki so prikazane v Preglednicah V in VI:

#### Preglednica V: Priprava delovnih raztopin za umeritveno krivuljo.

UČINKOVINA	VOLUMEN OR (5 mg/ml)	VOLUMEN MeOH:H <sub>2</sub> O=1:1
LiCBZ (40 µg/mL) – WS2	72 µL	78 µL
CBZ (30 µg/mL) – WS3	54 µL	96 µL
DiolCBZ (20 µg/mL) – WS4	36 µL	114 µL
EpoCBZ (20 µg/mL) – WS5	36 µL	114 µL
	VOLUMEN OR (1 mg/mL)	VOLUMEN MeOH:H <sub>2</sub> O=1:1
IS – Kloramfenikol (0,125 mg/mL)	125 µL	875 µL

Preglednica VI: Priprava raztopin za umeritveno krivuljo.

	Volumen analitov ( $\mu\text{L}$ )	Volumen MeOH:H <sub>2</sub> O=1:1 ( $\mu\text{L}$ )	Koncentracije analitov v končnih vzorcih ( $\mu\text{g/mL}$ )
ZMES 1	70 $\mu\text{L}$ WS2 70 $\mu\text{L}$ WS3 70 $\mu\text{L}$ WS4 70 $\mu\text{L}$ WS5		LI-CBZ 40 CBZ 30 DIOH- CBZ 20 EPO-CBZ 20
ZMES 2	75 $\mu\text{L}$ ZMES 1	25 $\mu\text{L}$	LI-CBZ 30 CBZ 22,5 DIOH- CBZ 15 EPO-CBZ 15
ZMES 3	50 $\mu\text{L}$ ZMES 1	50 $\mu\text{L}$	LI-CBZ 20 CBZ 15 DIOH- CBZ 10 EPO-CBZ 10
ZMES 4	25 $\mu\text{L}$ ZMES 1	75 $\mu\text{L}$	LI-CBZ 10 CBZ 7,5 DIOH- CBZ 5 EPO-CBZ 5
ZMES 5	25 $\mu\text{L}$ ZMES 1	175 $\mu\text{L}$	LI-CBZ 5 CBZ 3,75 DIOH- CBZ 2,5 EPO-CBZ 2,5
ZMES 6	25 $\mu\text{L}$ ZMES 1	375 $\mu\text{L}$	LI-CBZ 2,5 CBZ 1,875 DIOH- CBZ 1,25 EPO-CBZ 1,25
ZMES 7	40 $\mu\text{L}$ ZMES 6	60 $\mu\text{L}$	LI-CBZ 1



			CBZ	0,75
			DIOH-	0,5
			CBZ	0,5
			EPO-CBZ	
<b>ZMES 8</b>	<b>25 µL ZMES 6</b>	100 µL	LI-CBZ	0,5
			CBZ	0,375
			DIOH-	0,25
			CBZ	0,25
			EPO-CBZ	
<b>ZMES 9</b>	<b>30 µL ZMES 6</b>	270 µL	LI-CBZ	0,25
			CBZ	0,1875
			DIOH-	0,125
			CBZ	0,125
			EPO-CBZ	
<b>ZMES 10</b>	<b>25 µL ZMES 6</b>	600 µL	LI-CBZ	0,1
			CBZ	0,075
			DIOH-	0,05
			CBZ	0,05
			EPO-CBZ	

### Priprava vzorcev:

Standardne vzorce z znano koncentracijo analitov pripravimo tako, da 250 µL celičnega gojišča dodamo 25 µL razredčene osnovne raztopine učinkovine (ZMES 1-10) in 25 µL razredčene osnovne raztopine internega standarda. Vzorce iz celičnih poskusov pripravimo tako, da 275 µL celičnega medija iz celičnih poskusov dodamo 25 µL MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1. Nato vzorce vorteksiramo 30 sekund. Iz zamrzovalnika dodamo 600 µL acetonitrila. Vzorce ponovno vorteksiramo 30 sekund, nato jih centrifugiramo 10 minut pri 4 °C in 13100 obr./min. Odvzamemo 125 µL supernatanta in ga sušimo v centrifugi pod vakuumom. Ko se vzorci posušijo ponovno odvzamemo 125 µL supernatanta, ki ga zopet sušimo 90 minut. Posušene vzorce rekonstituiramo v 40 µL raztopine MeOH:puffer=80:20 (v/v). Vzorce vorteksiramo še 1 minuto in analiziramo s HPLC. Koncentracijo karbamazepina in presnovkov v vzorcih smo merili z metodo HPLC pri pogojih, ki so prikazani v Preglednici VII:

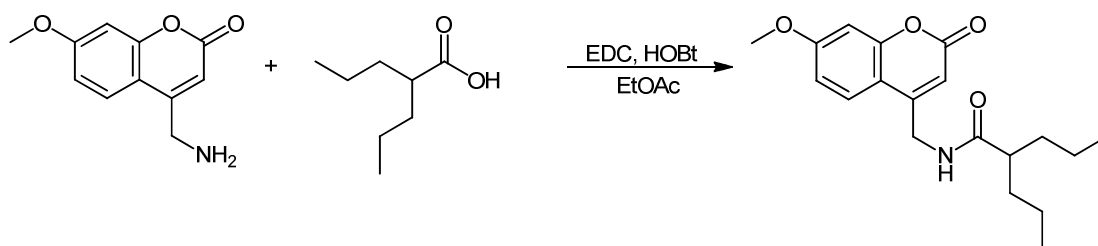
**Preglednica VII: HPLC pogoji**

<b>Kolona (150x4,6)</b>	<b>Luna 5u Phenyl-Hexyl</b>
<b>Mobilna faza</b>	<b>MeOH:pufer = 50:50</b>
<b>Pufer pufer,</b>	<b>25 mM kalijev fosfatni  pH=3</b>
<b>Temperatura</b>	<b>50 °C</b>
<b>Pretok</b>	<b>1 mL/min</b>
<b>Volumen injiciranja</b>	<b>5 µL</b>
<b>Valovna dolžina</b>	<b>215 nm</b>

**3.3.10. Analiza VAL in 4-en VPA**

Slika 5 prikazuje derivatizacijo VAL s kumarinom ob prisotnosti reagentov 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC) in hidroksibenzotriazola (HOBT) pri čemer nastane *N*-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)-2-propilpentanamid. EDC je aktivator valprojske kisline, HOBT pa je pomožni nukleofil.

**Slika 5: Reakcijska shema derivatizacije valprojske kisline s kumarinom (CS ChemDraw Drawing program).**

**Priprava umeritvene krivulje VAL:**

Natehtali smo približno 8 mg Na-VPA in pripravili vodno raztopino s koncentracijo 4,6 mg/mL, kar ustreza koncentraciji 4,0 mg/mL VAL. Iz osnovne raztopine smo nato pripravili naslednje koncentracijske raztopine (Preglednica VIII):

**Preglednica VIII: Priprava koncentracijskih raztopin glede na VAL.**

Koncentracija VAL v končnih vzorcih	Konc. VAL v raztopinah za vzorcev	Volumen osnovne raztopine VAL	Volumen H <sub>2</sub> O	Končni volumen
µg/mL	µg/mL	µL	µL	µL
200	4000	1000	0	1000
150	3000	375	125	500
100	2000	250	250	500
75	1500	225	375	600
50	1000	125	375	500
25	500	75	525	600
16	320	40	460	500
10	200	25	475	500
5	100	25	975	1000
2,5	50	25	1975	2000

**Priprava umeritvene krivulje 4-en VPA:**

1 mg 4-en VPA smo najprej raztopili v mešanici vode in metanola (40/60 v/v) in pripravili osnovno raztopino s koncentracijo 1 mg/mL. Osnovno raztopino smo redčili 2000 × ter nato pripravili vodne raztopine s koncentracijami (Preglednica IX), natehte posameznih reagentov za pripravo standardnih raztopin pa so prikazane v Preglednici X:

**Preglednica IX: Priprava koncentracijskih raztopin glede na 4-en VPA.**

Koncentracija 4-enVPA v končnih vzorcih	Konc. 4-enVPA v raztopinah za obogatitev vzorcev	Volumen osnovne raztopine 4-enVPA	Volumen H <sub>2</sub> O	Končni volumen
µg/mL	µg/mL	µL	µL	µL
30	600	300	200	500
20	400	200	300	500
10	200	100	400	500
6	120	60	440	500
4	80	40	460	500
2	40	20	480	500
1	20	20	980	1000
0,5	10	20	1980	2000

**Preglednica X: Natehte posameznih reagentov za pripravo standardnih raztopin.**

	M (g/mol)	c (mg/mL)	Zatehta (mg)	Volumen ( $\mu$ L)
Na-VPA	166,2	4,6	43,92	9548
4-enVPA		1	1	1000
Kumarin amin (JM-111)	205	12,3	22	1790
HOBt	135,12	99,8	185,56	1859
EDC	155,24	765,9	3241,01	4232

**Priprava internega standarda:**

Pentanojsko kislino (IS) smo redčili  $2000 \times$ .

Standardne vzorce z znano koncentracijo analitov pripravimo tako, da v  $170 \mu\text{L}$  celičnega gojišča dodamo  $10 \mu\text{L}$  VAL,  $10 \mu\text{L}$  4-en VPA in  $10 \mu\text{L}$  IS pripravljenih po zgoraj opisanem postopku. Vzorce iz celičnih poskusov pripravimo tako, da k  $190 \mu\text{L}$  celičnega medija iz celičnih poskusov dodamo  $10 \mu\text{L}$  IS. Sledila je ekstrakcija, kjer smo od predhodno pripravljenih vzorcev odvzeli  $50 \mu\text{L}$ , dodali  $200 \mu\text{L}$  etilacetata in  $100 \mu\text{L}$   $10 \text{ mM}$  HCl. Zmes smo najprej  $10 \text{ s}$  vorteksirali, nakar smo jo prestavili v stresalnik za  $5 \text{ minut}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $70 \text{ obr./min}$ ). Sledilo je ponovno  $10 \text{ s}$  vorteksiranje in  $5 \text{ min}$  centrifugiranje na  $16.000 \text{ obr./min}$ . Kasneje je sledila derivatizacija, kjer smo odvzeli  $100 \mu\text{L}$  organske faze in ji dodali  $25 \mu\text{L}$  kumarin-amina,  $25 \mu\text{L}$  HOBt-a,  $100 \mu\text{L}$  EDC-ja ter  $40 \mu\text{L}$  fosfatnega pufra ( $\text{pH } 7,0$ ). Zmes smo ponovno vorteksirali  $10 \text{ s}$  in prestavili v stresalnik za  $5 \text{ min}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $70 \text{ obr./min}$ ). Sledilo je ponovno vorteksiranje za  $10 \text{ s}$  in centrifugiranje za  $5 \text{ min}$  na  $16.000 \text{ obr./min}$ . Sledilo je sušenje, kjer smo odvzeli  $25 \mu\text{L}$  organske faze in jo posušili ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , prepihanje z dušikom). Posušene vzorce smo rekonstituirali v  $150 \mu\text{L}$   $60 \%$  acetonitrila v vodi.

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

### *3.3.11. 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 razen pri rezultatih MDA, kjer smo podali absolutne koncentracije. Tudi statistično analizo smo izvedli s programom Microsoft Excel 2010. Uporabili smo dvostranski neparni Studentov t-test in preverjali hipoteze o signifikantnosti razlik med vzorci pri stopnji tveganja 5 % ( $\alpha=0,05$ ). Predhodno smo še s F-testom pri isti stopnji tveganja ugotavljali ali sta varianci primerjanih vzorcev signifikantno različni.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

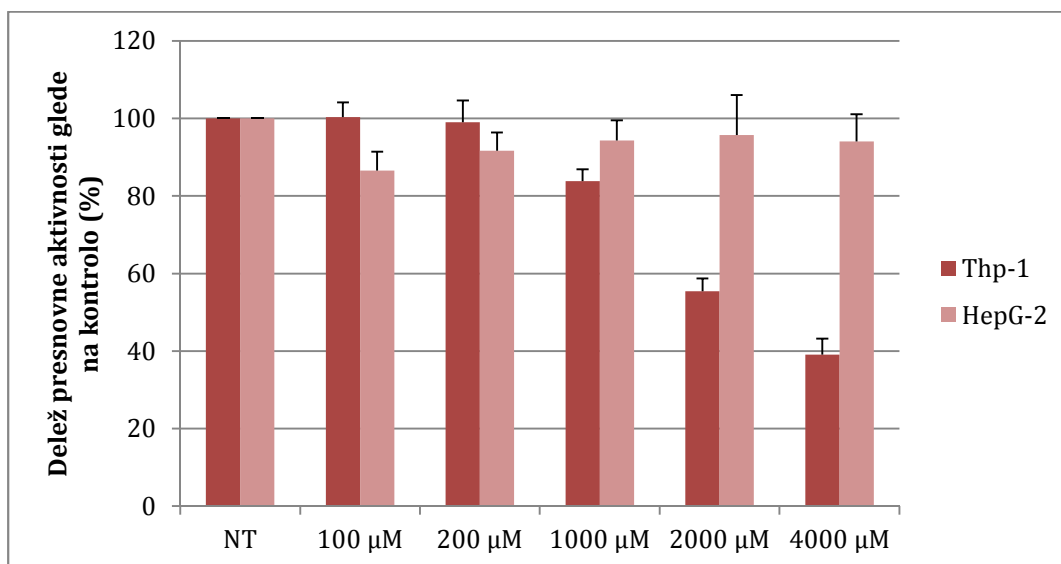
Karbamazepin in valprojska kislina spadata v starejšo generacijo PEZ, za katere je značilno, da so v večjem obsegu izpostavljene presnavljanju kot novejša generacija. Tekom presnavljanj naj bi tvorila reaktivne presnovke oz. naj bi preko delovanja na endogene mehanizme povzročila nastanek reaktivnih spojin, kar lahko posledično vodi v nastanek oksidativnega stresa.

### 4.1. VPLIV KARBAMAZEPINA IN VALPROJSKE KISLINE NA PRESNOVNO AKTIVNOST CELIC

Namen diplomske naloge je bil proučiti nastanek oksidativnega stresa v celicah po dodatku karbamazepina in valprojske kisline.

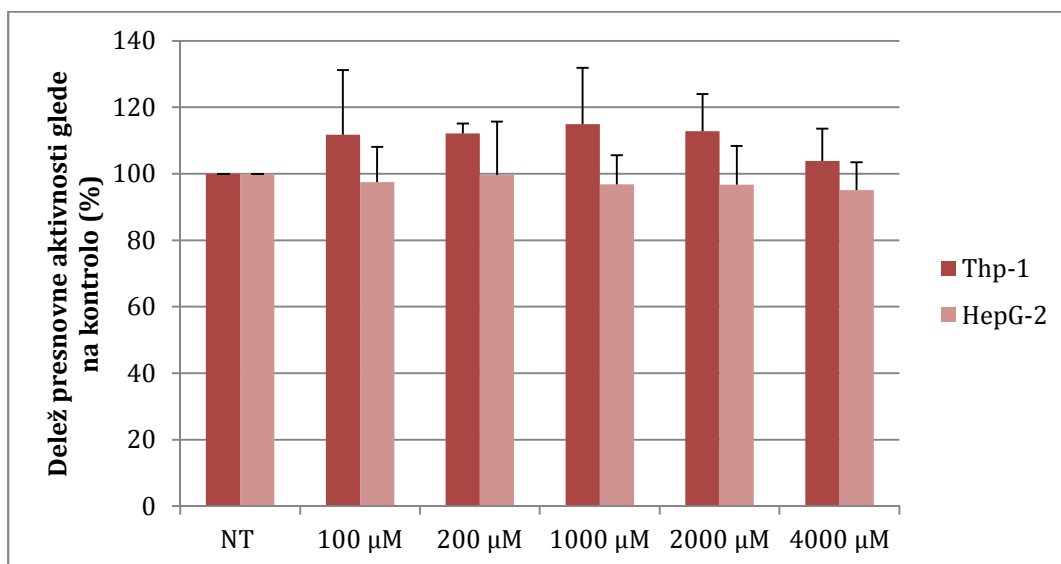
Test MTS smo izvedli na začetku laboratorijskega dela diplomske naloge, ker smo želeli testirati oksidativni potencial učinkovin pri netoksični koncentraciji učinkovin. Poskus je bil izveden tako na celicah THP-1, kot tudi na HepG<sub>2</sub> celicah. Presnovno oceno aktivnosti celic smo uporabili kot indikator živosti celic, ki smo jih tretirali s karbamazepinom in valprojsko kislino.

Celice THP-1 smo tretirali s karbamazepinom ali valprojsko kislino v različnih koncentracijah (100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 2000  $\mu$ M in 4000  $\mu$ M). Po 24 h smo izvedli test MTS, kot je opisano v protokolu. Rezultate smo podali v odstotkih presnovne aktivnosti glede na netretirane celice. Postopek smo ponovili na HepG<sub>2</sub> celicah.



**Slika 6: Presnovna aktivnost THP-1 in HepG<sub>2</sub> celične linije po 24 h tretiranju s karbamazepinom.** Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami karbamazepina. Slika prikazuje presnovno aktivnost celic, normaliziranih na presnovno aktivnost kontrolnih (netretiranih celic). NT, netretirane celice.

Iz presnovne aktivnosti celic po 24 h smo opazili, da karbamazepin na THP-1 celicah povzroči koncentracijsko odvisen upad presnovne aktivnosti, medtem ko tega učinka nismo zasledili pri celicah HepG<sub>2</sub>. Sklepamo lahko, da je upad presnovne aktivnosti na THP-1 posledica znižane proliferacije celic oz. zmanjšanega preživetja le-teh. Naši podatki so v skladu z rezultati članka *Perez Martin in sod.*, kjer so prav tako ugotovili, da lahko karbamazepin povzroči zastoj mitotske delitve celic. Študije so delali na Vero celicah sesalcev. Odkrili so, da izpostavljenost učinkovine za več kot 9 h rezultira v apoptozi celic (42).



**Slika 7: Presnovna aktivnost THP-1 in HepG<sub>2</sub> celične linije po 24 h tretiranju z valprojsko kislino.** Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami valprojske kisline. Slika prikazuje presnovno aktivnost celic, normaliziranih na presnovno aktivnost kontrolnih (netretiranih celic). NT, netretirane celice.

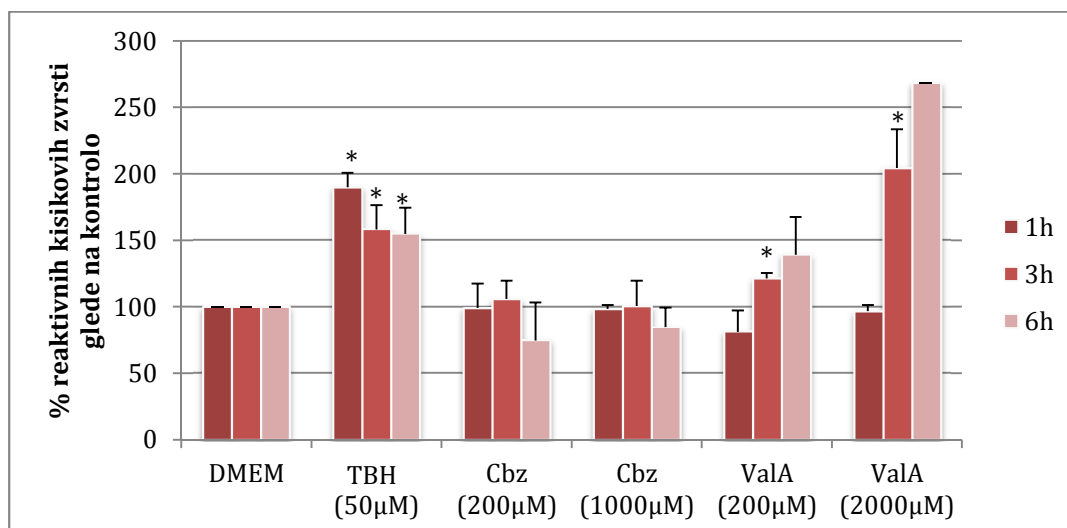
Iz MTS-a razberemo, da valprojska kislina pri uporabljenih koncentracijah ne vpliva na presnovno aktivnost celic (THP-1 in HepG<sub>2</sub>) in s tem tudi ne na njihovo proliferacijo ali živost.

#### 4.2. VPLIV CBZ IN VAL NA NASTANEK ROS

Poglavitni del diplomske naloge je bil preveriti ali VAL in CBZ v THP-1 celicah povzročata oksidativni stres. Kot parameter detekcije smo se odločili določati ROS.

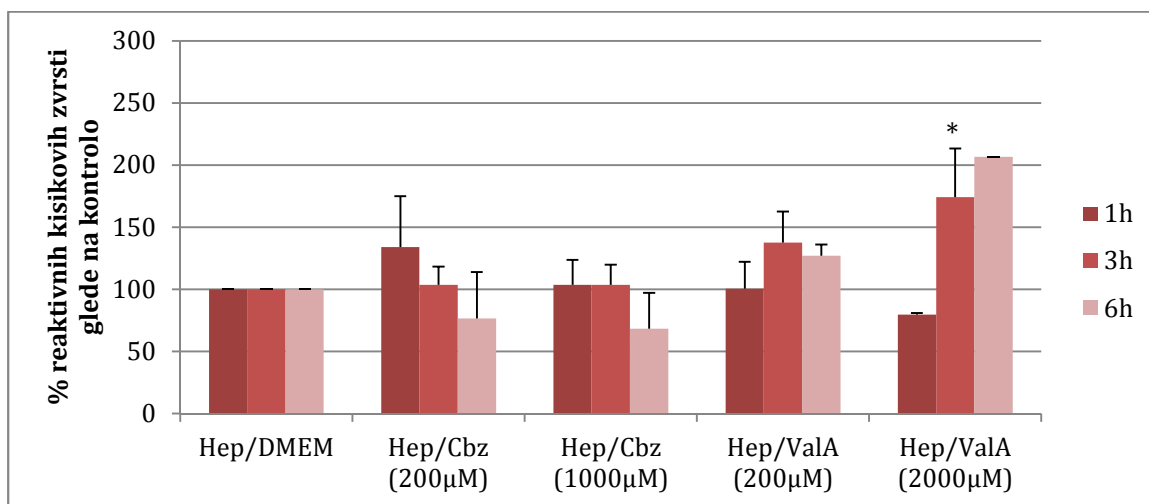
Z radikali povzročene celične poškodbe lahko vodijo v razvoj in nastanek kroničnih degenerativnih bolezni. Organski peroksid, TBH (*tert*-butil hidroperoksid), se pogosto uporablja kot iniciator za radikalno polimerizacijo in v različnih oksidacijskih procesih. Nastanek oksidativnega stresa sprožimo, ko ga dodamo k celicam v dovolj visoki koncentraciji. TBH smo uporabili kot pozitivno kontrolo, s katero smo preverili ustreznost naše metode, saj TBH pripada reaktivnim kisikovim zvrstem. THP-1 celice smo najprej označili z barvilom H<sub>2</sub>DCFDA, nato pa tretirali s karbamazepinom (200 µM ali 1000 µM) ali z valprojsko kislino (200 µM in 2000 µM) in TBH (50 µM). Prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti smo po 1 h, 3 h in 6 h določili s pretočnim citometrom in dobili naslednje rezultate (Slika 8). Predstavljena so povprečja posameznih paralelk ± standardni odkloni (Slika 8 in 9).





**Slika 8: Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti.** Celice THP-1 smo tretirali s TBH (50 μM) in z določenima koncentracijama karbamazepina in valprojske kisline. Delež ROS smo analizirali glede na netretirane celice po 1 h, 3 h in 6 h. \* $p < 0,05$  med primerjanimi poskusi.

Iz Slike 8 je razvidno, da se ob prisotnosti 50 μM TBH poveča nivo ROS za približno 2-krat v primerjavi z netretiranimi celicami, kar pomeni, da lahko pride do oksidativne poškodbe in indukcije lipidne peroksidacije v celicah. Karbamazepin pod danimi pogoji ne povzroča oksidativnega stresa, saj je delež reaktivnih kisikovih zvrsti glede na netretirane celice podoben tako po 1 h, 3 h in 6 h. Pri 200 μM valprojski kislini je sicer opazen rahel porast ROS (približno 1,5-krat) po 6 h, a vrednosti niso bile statistično značilne. Pri uporabi 2000 μM valprojske kisline se je prisotnost ROS po 3 h in po 6 h značilno povečala in sicer za 2- oz. 2,5-krat glede na kontrolo. Statistično razliko smo uspeli dokazati le med parom valprojske kisline pri nižji koncentraciji in valprojske kisline pri višji koncentraciji po 3 h merjenja (VAL 200/VAL 2000). Za dodatno osvetlitev mehanizma nastanka reaktivnih kisikovih spojin teh dveh spojin, bi bila potrebna dodatna testiranja.



**Slika 9: Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti.** Medij iz HepG<sub>2</sub> celic smo prenesli na THP-1 celice in spremljali nastanek ROS v treh časovnih intervalih. \*p<0,05 glede na Hep/DMEM.

Celično linijo HepG<sub>2</sub>, ki ima visoko presnovno aktivnost, smo izpostavili karbamazepinu in valprojski kislini, saj so nekatere študije pokazale, da presnovki teh dveh spojin povzročajo oksidativni stres. Želeli smo preveriti ali celice HepG<sub>2</sub> presnavljajo spojine oz. ali le-te nato povzročajo oksidativni stres.

Celice smo 24 h tretirali s karbamazepinom (200 µM ali 1000 µM) ali valprojsko kislino (200 µM ali 2000 µM). Medij smo nato odvzeli celicam HepG<sub>2</sub> in prenesli na THP-1 celice, ki smo jih predhodno označili z barvilom H<sub>2</sub>DCFDA. Nastanek ROS smo spremljali po 1 h, 3 h in 6 h.

Iz Slike 9 lahko vidimo podobno situacijo kot pri prejšnjem eksperimentu, s tem da je obseg nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti manjši. Pri dodatku karbamazepina in 200 µM valprojske kisline je delež reaktivnih kisikovih zvrsti glede na netretirane celice podoben. Uporaba najvišje koncentracije valprojske kisline je znova povzročila najboljše nastanek oksidativnega stresa, saj je nastalo največ ROS, predvsem po 3 h in po 6 h merjenja. Statističnih razlik med primerjanimi pari nismo uspeli dokazati. Statistično razliko smo dokazali le pri višji koncentraciji valprojske kisline po 3 h merjenja v primerjavi s kontrolo.

### 4.3. REZULTATI MERITEV MDA

V drugem delu diplome smo se osredotočili na merjenje kazalnikov lipidne peroksidacije v celičnih lizatih.

Preko določanja koncentracije MDA, kot stranskega produkta lipidne peroksidacije, lahko ocenjujemo obseg lipidne peroksidacije, ki bi jo lahko povzročila karbamazepin in valprojska kislina.

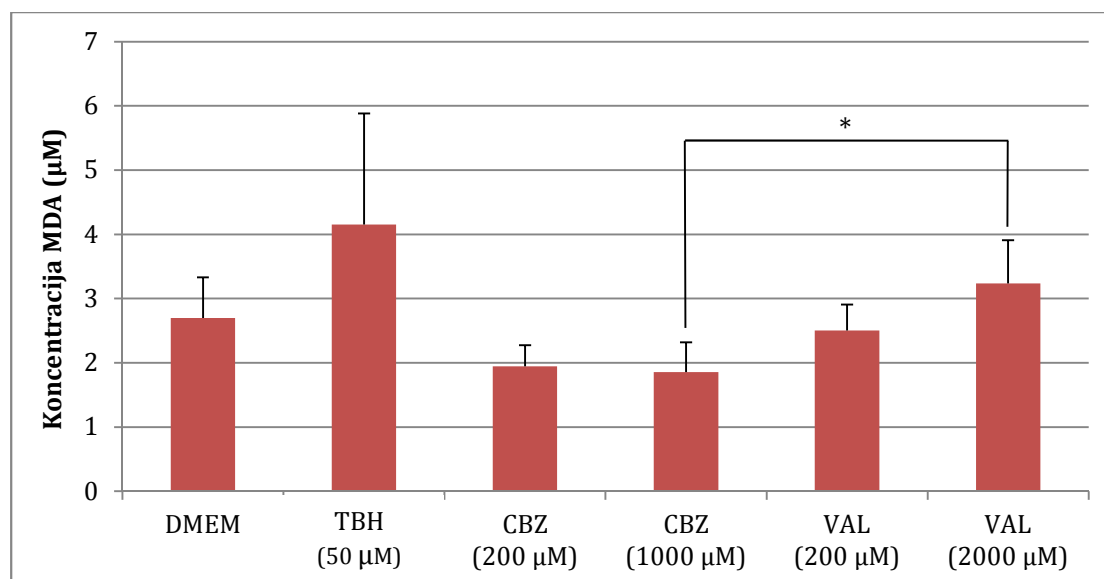
Koncentracije MDA smo izračunali na osnovi umeritvene premice (preglednica XI). Vzorce smo analizirali samo po 6 h inkubacije celic s PEZ.

**Preglednica XI: Umeritvena premica za določanje koncentracij MDA.**

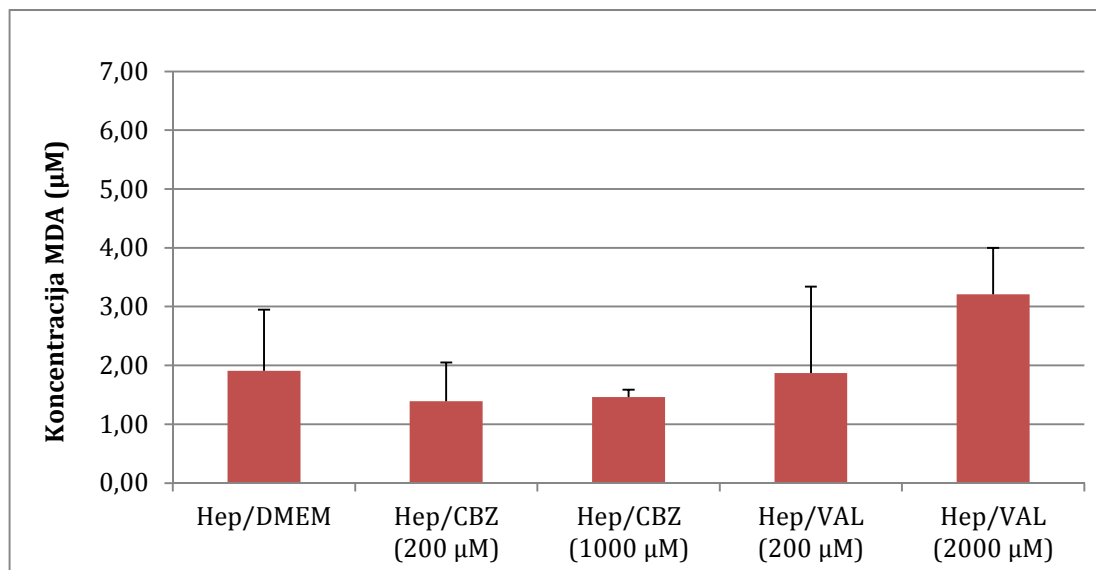
MDA	UP 1
<b>k</b>	2055,9
<b>n</b>	477,9
<b>r<sup>2</sup></b>	0,995

#### 4.3.1. Vpliv vrste in koncentracije PEU na nastanek MDA

V Sliki 10 in 11 so predstavljeni rezultati meritev MDA pri različnih koncentracijah karbamazepina in valprojske kisline. Predstavljena so povprečja posameznih paralelk  $\pm$  standardni odkloni. Na Sliki 10 so predstavljene koncentracije MDA v poskusih na celicah THP-1, ko smo jim neposredno v medij dodali učinkovino. Medtem ko so na sliki 11 predstavljeni rezultati poskusa, kjer smo medij iz HepG<sub>2</sub> celic prenesli na celice THP-1.



**Slika 10: Določanje koncentracije MDA.** Celice THP-1 smo tretirali s TBH (50  $\mu\text{M}$ ) in z določenima koncentracijama karbamazepina in valprojske kisline (n=3-4). Statistično razliko smo uspeli dokazati le med parom karbamazepina in valprojske kisline pri višji koncentraciji (\*p=0,018; CBZ 1000 / VAL 2000).



**Slika 11: Določanje koncentracije MDA.** Medij iz HepG<sub>2</sub> celic smo prenesli na THP-1 celice. Po 6 h inkubacije smo v celičnih lizatih izmerili koncentracijo MDA (n=2). Statističnih razlik med primerjanimi pari nismo uspeli dokazati.

### Kontrolni vzorci

Kontrolni vzorec s TBH smo uporabili z namenom, da bi v celicah inducirali lipidno peroksidacijo in z meritvami MDA to tudi potrdili. S tem bi posredno dokazali, da se naš celični model obnaša v skladu s pričakovanji. *Marini in sod.* navajajo, da se je po 4 h izpostavljanju podganjih peritonealnih makrofagov raztopini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s koncentracijo 50  $\mu\text{M}$ , koncentracija MDA v primerjavi z netretirano kontrolo povečala za stokrat (43). Mi pa smo celice izpostavili 50  $\mu\text{M}$  TBH in jih inkubirali 6 h. Zaradi premajhnega števila paralelk sicer statistično značilne razlike med kontrolnim vzorcem s TBH in kontrolnim vzorcem brez TBH nismo uspeli dokazati, vseeno pa je opazen trend povečane koncentracije MDA v vzorcu s TBH v primerjavi s kontrolnim vzorcem netretiranih celic.

## Karbamazepin

Karbamazepin je v nizki in visoki koncentraciji (200  $\mu\text{M}$  in 1000  $\mu\text{M}$ ) na celicah THP-1 povzročil trend upada koncentracije MDA v primerjavi s kontrolo. Pri meritvah MDA ni bilo nobene razlike, če smo uporabili 200  $\mu\text{M}$  ali 1000  $\mu\text{M}$  CBZ. Na celicah z dodanim medijem s HepG<sub>2</sub> je bil rezultat podoben, saj je prav tako viden trend upada koncentracije MDA v primerjavi s kontrolo.

V prejšnjih poskusih meritev MDA na celični liniji Ramos (38) in celični liniji PBMC (44), kjer so uporabljali koncentraciji CBZ (42  $\mu\text{M}$  in 211  $\mu\text{M}$ ), so pri nižji koncentraciji CBZ zaznali dvig koncentracije MDA v primerjavi s kontrolo, pri višji koncentraciji CBZ pa ni prišlo do razlik koncentracij MDA v primerjavi s kontrolo.

Prav tako pa se naši rezultati ne ujemajo z ugotovitvami drugih raziskovalcev. *Pavone in sod.* so dokazali, da so določena PEZ v astrocitih sposobna iniciacije oksidativnih procesov. *In vitro* so CBZ-ju v koncentraciji 211  $\mu\text{M}$  izpostavili primarno kulturo astrocitov podgan in ugotovili, da CBZ značilno poveča njihovo koncentracijo MDA (45,46). Poleg MDA so po 48 h ugotovili, da sta se nivoja NO in ROS v odvisnosti od koncentracije tudi statistično signifikantno povišala. NO in ROS sta prav tako kazalnika oksidativnega stresa (45).

V literaturi pri poskusih *in vivo* prav tako najdemo mnoge nasprotujoče si rezultate o vplivu CBZ-ja na nastajanje MDA. V poskusih na podganah, katerim so napade povzročili z elektrošokom, so *Pahuja in sod.* v homogenatu njihovih možganov preverjali vpliv CBZ-ja na MDA. Prišli so do zaključka, da se je z dodatkom terapevtskega odmerka (25  $\mu\text{M}$ ) CBZ-ja nivo MDA v primerjavi s kontrolo vidno znižal, pri subterapevtskem odmerku (13  $\mu\text{M}$ ) CBZ-ja pa ni prišlo do znižanja nivoja MDA (47).

Študija objavljena pred kratkim, kjer so nekatere paciente z epilepsijo zdravili s CBZ-jem, druge pa ne, je pokazala, da CBZ na spremembo koncentracije MDA ni imel vpliva (48). *Verotti in sod.* so določali aktivnost encimskih antioksidantov GPx in SOD, ki lahko vplivata na koncentracije MDA. Značilnih sprememb v aktivnosti encimov po enoletni terapiji s CBZ-jem ni bilo zaznanih (49). V vse večjih člankih predvidevajo, da CBZ v primerjavi s kontrolo oksidativnega stresa ne izzove, posledično pa tudi koncentracije MDA ob njegovi prisotnosti ne poviša. *Arhan in sod.*

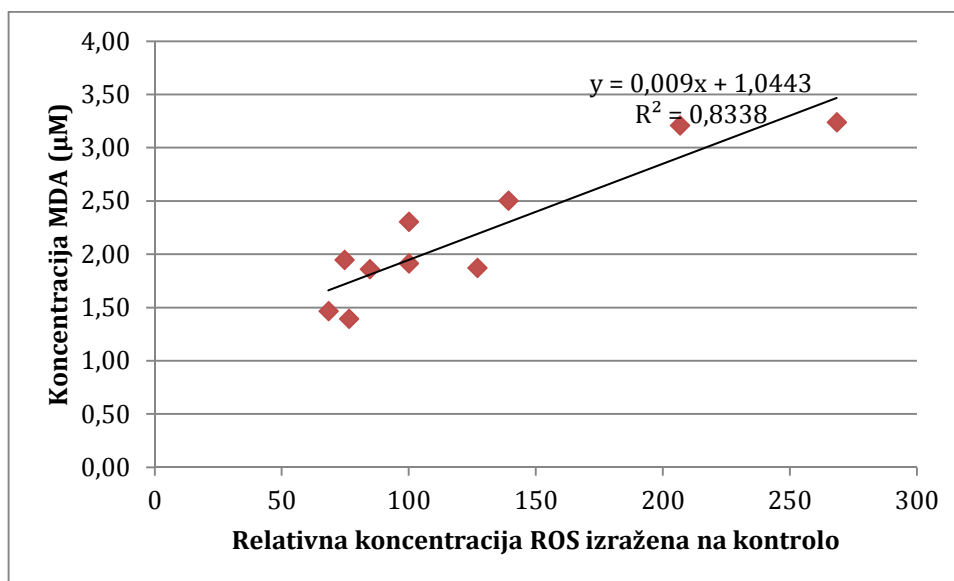
ugotavljajo, da naj bi imela na oksidantno-antioksidantno ravnotežje novejša generacija antiepileptikov manj izraženih neželenih učinkov kot starejša generacija. V raziskavi na limfocitih so prav tako zaključili, da naj bi se pri dolgotrajni izpostavljenosti CBZ-ju koncentracije MDA znižale, medtem ko valprojska kislina koncentracije MDA zviša (50).

### **Valprojska kislina**

Pri izpostavljanju celic THP-1 nižji in višji koncentraciji (200  $\mu\text{M}$  in 2000  $\mu\text{M}$ ) valprojske kisline lahko opazimo trend večanja koncentracije MDA pri višji koncentraciji VAL v primerjavi s kontrolo. Še bolj je ta trend izrazit v poskusih VAL na celicah z dodanim medijem s HepG<sub>2</sub>. Če primerjamo vpliv VAL in CBZ na nastanek lipidne peroksidacije, potem lahko zaključimo, da VAL za razliko od CBZ povzroča povečano lipidno peroksidacijo, kar smo uspeli tudi statistično dokazati.

VAL je bil predmet raziskave v večih študijah. Prejšnje študije učinkov VAL na MDA pri otrocih z epilepsijo so pokazale nasprotujoče si rezultate. Študija *Arhan in sod* je pokazala, da sama VAL ne povzroči spremembe oksidativnega statusa pri bolnikih z epilepsijo (50). *Yuksel in sod.* so pokazali povečano peroksidacijo lipidov v primerjavi s kontrolo pri otrocih z epilepsijo, ki so 13 mesecev prejeli VAL (51). Nedavna študija *Michoulasa in sod* je celo pokazala, da ima oksidativni stres potencialno vlogo pri z VAL inducirani hepatotoksičnosti. V urinu otrok z epilepsijo, ki se zdravijo z VAL so odkrili povišano raven 15-F<sub>2</sub>T-izoprostana, ki je označevalec lipidne peroksidacije (52). V nasprotju kot pri zgoraj omenjenih raziskavah, je o nižani koncentraciji MDA pri bolnikih, ki so prejeli VAL, poročal *Cengiz in sod.* (53).

### Primerjava rezultatov MDA in ROS



**Slika 12: Korelacija ROS in MDA.** Prikazani so pari točk za iste vzorce in parametri linearne regresije.

Meritve ROS in MDA so povezane, saj je determinacijski koeficient  $r^2 > 0,80$ . Posledično lahko zaključimo, da smo z obema metodama dobili primerljive rezultate, ki kažejo na to, da CBZ in VAL povzročata oksidativni stres, saj pride tako do povečanega obsega lipidne peroksidacije kot tudi nastanka ROS.

#### 4.4. REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJE KARBAMAZEPINA IN NJEGOVIH PRESNOVKOV V CELIČNIH POSKUSIH Z DODANIM MEDIJEM S HEPG<sub>2</sub> CELIC

Ker so se pri meritvah MDA pokazale spremembe, smo se za konec odločili meriti še presnovke učinkovin, saj naj bi le-ti bili odgovorni za povečan obseg lipidne peroksidacije. Namen tega dela raziskav je bil torej dokazati nastajanje presnovkov CBZ ter njihove koncentracije poskušati povezati z rezultati ROS in MDA. Koncentracije CBZ smo izračunali na podlagi umeritvene premice (Preglednica XII), rezultate meritev pa podali v Preglednici XIII:

**Preglednica XII: Umeritvena premica za določanje koncentracij CBZ in njegovih presnovkov.** Umeritvena premica je imela enačbo  $\text{koncentracija} = 0,410 \times \text{odziv} - 2,210$ ; determinacijski koeficient  $R^2 = 0,995$ .

CBZ	UP 1
<b>k</b>	0,410
<b>n</b>	-2,210
<b>r<sup>2</sup></b>	0,995

**Preglednica XIII: Rezultati meritev koncentracije karbamazepina in internega standarda v vzorcih celičnih gojišč po končani izpostavljenosti celic s CBZ.**

Vzorci celic	Odziv internega standarda	Odziv CBZ	Koncentracija CBZ ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>RPMI CBZ A 1000</b>	13,4	530,5	432,1
<b>RPMI CBZ B 1000</b>	11,1	441	433,4
<b>DMEM CBZ 1000</b>	16,1	251,5	184,1

V vzorcih gojišč smo uspeli izmeriti le koncentracijo CBZ, medtem ko koncentracij presnovkov v vzorcih nismo uspeli določiti. Ker naj bi bili za nastanek oksidativnega stresa odgovorni predvsem presnovki CBZ (31), se ta rezultat sklada z meritvami MDA in ROS, kjer nismo uspeli dokazati povečanega oksidativnega stresa. Glede na primerjavo koncentracij CBZ-ja, ki smo jih dali na začetku v gojišče (1000  $\mu\text{mol/L}$ ) in izmerjenih koncentracij, lahko ugotovimo, da se je koncentracija CBZ-ja zelo zmanjšala. Vzrok je verjetno ta, da se je CBZ bolj porazdelil v celice (intracelularno) kot zunaj njih (ekstracelularno). Kot že prej omenjeno smo namreč koncentracijo CBZ določali v ekstracelularni tekočini (v gojišču). Kljub temu, da presnovkov nismo uspeli določiti v celičnih gojiščih, pa obstaja možnost, da so le-ti v poskusih nastali, vendar so v večjih koncentracijah prisotni v celicah.



#### 4.5. REZULTATI MERITEV VALPROJSKE KISLINE IN NJENEGA PRESNOVKA V CELIČNIH POSKUSIH Z DODANIM MEDIJEM S HEPG<sub>2</sub> CELIC

Enostavna in občutljiva metoda HPLC je bila razvita za določanje valprojske kisline v človeški plazmi. Številne študije kažejo, da je 4-en VPA najbolj pomemben, teratogen in hepatotoksičen presnovek, zato smo se odločili poleg VAL spremljati še 4-en VPA. Koncentracije VAL in 4-en VPA smo izračunali na podlagi umeritvene premice (Preglednica XIV), rezultate pa podali v Preglednici XV:

**Preglednica XIV: Umeritvena premica za določanje koncentracije VAL in 4-en VPA.**

VAL	UP 1	4-en VPA	UP 1
<b>k</b>	0,0918	<b>k</b>	0,0618
<b>n</b>	-0,0132	<b>n</b>	-0,0186
<b>r2</b>	0,998	<b>r2</b>	0,998

**Preglednica XV: Izračuni s koncentracij VAL.**

Izračuni s koncentracij VAL	VAL (μmol/L)
<b>VAL 200</b>	82,8
<b>VAL 200B</b>	87,6
<b>VAL 2000</b>	652
<b>VAL 2000B</b>	659

Presnovka 4-en VPA v naših vzorcih nismo zaznali, zaznali smo le VAL. Glede na primerjavo koncentracij VAL, ki smo jih dali na začetku v gojišče (2000 μmol/L) in izmerjenih koncentracij smo izračunali zelo velik primanjkljaj VAL v mediju. Razlog zato je lahko v tem, da se je VAL najverjetneje porazdelila v celice. Presnovka 4-en VPA morda res nismo uspeli detektirati, ker ni nastal ali ker je bila naša metoda premalo občutljiva. Prav tako je pa možno, da se tudi presnovek 4-en VPA zadržuje v celicah.

## 5. SKLEPI

Namen diplomske naloge je bil, da ugotovimo ali sgPEU povzročajo oksidativen stres. Tako smo monocitno celično linijo THP-1 izpostavili CBZ in VAL oz. smo celični medij HepG<sub>2</sub>, ki je imel dodan izbrani PEU, po 24 h prenesli na THP-1. Določili smo ROS, MDA, koncentracijo učinkovin in prisotnost njihovih presnovkov ter na osnovi meritev prišli do sledečih ugotovitev:

- uporabljene koncentracije CBZ-ja nad 1000  $\mu\text{M}$  so bile po 24 h časovnem obdobju toksične za celično linijo THP-1, medtem ko tega učinka nismo zasledili na celicah HepG<sub>2</sub>. VAL pri uporabljenih koncentracijah ni povzročila značilne spremembe presnovne aktivnosti celic THP-1 in HepG<sub>2</sub>.
- porasta ROS na THP-1 celicah v prisotnosti CBZ-ja nismo opazili v nobeni časovni točki. Statistično razliko smo uspeli dokazati za nižjo in višjo koncentracijo VAL. Pri poskusu na celicah THP-1 z dodanim medijem celic HepG<sub>2</sub> je bil rezultat podoben.
- VAL povzroča povečano lipidno peroksidacijo v primerjavi s CBZ, kar smo uspeli tudi statistično dokazati. CBZ je tako na celicah THP-1 kot tudi HepG<sub>2</sub> povzročil trend upada koncentracije MDA v primerjavi s kontrolo. Višja koncentracija VAL je na celični liniji THP-1 povzročila trend večanja koncentracije MDA v primerjavi s kontrolo, kateri je še bolj izrazit na celicah HepG<sub>2</sub>.
- Primerjava rezultatov poskusov meritev ROS v celicah in MDA v celičnih lizatih je pokazala, da se le-ti dobro korelirajo.
- presnovkov v celičnih gojiščih nismo uspeli določiti, kljub temu pa obstaja možnost, da so le-ti v poskusih nastali, vendar so v večjih koncentracijah prisotni v celicah.

Za delo na celicah v prihodnje in ugotavljanje s strani PEU povzročene oksidativnega stresa, bi lahko povečali koncentracije presnovkov s povečanim številom celic ali podaljšali čas poskusov in tako omogočili celicam, da v večji

meri presnovijo učinkovine. Presnovke bi lahko merili v celicah in izboljšali občutljivost analiznih metod za določanje le-teh.

## 6. LITERATURA

1. Pečar S. Metabolizem učinkovin in radikali/Drug metabolism and the role of radicals. *Farmacevtski vestnik* 1991; 42: 69-78.
2. Primožič S. Farmakokinetični modeli jetrnega metabolizma zdravil/Pharmacokinetic models of liver drug metabolism. *Farmacevtski vestnik* 1991; 42: 135-151.
3. Mrhar A. Kemični in kinetični vidiki metabolizma zdravil/Chemical and kinetical aspects of drug metabolism. *Farmacevtski vestnik* 1991; 42: 121-134.
4. Ionescu C. and Caira M. R.: *Drug metabolism, Current Concepts*. Springer 2005.
5. Uetrecht J. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg 2010.
6. Permentier H. P, Bruins A. P and Bischoff R: *Electrochemistry-Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Protein Research. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2008, No: 8, 46-56.
7. Čarman-Kržan M. Vezava metabolitov na biološke makromolekule/Binding of metabolites to biological macromolecules. *Farmacevtski vestnik* 1991; 42: 105-113.
8. <http://en.wikipedia.org> (dostopno: avgust 2013).
9. Ribarič S. Temelji patološke fiziologije, druga izdaja. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2009: 19-24, 25-32, 237-251, 291-307.
10. Čulig J. Metabolične osnove medusobnog djelovanja lijekova/Metabolic basis of drug interactions. *Farmacevtski vestnik* 1991; 42: 315-320.
11. Osredkar J. Oksidativni stres/Oxidative stress. *Zdravniški vestnik*. 2012;81(5):393–406.
12. Halliwell B and Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*, 4<sup>th</sup> edition. Oxford University Press 2007: 21-23, 79-121, 187-260, 488-613.

13. Devi PU, Manocha A and Vohora D: Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert Opinion in Pharmacotherapy* 2008, 9(18): 3169-3177.
14. Vitte J, Michel BF, Bongrand P, and Gastaut JL: Oxidative stress level in circulating neutrophils in linked to neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Immunology* 2004, Vol. 24, No. 6: 683-692.
15. Kreft S., Pečar S. Vloga radikalov pri obolenjih/The role of radicals in diseases. *Farmaceutski vestnik* 1998; 49: 469-481.
16. Mateos R, Bravo L: Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci* 2007; 30: 175-191.
17. Bresjanac M, Bunc M, Črne-Finderle N, Grubič Z, Kamarič L, Kordaš M, Pavlin R, Ribarič S, Sket D, Sketelj J, Šuput D, Zorec R, Živin M: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9. izdaja, Univerza v Ljubljani: Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2003: 16-36.
18. Bajrovic F. in sodelavci: Seminarji iz patološke fiziologije, prva izdaja. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2008: 25-32, 291-308.
19. Fisher RS, Boas WE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, and Engel JJ: Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005, 46(4): 470-472.
20. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*. 2010;88(1):23–45.
21. Brodie MJ: Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* 2010, 19: 650-655.
22. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: *Rand and Dale's Pharmacology*, 6<sup>th</sup> edition. Elsevier limited 2007: 575-587.

- 
23. Aycicek A, Iscan A: The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. *European Neurology*, 2007; 57: 65-69.
24. Zgonc V, Čebular B. Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Farmaceutski vestnik*. 2006;75:379–88.
25. Higuchi S., Yano A., Takai S., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M. and Yokoi T: Metabolic Activation and Inflammation Reactions Involved in Carbamazepine-Induced Liver Injury. *Toxicological sciences* 2012; 130(1): 4-16.
26. Lu W and Uetrecht J.P: Peroxidase-Mediated Bioactivation of Hydroxylated Metabolites of Carbamazepine and Phenytoin. *DDT* 2008; 36: 1624-1636.
27. 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.
28. Čebular B, Zgonc V: Posebnosti zdravljenja epilepsije pri starejših. *Zdravniški vestnik*, 2007; 76: 473-479.
29. Santos NAG, Medina WSG, Martins NM, Carvalho Rodrigues MA, Curti C, Santos AC: Involvement of oxidative stress in the hepatotoxicity induced by aromatic antiepileptic drugs. *Toxicology in Vitro*, 2008; 22: 1820-1824.
30. Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T: Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci.*, 2012; 130(1): 4-16.
31. Wyllie E., Gupta A., Lachhwani D. K: *The Treatment of Epilepsy: Principles & Practice*, Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2006: 775, 779.
32. Aschenbrenner D. S., Venable S. J.: *Drug therapy in nursing*, Third Edition. Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009: 341.

- 
33. Wheless J. W., Willmore L. J., Brumback R. A.: *Advanced Therapy in Epilepsy*. People's Medical Publishing House, Shelton, USA, 2009: 343 - 344, 346 -347.
34. Panayiotopoulos C. P.: *A Clinical Guide to Epileptic Syndromes and their Treatment, Second Edition*. Based on the ILAE classifications and practice parameter guidelines. Springer Healthcare Ltd, United Kingdom, 2010: 606, 608.
35. Browne T. R., Holmes G. L.: *Handbook of Epilepsy, Fourth Edition*. Lippincott Williams & Wilkins-a Wolters Kluwer business, Philadelphia, USA, 2008: 216-217.
36. [http://en.wikipedia.org/wiki/MTT\\_assay#cite\\_note-pmid6606682-2](http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay#cite_note-pmid6606682-2) (dostop 20.03.2014).
37. *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.
38. Čvan M. *VPLIV PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN NA OKSIDATIVNI STRES V CELIČNI LINIJI LIMFOCITOV B*, Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.
39. 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.
40. Titan A. *Določanje malondialdehida v plazmi konj z derivatizacijskimi metodami in tekočonsko kromatografijo*, Diplomska naloga.
41. Ramšak J. *Diploma v delu*, 2014.
42. 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.
43. Marini H, Costa C, Passaniti M, Esposito M, Campo GM, Ientile R, Adamo EB, Marini R, Calabresi P, Altavilla D, Minutoli L, Pisani F, Squadrito F: Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sciences* 2004, 74: 1253-1264.

44. Robnik B. VREDNOTENJE OZNAČEVALCEV OKSIDATIVNEGA STRESA V CELICAH PODVRŽENIM PROTIEPILEPTIČNIM UČINKOVINAM, Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.
45. Pavone A, Cardile V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 1:34–9.
46. Cardile V, Pavone A, Renis M, Maci T and Perciavalle V: Effects of gabapentin and topiramate in primary rat astrocyte cultures. *Neuroreport* 2001, Vol. 12, No. 8: 1705-1708.
47. Pahuja M, Kleekal T, Reeta KH, Tripathi M, Gupta YK: Interaction profile of *Zizyphus jujuba* with phenytoin, phenobarbitone, and carbamazepine in maximal electroshock-induced seizures in rats. *Epilepsy Behav.*, 2012; 25(3): 368-73.
48. Menon B, Ramalingam K, Kumar RV: Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. *Seizure*, 2012; 21(10): 780-4.
49. Verotti A, Basciani F, Trotta D, Pomilio MP, Morgese G, Chiarelli F: Serum copper, zinc, selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in epileptic children before and after 1 year of sodium valproate and carbamazepine therapy. *Epilepsy Res.*, 2002; 48(1-2): 71-5.
50. 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.
51. Yuksel A, Cengiz M, Seven M, Ulutin T. Changes in the antioxidant system in epileptic children receiving antiepileptic drugs: two year prospective studies. *J Child Neurol* 2001;16:603–6.
52. Michoulas A, Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS, Farrell K. Oxidative stress in children receiving valproic acid. *J Pediatr* 2006;149:692–6.
53. Cengiz M, Yuksel A, Seven M. The effects of carbamazepine and VPA on the erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children. *Pharmacol Res* 2000;41:423–5.