

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA FRANKO  
**MAGISTRSKA NALOGA**  
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

LJUBLJANA, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA FRANKO

**PROUČEVANJE VPLIVA PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN PRVE IN  
DRUGE GENERACIJE NA NASTANEK OKSIDATIVNEGA STRESA NA  
CELICAH THP-1**

**THE INFLUENCE OF THE FIRST AND SECOND GENERATION  
ANTIEPILEPTIC DRUGS ON OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT IN THP-1  
CELLS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

LJUBLJANA, 2015

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

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se svojemu mentorju izr. prof. dr. Tomažu Vovku, mag. farm. in somentorici asist. dr. Martini Gobec, mag. farm. za usmerjanje, spodbudo in čas, ki sta mi ga namenila tekom izdelave magistrske naloge.*

*Iskrena hvala izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. in doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm., ki sta mi izvedla analize na LC-MS/MS. Za vse praktične nasvete pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Margareti Cof, ing. kem. in Nevenki Lilik, ing. kem. ter vsem ostalim zaposlenim na katedri za Biofarmacijo in farmakokinetiko ter na katedri za Klinično biokemijo, ki so mi pomagali pri izdelavi magistrske naloge. Hvala Tijani Markovič, mag. farm., ki me je naučila dela s celicami.*

*Svoji družini se zahvaljujem za spodbudo in potrpežljivost tekom študija. Anže, Maja in Lana, hvala za vse lepe trenutke. Študijska leta mi bodo ostala v čudovitem spominu, zahvaljujoč kolegom in prijateljem, ki so mi vedno stali ob strani. Hvala Jerneju, ki nikoli ne neha verjeti vame.*

*~Ne pustite, da vas učenje vodi le v znanje, naj vas vodi v dejanja.~*

*-Jim Rohn*

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

Nina Franko

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

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

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>I</b>
<b>POVZETEK</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>VI</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. O EPILEPSIJI</b>	<b>1</b>
<b>1.2. PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE</b>	<b>2</b>
1.2.1. VALPROJSKA KISLINA	4
1.2.2. KARBAMAZEPIN	5
1.2.3. TOPIRAMAT	6
1.2.4. LEVETIRACETAM	7
1.2.5. PREGABALIN	8
<b>1.3. OKSIDATIVNI STRES</b>	<b>8</b>
1.3.1. REAKTIVNE ZVRSTI	8
1.3.2. OBRAMBNI MEHANIZMI	9
1.3.3. OKSIDATIVNE POŠKODBE BIOLOŠKIH MAKROMOLEKUL	10
1.3.4. OKSIDATIVNI STRES IN EPILEPSIJA	12
<b>1.4. MODELI ZA PROUČEVANJE VPLIVA PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN NA NASTANEK OKSIDATIVNEGA STRESA</b>	<b>13</b>
1.4.1. CELIČNI MODELI	13
1.4.2. ŽIVALSKI MODELI	13
1.4.3. KLINIČNE RAZISKAVE	14
<b>2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b>	<b>17</b>
<b>3.1. MATERIALI</b>	<b>17</b>
<b>3.2. METODE</b>	<b>21</b>
3.2.1. DELO S CELICAMI THP-1 IN HEP-G2	21
3.2.2. PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN UČINKOVIN	22
3.2.3. KRATKOTRAJNA IZPOSTAVLJENOST	22
3.2.3.1. DOLOČANJE MAKSIMALNE NECITOTOKSIČNE KONCENTRACIJE PEU S TESTOM MTS NA CELICAH THP-1	22

3.2.3.2.	DOLOČANJE ROS S PRETOČNO CITOMETRIJO V CELICAH THP-1 PO KRATKOTRAJNI IZPOSTAVITVI PEU _____	24
3.2.3.3.	TRETIRANJE CELIC ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV IN KAZALNIKOV OKSIDATIVNIH POŠKODB _____	25
3.2.3.4.	NEENCIMSKI ANTIOKSIDANT GLUTATION _____	25
3.2.3.5.	ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI _____	27
3.2.3.5.1.	KATALAZA _____	27
3.2.3.5.2.	SUPEROKSID DISMUTAZA _____	29
3.2.3.6.	KAZALNIK OKSIDATIVNEGA STRESA: MALONDIALDEHID _____	30
3.2.3.7.	DOLOČANJE PROTEINOV _____	34
3.2.4.	DOLGOTRAJNA IZPOSTAVLJENOST _____	34
3.2.4.1.	DOLOČANJE ROS S PRETOČNO CITOMETRIJO V CELICAH THP-1 PO TRETIRANJU S PEU _____	34
3.2.4.2.	KAZALNIK LIPIDNE PEROKSIDACIJE MALONDIALDEHID _____	35
3.2.5.	VPLIV METABOLITOV _____	36
3.2.5.1.	DOLOČANJE MAKSIMALNE NECITOTOKSIČNE KONCENTRACIJE PEU S TESTOM MTS NA CELICAH HEP-G2 _____	36
3.2.5.2.	DOLOČANJE ROS V CELICAH THP-1 S PRETOČNO CITOMETRIJO PO TRETIRANJU Z METABOLITI PEU _____	36
<b>3.2.6.</b>	<b>OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA _____</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA _____</b>	<b>39</b>
<b>4.1.</b>	<b>KRATKOTRAJNA IZPOSTAVLJENOST _____</b>	<b>39</b>
4.1.1.	TEST METABOLNE AKTIVNOSTI MTS _____	39
4.1.2.	REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI _____	41
4.1.3.	NEENCIMSKI ANTIOKSIDANT GLUTATION _____	43
4.1.4.	ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI _____	44
4.1.4.1.	KATALAZA _____	44
4.1.4.2.	SUPEROKSID DISMUTAZA _____	45
4.1.5.	KAZALNIK LIPIDNE PEROKSIDACIJE MALONDIALDEHID _____	47
<b>4.2.</b>	<b>DOLGOTRAJNA IZPOSTAVLJENOST _____</b>	<b>48</b>
4.2.1.	REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI _____	48
4.2.2.	KAZALNIK LIPIDNE PEROKSIDACIJE: MALONDIALDEHID _____	50
<b>4.3.</b>	<b>VPLIV METABOLITOV _____</b>	<b>51</b>
4.3.1.	DOLOČANJE MAKSIMALNE NECITOTOKSIČNE KONCENTRACIJE PEU S TESTOM MTS NA CELICAH HEP-G2 _____	51
4.3.2.	DOLOČANJE ROS V CELICAH THP-1 S PRETOČNO CITOMETRIJO PO TRETIRANJU Z METABOLITI PEU _____	53

5.	<i>SKLEP</i>	54
6.	<i>VIRI IN LITERATURA</i>	56

## POVZETEK

Oksidativni stres je eden izmed dejavnikov, ki lahko pripeljejo do razvoja pogoste nevrološke motnje, epilepsije. Dandanes za zdravljenje te bolezni obstaja veliko protiepileptičnih učinkovin (PEU), vendar v ospredje stopa skrb, da te učinkovine same pozročajo oksidativni stres, kar bi lahko privedlo do poslabšanja bolnikovega stanja. V magistrski nalogi smo ovrednotili vpliv PEU prve (valprojska kislina, karbamazepin) in druge generacije (topiramata, levetiracetam, pregabalin) ter njihovih kombinacij na nastanek oksidativnega stresa na monocitni celični liniji THP-1. Sprva smo celice za kratek čas izpostavili visokim koncentracijam PEU in nato v njih pomerili koncentracijo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), encimskih (katalaza, superoksid dismutaza) in neencimskih (glutathion) antioksidantov ter kazalnika lipidne peroksidacije (malondialdehid). Rezultati so pokazali, da PEU prve generacije stimulirata nastanek oksidativnega stresa, saj je valprojska kislina znatno povišala koncentracijo ROS in kazalnikov lipidne peroksidacije v celicah ter enako kot karbamazepin vsaj delno znižala razmerje med reducirano in oksidirano obliko glutathiona, kar je značilen pojav za oksidativni stres. Dodatek PEU druge generacije k učinkovini prve generacije je omilil znake oksidativnega stresa. Izpostavljenost celic PEU prve in druge generacije je vplivala na aktivnosti encimskih antioksidantov. Ker pa celice v telesu niso le nekaj ur izpostavljene visokim koncentracijam PEU, ampak so kronično izpostavljene precej nižjim, terapevtskim koncentracijam, ni nujno, da dobljeni rezultati pravilno predstavljajo situacijo *in vivo*. Da bi se približali situaciji v telesu, smo celice za en teden izpostavili terapevtskim koncentracijam PEU in ugotovili, da v tem primeru ni prišlo do povišanja koncentracije ROS, nakazal pa se je trend povečane lipidne peroksidacije. Na podlagi rezultatov prejšnjih študij smo želeli ovrednotiti tudi vpliv metabolitov PEU na nastanek oksidativnega stresa. PEU smo inkubirali na metabolno aktivnih celicah Hep-G2, nato pa medij, za katerega smo predpostavili, da vsebuje metabolite PEU, prenesli na celice THP-1. Pri tem njih ni prišlo do povišanja koncentracije ROS v celicah THP-1.

Ključne besede: *protiepileptične učinkovine, prva generacija, druga generacija, oksidativni stres, obramba pred reaktivnimi zvrstmi*

## ABSTRACT

Oxidative stress is one of many factors that can lead to development of common neurological disorder named epilepsy. Nowadays there are many antiepileptic drugs (AED) available. However, it has been assumed that AEDs themselves may cause oxidative stress and therefore impair patients' health. In our study we evaluated the influence of the first (valproic acid, carbamazepine) and second generation AEDs (topiramate, levetiracetam, pregabalin) on oxidative stress development in monocite cell line THP-1. Firstly, we exposed the cells to high concentrations of AEDs for a short time and after the incubation measured levels of reactive oxygen species (ROS), enzymatic (catalase, superoxide dismutase) and nonenzymatic antioxidants (glutathione) and marker of lipid peroxidation (malondialdehyde) in the exposed cells. Our results showed that first generation AEDs stimulate oxidative stress development. Valproic acid upregulated production of ROS and malondialdehyde and decreased ratio between reduced and oxidized form of glutathione. The latter phenomenon was also observed after exposure of cells to carbamazepine. If we used first generation AED in combination with second generation AED, oxidative stress signs were less severe. Exposure of cells to any AED changed the activity of enzymatic antioxidants. However, cells in human body are not exposed to such high concentrations of AEDs for a short time, they are chronically exposed to much lower, therapeutic concentrations and therefore it is not necessary that our initial results correctly represent in vivo situation. To get a step closer to in vivo situation, we exposed cells to therapeutic concentrations of AEDs for one week which led to upregulated production of malondialdehyde, while ROS levels were not increased. Previous studies have shown that oxidative stress might be a consequence of AEDs' metabolites' actions. To test this, we exposed metabolically active Hep-G2 cells to AEDs and assumed that cells will excrete AEDs' metabolites to their medium. Treatment of THP-1 cells with medium from Hep-G2 cells did not result in higher ROS production.

*Key words: antiepileptic drugs, first generation, second generation, oxidative stress, defense against reactive species*



## SEZNAM OKRAJŠAV

8-oksoG	8-okso-7,8-dihidrogvanin
AMPA	hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat
ATP	adenozin trifosfat
CAT	katalaza
CBZ	karbamazepin
DCF	2',7'-diklorofluorescein
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EPSP	ekscitatorni postsinaptični potencial
ESI	elektrozaprševalna ionizacija (ang. electrospray ionization)
FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
GABA	gaba-aminomaslena kislina
GAERS	genetic absence epilepsy rats from Strasbourg
GEPR	genetically epilepsy-prone rats
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	reducirani glutation
GSSG	glutation disulfid
H <sub>2</sub> DCFDA	barvilo 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Pressure Liquid Chromatography)
I.N.T.	(2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenltetrazolijev klorid)
IPSP	inhibitorni postsinaptični potencial
KA	kainska kislina

KAR	kainatni receptor
LAF	laminarni pretok zraka (ang. Laminar air flow)
LC	tekočinska kromatografija
LC-	
MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LEV	levetiracetam
MDA	malondialdehid
MF	mobilna faza
MIF	migracijski inhibitorni faktor (3-(4,2-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-
MTS	tetrazol
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
NMDA	N-metil-D-aspartat
PBS	fosfatni fufer
PEU	protiepileptična učinkovina
PMK	polinenasičene maščobne kisline
PREG	pregabalin
PTZ	pentilentetrazol
R-M	
ANOVA	(angl Repeated Measures ANOVA)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (ang. Reactive Nitrogen Species)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species)
RPM	obratov na minuto
SD	standardni odklon
SER	the spontaneously epileptic rat
SOD	superoksid dismutaza
tbH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	terc butil peroksid
TCA	trikloroacetna kislina

TMT	trimetiltin
TOP	topiramat
UV	ultravijolična svetloba
VPA	valprojska kislina

# 1. UVOD

## 1.1. O EPILEPSIJI

Epilepsija je pogosta nevrološka motnja, za katero trpi med 40 in 65 milijonov ljudi (1, 2). Pojavi se lahko kadarkoli v življenju, incidenca pa je najvišja pri otrocih pred petim letom in pri starostnikih po 65. letu starosti. Gre za stanje, za katerega je značilna nagnjenost k epileptičnim napadom, ti pa so posledica sinhroniziranih abnormalnih električnih impulzov v cerebralnih nevronih (1, 3). Pojavijo se v določenem delu možganov in lahko ostanejo lokalizirani na tem mestu (žariščni napadi) ali pa se razširijo v preostale dele možganov (generalizirani napadi). Glede na mesto nastanka in obseg prizadetosti možganov se razlikujejo tudi klinične slike epileptičnih napadov (4). Njihova razdelitev in kratek opis napadov so podani v preglednici I:

**Preglednica I. Razvrščanje epileptičnih napadov in njihove lastnosti (5, 6).**

GENERALIZIRANI NAPADI	
absenca	nekajsekundna izguba zavesti, blagi krči na predelu vek, čela, očesnih zrkel
mioklonični	sunkoviti krči kjerkoli v telesu, ki trajajo največ eno sekundo
atonični	mišični tonus popusti za nekaj sekund, napad spremlja izguba zavesti
tonični	telo za 10-20 sekund otrpne in bolnik pade, dihanje se ustavi, na ustih se pojavi pena
klonični	ponavljajoči ritmični krči telesa po udih ali celotnem telesu, običajno traja do dve minuti
tonično - klonični	toničnemu napadu sledi klonični
DELNI NAPADI	
navadni	bolnik zazna nenavaden občutek, npr. okus, strah, mravljinčenje

zapleteni pride do motnje zavesti, bolnik počne nesmiselne stvari, kot je npr. cmokanje, nesmiselno se odzove na dražljaje iz okolice

---

sekundarno generalizirani

---

Vzroki za pojav epilepsije so številni. V grobem glede na vzrok nastanka epilepsije razdelimo v idiopatske in simptomatske. Vzroki za idiopatske epilepsije so lahko mitohondrijske motnje, motnje v delovanju ionskih kanalčkov, napake v razvoju centralnega živčnega sistema ali genetski vzroki. Simptomatske epilepsije so tiste, ki so posledica predhodnih poškodb možganov, kot so tumorji, možganske kapi ali travmatske poškodbe. Za fazo poškodbe sledi epileptogeneza, ki pripelje do kronične epilepsije. Gre za dolgotrajen proces, ki lahko traja tudi več desetletij. Natančen potek epileptogeneze še ni znan, predvidevajo pa, da privede do smrti nevrona, ki je vzrok za nastop epileptičnega napada. Vse bolj pa v ospredje stopa povezava med oksidativnim stresom in epilepsijo – povečana koncentracija reaktivnih zvrsti namreč lahko poškoduje nevrone in povzroči nastanek epilepsije (1).

## 1.2. PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE

Učinkovine, ki jih uporabljamo za zdravljenje epilepsije, delujejo tako, da vrnejo vzbunjene, depolarizirane nevrone, v polarizirano, nevzbunjeno stanje. Za razumevanje njihovega delovanja je potrebno osnovno poznavanje vzburjenja nevronov. Membrana nevronske celice je nabita. Zunaj celice se namreč nahaja več natrijevih in kloridnih ionov, v celici pa so številnejši kalijevi ioni, organski kationi in nabiti proteini. Ker je celična membrana prepustna le za manjše ione, večji ioni in proteini ostajajo vsak na svoji strani celične membrane in posledično je napetost na membrani znotraj celice za 50 do 80 mV manjša od napetosti na zunanji strani. Temu pravimo mirovni membranski potencial in v takem stanju je celica polarizirana. Z odprtjem napetostno odvisnih ionskih kanalčkov pa je omogočen vdor natrijevih ionov iz ekstracelularnega prostora v celico. Posledično napetost celične membrane naraste na -40 mV, s čimer je dosežen akcijski potencial in celica se vzburi. Akcijski potencial se preko sinaps prenese na sosednje celice, ki se posledično vzburijo. Glede na način prenosa akcijskega potenciala med celicami ločimo električne in kemične sinapse. Električne sinapse prenašajo akcijski potencial

elektrotonično preko koneksojskih kanalčkov, pri kemičnih pa prenos posreduje kemični neurotransmitter. Za kemični način prenosa akcijskega potenciala je značilno, da ko se presinaptična celica depolarizira, vanjo zaradi povečane prepustnosti vdrejo kalcijevi ioni, kar povzroči sproščanje neurotransmiterjev v sinaptično špranjo. Ti nato difundirajo do postinaptične celice, se nanjo vežejo in na njej povzročijo določene postinaptične učinke. V kolikor je presinaptična celica sprostil ekscitatorni neurotransmitter (npr. glutamat), bo prišlo do ekscitatornega postsinaptičnega potenciala (EPSP) in postsinaptična celica se bo zaradi vdora natrijevih ionov vzburla. Če pa je presinaptična celica sprostil inhibitorni neurotransmitter (npr. gama-aminomaslena kislina oz. GABA ali glicin), bo prišlo do inhibitornega postsinaptičnega potenciala (IPSP). To pomeni, da se bo postsinaptična celica hiperpolarizirala zaradi vdora kloridnih ionov in posledično padca napetosti na notranji strani celične membrane. Do EPSP oz. IPSP pa lahko pride le, če postsinaptični nevron prejme več zaporednih neurotransmiterjev iz enega presinaptičnega nevrona ali manj neurotransmiterjev iz več presinaptičnih nevronov hkrati. V primeru, da nevrnska celica hkrati prejme ekscitatorne in inhibitorne neurotransmiterje, se njihovi učinki medsebitno seštevajo in posledično izničijo (7, 8, 9).

Glede na mehanizem delovanja protiepileptične učinkovine (PEU) razdelimo v dve skupini. V prvo skupino spadajo **učinkovine, ki delujejo na ionske kanalčke**. Najpomembnejši kanalčki, ki vplivajo na vzburljenje nevrona, so napetostno odvisni natrijevi kanalčki. Ti omogočajo depolarizacijo nevronov tako, da se odprejo in v celico spustijo natrijeve ione. Membranski potencial s tem pade na približno -40 mV in prag za akcijski potencial je dosežen. Med depolarizacijo so kanalčki v odprtem, neaktivnem stanju in v tem trenutku imajo največjo afiniteto za vezavo protiepileptičnih učinkovin. Po vezavi učinkovin nanje se stabilizirajo in ne preidejo več v odprto stanje. S tem je preprečen nadaljnji vdor natrijevih ionov in depolarizacija membrane (4, 7, 10). Nekatere učinkovine blokirajo kalcijeve kanalčke in s tem preprečijo vdor  $\text{Ca}^{2+}$  in sproščanje neurotransmiterjev (11).

Glede na mehanizem delovanja v drugo skupino spadajo **učinkovine, ki vplivajo na neurotransmiterje**. Glavni inhibitorni prenašalec je GABA in protiepileptične učinkovine njegovo delovanje okrepijo z aktivacijo GABA receptorjev, inhibirajo encim GABA transaminazo in inhibirajo prevzem GABA v nevrone (4). Glavni ekscitatorni neurotransmitter pa je glutamat in protiepileptične učinkovine blokirajo njegove receptorje,

kot so N-metil-D-aspartat (NMDA), hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat (AMPA) in kainatni receptor (KAR) (7).

Mejnik sodobnega zdravljenja epilepsije postavlja leto 1857, ko so jo začeli uspešno zdraviti s kalijevim bromidom, danes pa je na trgu veliko PEU. Glede na čas odkritja jih razdelimo v tri generacije:

1. generacija: kalijev bromid, fenobarbital, fenitoin, primidon, etosukcimid, karbamazepin, valprojska kislina, benzodiazepini (11)
2. generacija: felbamat, gabapentin, lamotrigin, topiramat, okskarbazepin, tiagabin, zonisamid, pregabalin (7, 12)
3. generacija: brivaracetam, karabersat, karisbamat, eslikarbazepin acetat, fluorofelbamat, fosfenitoin, ganaksolon, lakosamid, losigamon, remacemid hidroklorid, retigabin, rufinamid, safinamid, seletracetam, soretolid, stiripentol, talampanel, valrocemid (13).

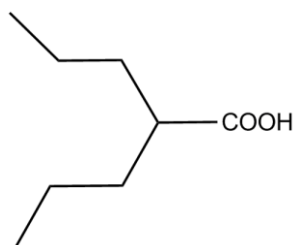
Zdravljenje epilepsije z zdravili je razmeroma uspešno. Pri dobri polovici bolnikov lahko napade preprečimo z monoterapijo, če pa ta ni učinkovita, poskusimo zdraviti s kombinacijo dveh ali več PEU. Politerapija je učinkovita pri približno 20 % bolnikov. Pri politerapiji se pojavlja problem farmakokinetičnih interakcij, sploh če je vsaj ena učinkovina iz prve generacije. Tako lahko pride do spremembe obsega biotransformacije ali spremembe pri vezavi na plazemske proteine (7). Kljub številnim PEU še vedno ostaja približno 30 % bolnikov, ki so nanje rezistentni (11). Pri teh lahko poskušamo epilepsijo zdraviti operativno, s ketogeno dieto, uživanjem vitamina B6 in nekaterimi drugimi nefarmakološkimi metodami (14).

V naslednjih podpoglavjih so opisane PEU, ki smo jih uporabili v sklopu magistrske naloge.

### *1.2.1. VALPROJSKA KISLINA*

Valprojska kislina (VPA; slika 1) se uporablja za zdravljenje različnih vrst epilepsije, poleg tega pa tudi za preprečevanje migrenskih glavobolov, zdravljenje bipolarnе motnje in nevropatske bolečine, v kombinaciji s protitumornimi zdravili za zdravljenje več vrst raka, izkazuje pa tudi nevroprotektivno delovanje pri pacientih z Alzheimerjevo boleznijo. Pri zdravljenju epilepsije se lahko uporablja v mono- ali politerapiji, pri čemer se največkrat kombinira s karbamazepinom, topiramatom, fenitoinom in lamotriginom (15, 16). VPA poveča inhibični učinek GABA (inhibicija GABA-transaminaze, zmanjševanje privzema GABA) in blokira napetostno odvisne natrijeve in kalcijeve kanalčke. Za

aplikacijo je na voljo v obliki peroralnih, intravenskih in rektalnih farmacevtskih oblikah. Njena absorpcija iz gastrointestinalnega trakta je hitra in popolna, maksimalna koncentracija učinkovine v plazmi pa je dosežena približno štiri ure po zaužitju tablete. 90 % učinkovine je v plazmi vezane na proteine, predvsem na albumin, ki ima zanjo dve vezavni mesti. Biološka razpolovna doba VPA je pri odraslih 12 h, 85 % zaužite učinkovine pa se izloči preko urina v obliki enega izmed številnih metabolitov. Metabolizem VPA poteka predvsem v jetrih preko glukoronidacije,  $\beta$ -oksidacije v mitohondrijih in preko encimov superdružine CYP450. Glavni aktivni metabolit je (E)-2-en valproat, ki je verjetno hepatotoksičen in s tem odgovoren za enega najpogostejših neželenih učinkov VPA (7, 17). Med najpogostejše neželene učinke spadajo tudi anoreksija, slabost, bruhanje, nepravilnosti pri strjevanju krvi, ascites, hipoglikemija ipd (15). Ker je valproat tako kot nekatere druge protiepileptične učinkovine substrat za jetrna encima CYP2C19 in CYP2C9, stopa z njimi v interakcije – zvišuje plazemske koncentracije lamotrigina, karbamazepina in fenobarbitala ter prosto frakcijo fenitoina., Medtem ko fenitoin, fenobarbital in karbamazepin znižujejo plazemske koncentracije valproata, pa jih felbamat zvišuje (7). VPA je šibka kislina s pKa 4,7 in je pri fiziološkem pH popolnoma ionizirana. V vodi je netopna, medtem ko je v obliki natrijeve soli v vodi topna in zelo higroskopska (7, 16). Terapevtske koncentracije VPA so med 346 in 693  $\mu\text{mol/L}$  (18).



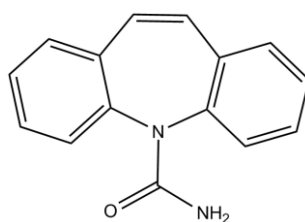
Slika 1. Valprojska kislina.

### 1.2.2. KARBAMAZEPIN

Zaradi varnosti in učinkovitosti je karbamazepin (CBZ) pogosto učinkovina prvega izbora za zdravljenje zapletenih delnih, tonično-kloničnih in mešanih epileptičnih napadov. Poleg tega je odobren za zdravljenje bipolarni motnje in trigeminalne neuralgije, vendar lahko poslabša stanje pri juvenilni mioklonični epilepsiji (7, 16). Njegova strukturna formula je predstavljena na sliki 2. Epileptični napad prepreči tako, da z vezavo na natrijeve kanalčke prepreči širjenje nenormalnih električnih impulzov v nevronih, njegove terapevtske koncentracije pa so med 17 in 51  $\mu\text{mol/L}$  (7, 18). Po peroralni aplikaciji je njegova



absorpcija počasna, biološka uporabnost pa je med 75 in 85 %. V plazmi je večinoma vezan na proteine, predvsem na albumin in  $\alpha$ 1-kisli glikoprotein. CBZ v veliki meri zapade metabolizmu in le 2 % peroralnega odmerka se v urin izloči v nespremenjeni obliki (18). Najpogostejša metabolična pot je oksidacija, ki CBZ pretvori v farmakološko aktiven CBZ-10-11-epoksid, ki pa je bolj toksičen kot CBZ. CBZ-10-11-epoksid je nadalje podvržen hidrolizi, ki ga pretvori v neaktiven CBZ-diol. Druga pomembna metabolična pot predstavlja hidrosilacije CBZ, s katerimi se pretvori v 2-OH-CBZ ali 3-OH-CBZ, ki se nadalje hidrolizira v iminostilben in oksidira v iminokinon. Med pomembnejše metabolične poti uvrščamo tudi pretvorbo CBZ v iminostilben (19). Pogostejši neželeni učinki CBZ so zamegljen vid, omotica, zaspanost, depresija, hiponatriemija ipd. Redko se pojavijo tudi preobčutljivostne reakcije. Ker se metabolizira preko istih encimov kot nekatere druge PEU, je potrebna previdnost pri politerapiji – CBZ poviša koncentracije fenitoina in zniža koncentracije felbamata, lamotrigina, valproata in zonisamida. Prav tako nanj vplivajo druge PEU – njegove koncentracije v plazmi zvišujeta verapamil in cimetidin, znižujejo pa jih fenobarbital, fenitoin, felbamat in primidon (7).

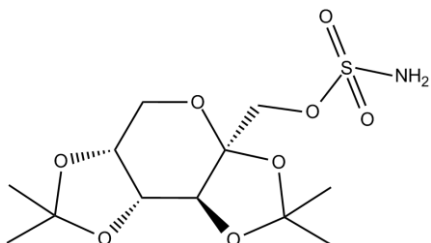


**Slika 2. Karbamazepin.**

### 1.2.3. TOPIRAMAT

Topiramate (TOP, slika 3) se uporablja za zdravljenje različnih vrst epilepsij, predvsem pri delnih ali tonično-kloničnih napadih. K njegovi širokospektralni učinkovitosti pripomore raznovrsten način delovanja - blokira natrijeve kanalčke, spodbuja odziv  $GABA_A$  receptorja in antagonistično deluje na glutamatna receptorja AMPA in KAR (7, 11). Po peroralni aplikaciji se hitro absorbira. Njegova biološka uporabnost je visoka, med 81 in 90 %. Na plazemske proteine se veže le okoli 15 % odmerka. TOP izkazuje linearno farmakokinetiko, torej je odnos med odmerkom in serumsko koncentracijo linearen. Večina odmerka se izloči preko ledvic v nespremenjeni obliki, kar pomeni, da le v

majhnem deležu zapade metabolizmu. Njegove terapevtske koncentracije so med 15 in 59  $\mu\text{mol/L}$  (7, 18). Najpogostejši neželeni učinki, ki jih povzroči TOP, so zaspanost, omotica, glavkom, motnje koncentracije, spomina in govora ter zmedenost (7). Zaradi teratogenosti ga ne smejo uživati ženske v rodni dobi (4). TOP se uporablja tudi v politerapiji, pri čemer lahko stopa v interakcije z učinkovinami, ki se presnavljajo z istimi encimi (18).

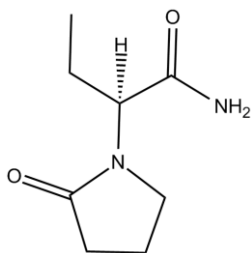


**Slika 3. Topiramat.**

#### 1.2.4. LEVETIRACETAM

Levetiracetam (LEV) je učinkovit pri zdravljenju tako žariščnih kot generaliziranih napadov (20). Njegov mehanizem delovanja je povsem drugačen kot pri ostalih protiepileptičnih učinkovinah. LEV se namreč veže na glikoprotein SV2A, ki je povezan z membrano sinaptičnih veziklov. Kako točno s tem prepreči nastanek epileptičnega napada, še ni pojasnjeno, predpostavljajo pa, da s tem vpliva na kalcijeve kanalčke in odziv GABA<sub>A</sub> receptorja (7, 11, 21, 23).

LEV (slika 4), čigar terapevtske koncentracije so med 70 in 270  $\mu\text{mol/L}$ , se hitro in skoraj popolnoma absorbira iz gastrointestinalnega trakta. V serumu se ne veže na proteine. Glavna pot eliminacije poteka skozi ledvica in v urin se v nemetabolizirani obliki izloči približno 66 % odmerka. Prisotni metaboliti so neaktivni, nastanejo pa s hidrolizo v krvi in tkivih. Ker se LEV ne metabolizira preko jetrnih encimov in se ne veže na proteine, tudi ne stopa v interakcije z drugimi PEU (18). Neželeni učinki LEV so redki, lahko se pojavijo zaspanost, omotica, motnje vedenja, glavobol in hujšanje (20).

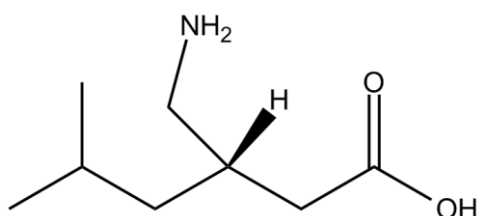


**Slika 4. Levetiracetam.**

### 1.2.5. PREGABALIN

Pregabalin (PREG; slika 5) se uporablja za zdravljenje epilepsije z žariščnimi napadi, nevropatske bolečine in kot anksiolitik (20). Epileptične napade preprečuje z vezavo na kalcijeve kanalčke. Kljub temu da je strukturno podoben GABA, ne deluje na GABA receptorje in ne vpliva na privzem ali razgradnjo GABA (13).

Po peroralni aplikaciji se hitro absorbira in njegova biološka uporabnost je okoli 90 %. V serumu se ne veže na proteine. Večinoma se izloča preko ledvica v nespremenjeni obliki. Ker se ne metabolizira in se ne veže na serumske proteine, ne stopa v interakcije z drugimi PEU. Terapevtske koncentracije PREG so med 5,4 in 89,2  $\mu\text{mol/L}$  (18). PREG redko povzroči neželene učinke, ti pa so lahko omotica, zaspanost, povečanje telesne teže, ataksija, edemi in erektilna disfunkcija.



Slika 5 Pregabalin.

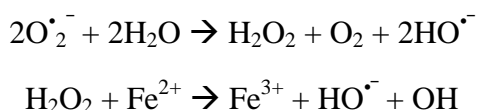
## 1.3. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je neravnotežje med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno obrambo, pomaknjeno v korist oksidantov. Lahko je posledica znižanega nivoja antioksidantov ali povečane tvorbe reaktivnih zvrsti. Zvišana koncentracija reaktivnih zvrsti poruši fiziološko delovanje celice, poškoduje celične proteine, lipide in nukleinske kisline. S tem je oksidativni stres vključen v patogenezo raka, kardiovaskularnih in nevrodegenerativnih bolezni, revmatoidnega artritisa, diabetesa ter pri staranju (22, 23, 24).

### 1.3.1. REAKTIVNE ZVRSTI

Radikali so atomi ali molekule, ki imajo v svoji orbitali vsaj en nesparjen elektron. Ker so zelo reaktivni, imajo veliko tendenco k reagiranju z drugimi molekulami, katerim oddajo ali odvzamejo elektron in s tem dopolnijo svojo orbitalo (25). Radikale, ki so derivati kisika, uvrščamo med reaktivne kisikove zvrsti (ROS), vendar niso vsi ROS radikali. Mednje spada tudi npr.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ki nima nesparjenih elektronov orbitali, vendar je kemijsko precej bolj reaktiven kot molekularni kisik in ga zaradi tega uvrščamo med ROS (23, 22).

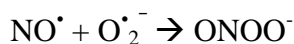
Večina ROS v evkariontskih celicah nastane v mitohondrijih tekom prenosa elektronov v procesu dihalne verige. Fiziološko je prenos elektronov sestavni del metabolizma, pri čemer se elektroni z NADH in FADH<sub>2</sub> prenesejo na O<sub>2</sub>, medtem pa se sprosti veliko energije, ki se lahko porabi za sintezo ATP (23, 26). Včasih se zgodi, da elektroni prehitro zapustijo verigo za transport elektronov in reagirajo z molekularnim kisikom, pri čemer nastane superoksidni radikal O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (23). Slednji hitro reagira z vodo in nastane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ta pa ob prisotnosti železovih (ali bakrovih) ionov tvori hidroksilni radikal HO<sup>•</sup>, ki je odgovoren za oksidacijo bioloških makromolekul (25, 27).



Med pomembnejše kisikove radikale štejemo še hidroperoksilni radikal HOO<sup>•</sup>, peroksilni radikal ROO<sup>•</sup> in alkoksilni radikal RO<sup>•</sup>. Neradikalni ROS pa so singletni kisik <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, ozon O<sub>3</sub>, peroksinitrit ONOO<sup>-</sup> in hipoklorna kislina HOCl (28).

ROS so v celici normalno prisotni in imajo številne fiziološke funkcije, npr. sodelujejo pri obrambi pred infektivni in pri celičnem signaliziranju. Škodljivi postanejo takrat, kadar njihova koncentracija naraste in jih obrambni mehanizmi ne zmorejo odstraniti (24).

Celične makromolekule poškodujejo tudi reaktivne dušikove zvrsti (RNS) in v tem primeru govorimo o nitrozativnem stresu. Dušikov oksid NO<sup>•</sup> nastaja v bioloških tkivih kot produkt reakcij, ki jih katalizira dušikov oksid sintaza (NO-sintaza). Fiziološko gledano ima NO<sup>•</sup> funkcijo pri nevrotransmisiji, uravnavanju krvnega tlaka, regulaciji imunskega odziva, relaksaciji gladkih mišic ipd., ko pa njegova koncentracija poraste, stopa v reakcije nitrozilacije, s katerimi poškoduje proteine. Reagira lahko tudi s superoksidnim radikalom O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, pri čemer nastane peroksinitritni anion ONOO<sup>-</sup>, ki oksidira lipide in fragmentira nukleinske kisline (24):



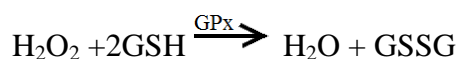
Med pomembnejše RNS uvrščamo še dušikov oksid NO<sup>•</sup>, dušikova oksida N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> dušikov dioksid N O<sub>2</sub><sup>•</sup>, nitrozil anion NO<sup>-</sup>, nitrozil kation NO<sup>+</sup> in alkilperoksinitrit ROONO (28).

### 1.3.2. OBRAMBNI MEHANIZMI

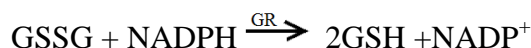
Zaradi izpostavljenosti organizma ROS so se razvili tudi obrambni mehanizmi, ki telo ščitijo pred oksidativnimi poškodbami in med njimi so najpomembnejši antioksidanti.

Glede na njihove lastnosti delovanja jih razdelimo na encimske in neencimske. Med neencimske spadajo vitamin C (askorbinska kislina), vitamin E (tokoferol), karatenoidi, polifenoli, sečna kislina, glutation in melatonin, med encimske pa superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza in glutation reduktaza (22, 24).

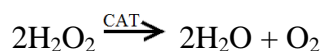
**Glutation (GSH)** je v vodi topna molekula, ki se nahaja v citosolu, jedru in mitohondrijih. Ima več funkcij, in sicer deluje kot faktor encima **glutation peroksidaza (GPx)**, sodeluje pri transportu aminokislin skozi membrano in regenerira oksidirana vitamina A in C v aktivno obliko. Poleg tega učinkovito reagira z oksidanti. Pri tem se reducirana tiolna skupina dveh molekul GSH oksidira in tako nastane glutation disulfid (GSSG). Razmerje med GSH in GSSG je dober kazalec oksidativnega stresa v organizmu (22, 24, 29).



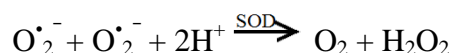
Za učinkovito odstranjevanje ROS mora biti vedno na voljo dovolj GSH, za kar pa skrbi encim **glutation reduktaza (GR)**, ki GSSG pretvori nazaj v GSH (22).



GSH učinkovito odstranjuje radikale in  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tega pa razgrajuje tudi **katalaza (CAT)** (22).

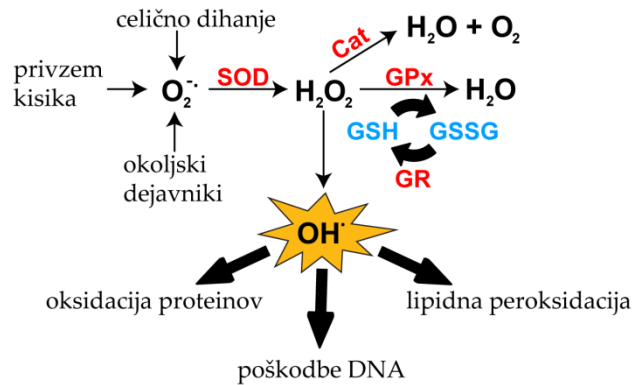


**Superoksid dismutaza (SOD)** se nahaja v mitohondrijih in v citosolu, njena funkcija pa je metaboliziranje superoksidnega radikala  $\text{O}_2^{\cdot-}$  v kisik in  $\text{H}_2\text{O}_2$  (22, 30).



### 1.3.3. OKSIDATIVNE POŠKODBE BIOLOŠKIH MAKROMOLEKUL

Reaktivne zvrsti poškodujejo biološke makromolekule kot so DNA, lipidi in proteini. S tem porušijo njihovo strukturo in funkcijo, kar lahko privede do nastanka različnih bolezni (npr. Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen).

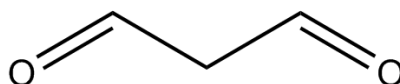


Slika 6. Shema vpliva oksidativnega stresa na poškodbe v celici in celični antioksidantni sistem. SOD: superoksid dismutaza; Cat: katalaza; GSH: glutation; GSSG: glutation disulfid; GPx: glutation peroksidaza; GR: glutation reduktaza (povzeto po 31).

Reaktivne zvrsti reagirajo z DNA in povzročijo modifikacije dušikovih organskih baz. Zaradi nizkega redukcijskega potenciala je oksidativnim poškodbam najbolj izpostavljen gvanin in s tem predeli DNA, ki so bogati z nukleotidnimi pari citozin-gvanin. Najbolj proučevan derivat gvanina je 8-okso-7,8-dihidrogvanin (8-oksoG), ki lahko povzroči mutagene poškodbe DNA. Konformacijsko se lahko spremeni in se namesto s citozinom poveže z adeninom, torej se pretvori v timin. Reaktivne zvrsti tudi cepijo N-glikozidno vez med nukleotidnimi bazami in deoksiribozo, kar privede do odstranitve baz in s tem do nastanka apurinskih/apirimidinskih (AP) mest. Ta mesta so lahko tudi rezultat delovanj popravljalnih mehanizmov, ki odstranjujejo poškodovane baze, ali oksidativno poškodovane deoksiriboze, ki se ne more povežati z bazami. Reaktivne zvrsti lahko poleg tega povzročijo cepitev enoverižne ali dvoverižne DNA. Pri enoverižni DNA hidroksilni radikali interagirajo z deoksiribozo, pri čemer nastanejo peroksilni radikali, ki nato cepijo fosfodiesterne vezi med sladkornimi enotami. Cepitve so lahko tudi posledica popravljalnih mehanizmov za AP mesta. Dvoverižno DNA pa lahko cepi peroksinitrilni radikal (32, 33).

**Lipidna peroksidacija** je najpogostejša oksidativna poškodba bioloških makromolekul. ROS, predvsem hidroksilni, alkoksilni in peroksilni radikali, poškodujejo polinenasičene maščobne kisline (PMK), ki se nahajajo v celični membrani. S tem se spremenijo fluidnost in permeabilnost membran ter metabolni procesi maščobnih kislin. Produkti lipidne peroksidacije so številni epoksidi in predvsem aldehidi, med katerimi je najbolj proučevan malondialdehid (MDA; slika 7) (32, 34, 35). Proces lipidne peroksidacije se začne na metilni skupini med dvema cis dvojnima vezema v PMK. ROS odtegnejo H atom iz metilne skupine, pri čemer nastane lipidni radikal. Ta sproži kaskado reakcij (adicije

kisika, odtegnitve vodika, fragmentacija), pri čemer nastanejo različni končni produkti, med katerimi je tudi MDA (36). MDA je genotoksičen, saj tvori adukte z nukleotidnimi bazami in povzroči premreženje DNA in histonov. Posledica poškodb DNA so lahko mutacije, ki privedejo do raka. Poleg tega lahko MDA reagira z lipoproteini in spodbudi nastanek ateroskleroze, s premreženjem kolagena pa poškoduje kardiovaskularno tkivo (34).

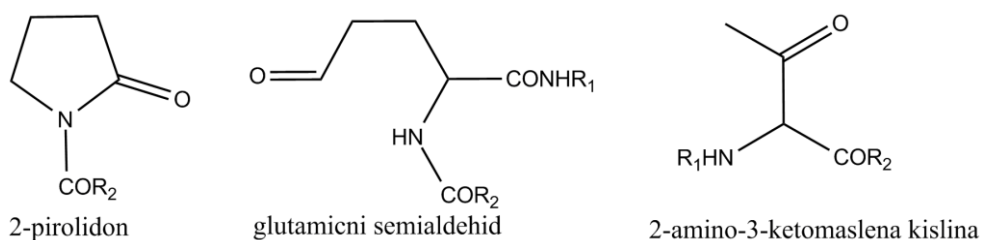


Slika 7. Malondialdehid.

**Proteini** so zelo občutljivi na oksidativne poškodbe. Reaktivne zvrsti z njimi lahko reagirajo na različne načine:

- Oksidirajo občutljive stranske aminokislinske verige (cistein, metionin) v disulfide ali metionin sulfokside, pri čemer gre praviloma za reverzibilne reakcije. Reagirajo lahko tudi z aromatskimi aminokisljinami.
- Oksidirajo peptidne vezi, kar privede do cepitve proteina ali do premreženja proteinov.
- Po oksidaciji tvorijo karbonilne skupine na občutljivih stranskih verigah ali na ostanku peptidne vezi po fragmentaciji proteina.

Nastanek karbonilnih skupin lahko inducirajo tudi produkti drugih oksidacijskih reakcij, kot je npr. MDA. Protein karbonili (slika 7) so najpogosteje merjen parameter oksidativnega stresa proteinov (37, 38).



Slika 8. Primeri protein karbonilov (povzeto po 39).

#### 1.3.4. OKSIDATIVNI STRES IN EPILEPSIJA

Možgani so zelo občutljivi na poškodbe, ki jih povzročijo reaktivne zvrsti. V njih je namreč veliko mitohondrijev, ki so vir radikalov, aktivnost elektronske dihalne verige pa je velika zaradi obsežnega metabolizma. Poleg tega možganske celice privzamejo veliko

kisika in vsebujejo veliko železovih ionov, ki katalizirajo radikalske reakcije, ter veliko PMK, ki so nagnjene k lipidni peroksidaciji. Hkrati se v njih nahaja manj antioksidantov kot v ostalih tkivih. Vsi naštetih faktorji prispevajo k porušenju encimske, receptorske ali strukturne funkcije proteinov, k nastanku mutacij, k porušenju integritete in signalne vloge celične membrane ipd., kar lahko rezultira v nevroplastični spremembi ali smrti nevrona. Poškodba ali smrt nevronske celice pa sta med pomembnejšimi vzroki za nastanek epilepsije (1, 25, 40).

## 1.4. MODELI ZA PROUČEVANJE VPLIVA PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN NA NASTANEK OKSIDATIVNEGA STRESA

Vse več je dokazov, da PEU inducirajo ali vsaj spodbudijo nastanek oksidativnih poškodb (1, 41). Proučevanje teh škodljivih vplivov poteka na celičnih in živalskih modelih ter v kliničnih študijah.

### 1.4.1. CELIČNI MODELI

Astrociti so zvezdaste celice v možganih, ki nevrone oskrbujejo s hranili. Izražajo receptorje za različne nevrottransmitterje, tudi za glutamat. V normalnih fizioloških pogojih astrociti uravnavajo izločanje glutamata iz živčnih celic v ekstracelularni prostor, če pa je njihova funkcija okrnjena, lahko neravnovesje glutamata privede do oksidativnih poškodb in stimulira epileptogenezo. Zaradi svojih lastnosti so astrociti primerni za proučevanje oksidativnega stresa. V študijah na podganjih astrocitih so izpostavitve celic CBZ, okskarbamazepinu in TOP izkazale znižanje celične viabilnosti in upad koncentracije encima glutamin sintetaza, hkrati pa povišanje koncentracije ROS, NO in MDA, iz česar sklepamo, da porušijo ravnovesje med oksidanti in antioksidanti. Novejše učinkovine, kot so gabapentin, lamotrigin in LEV so v terapevtskih koncentracijah izkazale manjše povišanje ROS, NO in MDA. Njihovi toksični učinki so se okrepili pri višjih koncentracijah (1).

### 1.4.2. ŽIVALSKI MODELI

Epilepsijo in z njo povezani oksidativni stres se proučuje tudi na živalih, predvsem na podganah in miših. Na testnih živalih moramo najprej inducirati pričetek epileptičnega



napada, kar lahko dosežemo z genetsko modifikacijo živali ali aplikacijo kemičnega sredstva (42).

Genetsko modificirane podgane imajo v svojem genskem zapisu določeno predispozicijo, zaradi katere izkazujejo podobne epileptične napade kot ljudje. Tonično klonične napade proučujemo na podganah GEPR (*genetically epilepsy-prone rats*). Znotraj GEPR skupine ločimo dve podvrsti podgan, ki se med seboj razlikujeta glede na intenzivnost epileptičnih napadov: GEPR-3 trpijo za blažjimi, GEPR-9 pa za hujšimi napadi. Pri njih epileptični napad sprožimo z zvočno stimulacijo, hkrati pa so tudi bolj občutljive na druge dražljaje, kot so elektrošok ali kemijske spojine (42, 43, 44). Za proučevanje absenčnih napadov se uporabljajo podgane GAERS (*genetic absence epilepsy rats from Strasbourg*). V njih je povišana koncentracija makrofagnega migracijskega inhibitornega faktorja (MIF), ki spodbudi nastanek različnih oksidantov, hkrati pa so modificirani tudi proteini 0-beta globulin in H-feritin, kar stimulira epileptogenezo in oksidativni stres. Tonične in absenčne napade preučujemo na podganah SER (*the spontaneously epileptic rat*). Pri slednjih so vzrok za napade abnormalnosti v delovanju kalcijevih in natrijevih kanalčkov in povišanih koncentracij glutamata v ekstracelularnem prostoru (42).

Epileptični napad lahko stimuliramo tudi z aplikacijo kemičnih sredstev, kot so kainska kislina (KA), pilokarpin, pentilentetrazol (PTZ) in trimetiltin (TMT). Stimulacija s KA se uporablja za proučevanje nastanka, propagacije in patoloških posledic epileptičnega napada v limbičnem sistemu. S KA se aktivira podtip ionotropnih glutamatnih receptorjev v hipokampusu, kar privede do epileptičnega napada v temporalnem režnju. Prav tako se za proučevanje epilepsije temporalnega režnja uporablja pilokarpin. PTZ deluje kot GABA antagonist in se najpogosteje uporablja pri proučevanju delovanja PEU. TMT poškoduje celice v hipokampusu in deluje podobno kot KA. Vsak način stimulacije epileptičnega napada poruši ravnovesje med oksidanti in antioksidanti v živalih (1, 42).

Vpliv PEU na oksidativni stres se v veliki meri proučuje na živalih. Tako se PEU dajejo določenemu živalskemu modelu, nato pa se označevalci oksidativnega stresa določajo (predvsem) v možganih živali. Rezultati študij se razlikujejo glede na uporabljeno žival, živalski model ter predel možganov, v katerih so bili označevalci merjeni (1).

### 1.4.3. KLINIČNE RAZISKAVE

Označevalci oksidativnega stresa se pri ljudeh merijo v plazmi, likvorju, serumu, eritrocitih, levkocitih in urinu. Predpostavljamo namreč, da njihova koncentracija odraža

stanje v centralnem živčnem sistemu. Študije so pokazale, da VPA in CBZ znižata celotno antioksidantno kapaciteto povišata koncentracije MDA, 8-oksoG ter nitratov in nitritov, vendar CBZ v manjši meri kot VPA. Izpostavljenost tem PEU torej privede do oksidativnega stresa, kar je lahko eden izmed razlogov za neučinkovitost farmakološke terapije. Zvečana koncentracija oksidantov lahko namreč pretirano vzburja nevrone ali jih poškoduje, kar zmanjša učinek PEU ali vodi do neželenih učinkov. Rezultati kliničnih raziskav se med seboj razlikujejo. Razlike v encimskih aktivnostih in označevalcih oksidativnega stresa se pojavljajo glede na to, ali jih določamo pri otrocih, mladostnikih ali odraslih, glede na čas trajanja terapije, glede na izbrani biološki vzorec ipd. Vpliv VPA in CBZ na oksidativni stres sta bila proučevana že v številnih študijah, medtem ko vpliv PEU novejših generacij ostaja manj raziskan. Rezultati študij so precej heterogeni - nekatere dokazujejo nastanek oksidativnega stresa, medtem ko druge ne. Razpršenost rezultatov zahteva nove študije, ki bi nam pomagale razumeti vpliv PEU na človeško telo (1, 42, 43).

## 2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen magistrske naloge je ovrednotiti vpliv PEU prve in druge generacije na nastanek oksidativnega stresa v monocitni celični liniji THP-1. PEU, ki jih bomo v raziskavi uporabili, so VPA in CBZ, ki pripadata prvi generaciji PEU, ter TOP, LEV in PREG, ki pripadajo drugi generaciji PEU. Najprej bomo s testom metabolne aktivnosti MTS določili maksimalne necitotoksične koncentracije PEU. Nato bomo celice za 24h izpostavili izbranim koncentracijam PEU (posamezno in v kombinacijah z dvema PEU), čemur bo sledila analiza prisotnosti ROS s pretočnim citometrom. V celicah, ki bodo 24h izpostavljene visokim koncentracijam PEU, bomo določili še označevalce oksidativnih poškodb lipidov ter encimske in neencimske antioksidante. Koncentracije GSH, GSSG in MDA bomo izmerili z že razvitima metodama, in sicer z LC-MS/MS. CAT bomo določili z metodo po Aebiju, SOD pa s komercialno metodo.

Ker celice bolnikov z epilepsijo niso le kratek čas izpostavljene visokim koncentracijam PEU, temveč so dolgotrajno izpostavljene nižjim, terapevtskim koncentracijam, bomo celice THP-1 za en, dva oz. tri tedne izpostavili terapevtskim koncentracijam PEU (povzete po literaturi) in nato v njih pomerili nastanek ROS.

Predpostavljamo, da so za nastanek oksidativnega stresa lahko odgovorni tudi metaboliti PEU. Za pretvorbo CBZ v njegove metabolite bomo uporabili metabolno aktivne hepatocite Hep-G2. Najprej bomo s testom metabolne aktivnosti določili maksimalne necitotoksične koncentracije učinkovin na celicah Hep-G2, nato pa te celice z izbranimi koncentracijami tretirali 72h, da bi se PEU ustrezno metabolizirale. Hepatociti lahko v okoliški medij metabolite izločijo, zato bomo medij z metaboliti s hepatocitov prenesli na celice THP-1 in nato v njih pomerili nastanek ROS.

Hipoteze:

- Predstavnik prve generacije PEU povzročata večji oksidativni stres v celicah kot predstavnik druge generacije PEU
- Kombinacija PEU prve in druge generacije povzroča manjši oksidativni stres na celicah kot izpostavitve le predstavnikom prve generacije
- Kratkotrajna izpostavitve visokim koncentracijam PEU povzroči v celicah večji oksidativni stres kot dolgoročno izpostavitve terapevtskim koncentracij PEU

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

Preglednica II. Uporabljeni standardi.

STANDARD	PROIZVAJALEC
Glutation, oksidiran	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Glutation, reduciran	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Goveji serumski albumin	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Karbamazepin	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Levetiracetam	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
MDA tetrabutylamonijeva sol	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Pregabalin	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
Topiramamat	Sequoia Research Products LTD; Pangbourne, Združeno Kraljestvo
Valprojska kislina	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA

Preglednica III. Uporabljeni reagenti in topila.

REAGENTI, TOPILA	PROIZVAJALEC
2,4-dinitrofenilhidrazin	Sigma-Aldrich Chemie; Steinheim, Nemčija
30% vodikov peroksid	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
37% klorovodikova kislina	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
70% etanol	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
acetonitril	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
amonijev acetat	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Antibiotik/antimikotik 100 × (10000 enot penicilina, 10 mg streptomocina in 25 mg amfotericina B na mL)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, Nemčija
Cell Titer 96® Aqueous One Solution Reagent (reagent MTS)	Promega, Madison, WI, ZDA
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija

etilendiamintertraocetna kislina (EDTA) Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija

Fetalni goveji serum (FBS)	Invitrogen; Auckland, Nova Zelandija
Gojišče RPMI 1640, HEPES Modification	Sigma-Aldrich; Ayrshire, Združeno Kraljestvo
H <sub>2</sub> DCFDA (barvilo diklorodihidrofluorescin diacetat)	2',7'-Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
komercialna metoda Ransod	RANDOX Laboratories Ltd, Združeno kraljestvo
metanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
mravljična kislina	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
NaOH	Fluka Analytical; St. Louis, ZDA
ocetna kislina, 100%	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Raztopina tripanskega modrila, 0,4 % (angl. Trypan Blue Solution)	Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
terc-butyl peroksid	Sigma-Aldrich Chemie; MO, ZDA
triklorocetna kislina	Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija
Ultračista voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10; specifična upornost 18,2 MΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) 5 µg/L	Millipore Corp., Billerica, MA

#### Preglednica IV. Uporabljena laboratorijska oprema.

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Analitična tehtnica	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
avtoklav A-21	Kambič laboratorijska oprema; Semič, Slovenija
centrifuga	Centrifuge 5415R, Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija Megafuge 16R, Thermo Scientific
centrifugirke	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
eppendorfove epruvete	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Grelnik in stresalnik VORTEMP 56 EVC	Tehtnica; Železniki, Slovenija

hemocitometer	Brand Neubauer (Blau Brand)
hladilnik (+5°C)	LTH; Škofja Loka, Slovenija
inkubator	HERAUS Holding GmbH; Hanau, Nemčija
inserti za vijale 0,1mL	Machrey-Nagel; Düren, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop OLYMPUS CK40	Olympus Optical Co.; Hamburg, Nemčija
komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra pio, Šentjernej, Slovenija
krovnna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija
LC-MS/MS Sistem Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jeatstream® LC/MS	Agilent Technilogies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA
mikrotiterski čitalec Safire2™ Genios	Tecan, Genios; Zürich, Švica
mikrotiterski čitalec SynergyHT Multi-Mode Microplate reader	BioTek, VT, ZDA
mikrotitrne ploščice	TPP; Trasadingen, Švica
Multikanalna pipeta (300 µL)	Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija
pH meter	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
pipete (100-1000 µL, 20-200 µL, 2-20 µL, 0,5-10 µL, 0,1-2,5 µL)	Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija
pipete (100-1000 µL, 20-200 µL, 2-20 µL, 0,5-10 µL, 0,1-2,5 µL)	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finska
pipetni nastavki	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
pretočni citometer FACS calibur	BD Biosciences, SJ, CA
serološke pipete (5, 10, 25 in 50mL)	TPP; Trasadingen, Švica
Serološke pipete za enkratno uporabo (za 5, 10, 25 in 50 mL)	TPP; Trasadingen, Švica
Steklovina: steklene čaše (25 in 250 mL); steklene bučke (5, 10, 25, 50, 100 in 250 mL); tehtiči	
Škatle za zamrzovanje vzorcev	Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija
Tehtnica AG 245	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Ultrazvočna kadička: Sonis 4	Iskra; Kranj, Slovenija
Vodna kopel	Memmert; Schwabach, Nemčija
vsebniki za gojenje celic (flaski)	TPP; Trasadingen, Švica

Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje; Velenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80 °C)	Forma Scientific; Midland, ON, Kanada
Zamrzovalnik (-80 °C)	Sanyo Electric Co., Ltd.; Japonska

**Preglednica V. Priprava pufrov.**

PUFRI	SESTAVA
10 × PBS (fosfatni puffer); natehtamo sestavine, raztopimo v vodi, uravnamo pH na 7,4 in sterilno filtriramo (0,22 mm)	NaCl 80 g KCl 2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12 H <sub>2</sub> O 36,3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,4 g Ultračista H <sub>2</sub> O dopolnimo do 1,0 L
1 x PBS sterilno filtriran	10 x PBS redčimo 1:10 z avtoklavirano vodo, uravnamo pH na 7,4

**Preglednica VI. Mediji za gojenje celic.**

MEDIJ ZA DELO S CELICAMI	SESTAVA
Medij za celice THP-1	500 ml medija RPMI 1640, HEPES Modification 50 ml FBS 5,5 ml L-glutamin  5,5 ml antibiotik/antimikotik 100× (10 000 enot penicilina, 10 mg streptomocina in 25 µg amfotericina B na mL) 0,5 mL 50 mM 2-merkaptoetanol
Medij za celice HEP-G2	500 ml medija RPMI 1640, HEPES Modification 50 ml FBS 5,5 ml L-glutamin  5,5 ml antibiotik/antimikotik 100× (10.000 enot penicilina, 10 mg streptomocina in 25 µg amfotericina B na mL)

## 3.2.METODE

### 3.2.1. DELO S CELICAMI THP-1 IN HEP-G2

Celice THP-1 so humane levkemične monocitne celice, ki jih *in vitro* gojimo kot suspenzijske celice (45) v vsebnikih za gojenje celičnih kultur pri koncentraciji  $6-8 \times 10^5$  celic/mL medija. Njihovo koncentracijo določimo tako, da medij s celicami v vsebniku dobro premešamo s serološko pipeto, nato pa 10 $\mu$ L celic prenesemo v mikrocentrifugirko. Tam celicam dodamo enak volumen barvila Trypan blue, ki obarva mrtve celice. 10 $\mu$ L pobarvanih celic prenesemo na hemocitometer in pod invertnim svetlobnim mikroskopom preštujemo število živih, neobarvanih celic v štirih kvadratih (v vsakem je ujet 1 $\mu$ L vzorca). Z upoštevanjem faktorja redčitve izračunamo koncentracijo celic v vsebniku preko enačbe 1 (28):

**Enačba 1. Izračun koncentracije celic.**

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

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

Celice Hep-G2 so humani hepatociti, izolirani iz bolnika, obolelim s hepatocelularnim rakom (46). *In vitro* jih gojimo kot adhezijske celice. V vsebniku jih gojimo, dokler celice ne prerastejo 75 % površine vsebnika. Nato jim odstranimo medij in jih prelijemo s tripsinom, da se deadherirajo od vsebnika. Prenesemo jih v centrifugirko in centrifugiramo 5 minut pri 1200 RPM. Supernatant odstranimo in celice resuspendiramo v mediju. Ko so resuspendirane, jih lahko preštujemo s hemocitometrom tako kot celice THP-1, nato pa koncentracijo celic za poskuse uravnamo z ustreznim volumenom medija. Suspenzijo celic za gojenje prenesemo v nove vsebnike in dodamo toliko medija, da bo površina vsebnika z medijem popolnoma prekrita.

Da preprečimo okužbe celic, z njimi rokujemo le v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komora), ki jo vključimo vsaj 15 minut pred začetkom dela, da se v njej zamenja ves zrak, njene površine pa razkužimo s 70 % etanolom. Prav tako razkužimo vse predmete, ki jih vnesemo v komoro. Ves material, ki ga pri delu s celicami uporabimo, mora biti sterilan. Vsebniki, mikrotitrne ploščice, centrifugirke in serološke pipete so sterilizirani že s strani proizvajalca in tudi sterilno zaprti, zato jih odpremo šele v LAF komori. Pipetne



nastavke in mikrocentrifugirke pa moramo pred uporabo avtoklavirati, nato pa hraniti ustrezno zaprte. Odpremo jih šele v LAF komori in jih ustrezno zapremo, preden jih vzamemo ven. Po končanem delu v LAF komori vklopimo baktericidno UV luč. Med delom skrbimo za ohranjanje čistoče in preprečevanje kontaminacije. Prav tako velja poseben režim ohranjanja čistoče v prostoru, v katerem je LAF komora postavljena.

Ko s celicami ne rokujejo, jih hranimo v inkubatorju pri temperaturi 37°C, 95 % vlažnosti in atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2. PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN UČINKOVIN

PEU smo zatehtali v sterilne 1,5 mL mikrocentrifugirke in jih raztopili v primernem topilu. Tako smo pripravili osnovne raztopine, ki smo jih shranjevali na -20°C. Pred uporabo smo jih odtalili na vodni kopeli in jih nato uporabili v poskusih. Koncentracije učinkovin in topila, v katerih smo raztopine pripravili, so prikazani v preglednici VII:

**Preglednica VII. Priprava osnovnih raztopin protiepileptičnih učinkovin.**

PEU	VPA	CBZ	TOP	LEV	PREG
topilo	PBS	DMSO	DMSO	PBS	PBS
koncentracija	1M	1M	1M	1M	250mM

### 3.2.3. KRATKOTRAJNA IZPOSTAVLJENOST

#### 3.2.3.1. DOLOČANJE MAKSIMALNE NECITOTOKSIČNE KONCENTRACIJE PEU S TESTOM MTS NA CELICAH THP-1

Metabolno aktivnost celic lahko določamo z merjenjem aktivnosti presnovnih encimov. Test za določanje presnovne aktivnosti celic MTS je kolorimetrična metoda za merjenje encimov, ki reducirajo reagent MTS (3-(4,2-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) v formazan vijolične barve. Tetrazolijevo sol žive, presnovno aktivne celice reducirajo do obarvanega formazana, ki je topen v mediju in ga lahko spektrofotometrično kvantificiramo pri 490 nm na mikrotiterskem čitalcu. Večja kot je izmerjena absorbanca, večja je presnovna aktivnost celic oz. število celic, ki so presnovno aktivne (28).

MTS test smo izvedli tako, da smo celice **THP-1** v mediju razredčili na  $4 \times 10^5$  celic/mL. Po 1 mL celic smo prenesli na mikrotitrsko ploščico s 24 odprtini in jih izpostavili različnim koncentracijam PEU (preglednica VIII).

**Preglednica VIII. Izpostavitve 1 mL celic THP-1 PEU za MTS test.**

koncentracija PEU [ $\mu$ M]	100	500	1000	2000	4000
volumen stock raztopine VPA [ $\mu$ L]	0,1	0,5	1	2	4
volumen stock raztopine CBZ [ $\mu$ L]	0,1	0,5	1	2	4
volumen stock raztopine TOP [ $\mu$ L]	0,1	0,5	1	2	4
volumen stock raztopine LEV [ $\mu$ L]	0,1	0,5	1	2	4
volumen stock raztopine PREG [ $\mu$ L]	0,4	0,8	4	8	-

100  $\mu$ L ( $4 \times 10^5$ ) tretiranih celic smo prenesli na mikrotitrsko ploščico v duplikatu in jih inkubirali 24h. Pripravili smo tudi netretirano kontrolo in negativno kontolo- celice tretirane z DMSO (dodan volumen enak kot pri najvišji koncentraciji PEU), in kot slepo medij za gojenje celic. Po 21 h smo celicam dodali 10  $\mu$ L MTS in inkubirali še 3 h (skupaj 24 h), nato smo pomerili absorbanco nastalega formazana. Metabolno aktivnost tretiranih celic smo določili relativno glede na aktivnost netretiranih celic, in sicer po enačbi 2:

**Enačba 2. Določitev odstotka metabolne aktivnosti.**

$$\%MA = \frac{Avz - Asl}{Antc - Asl}$$

*MA: metabolna aktivnost; Avz: povprečje dveh absorbanc tretiranih celic; Asl: povprečje dveh absorbanc medija; Antc: povprečje dveh absorbanc netretiranih celic.*

Na THP-1 celicah smo določili najvišje koncentracije vseh učinkovin, pri katerih še ne pride do upada metabolne aktivnosti celic. Te najvišje necitotoksične koncentracije (preglednica IX) smo uporabili naslednjem MTS testu, kjer smo testirali **kombinacije učinkovin**. Zgoraj opisani postopek smo ponovili, le da smo tokrat celice izpostavili dvema različnima učinkovinama hkrati in absorbanco pomerili le po 24 h inkubaciji. Tako smo izpostavili celice z vsem kombinacijam učinkovin razen kombinaciji LEV+PREG.

**Preglednica IX. Tretiranje 1 mL celic THP-1 z najvišjimi necitotoksičnimi koncentracijami PEU.**

PEU	VPA	CBZ	TOP	LEV	PREG
najvišja necitotoksična koncentracija [mM]	4	1	4	4	2
volumen stock raztopine PEU [ $\mu$ L]	4	1	4	4	8

Vse MTS teste smo izvedli v duplikatu v dveh bioloških ponovitvah in rezultat podali kot povprečje bioloških ponovitev relativno glede na netretirano kontrolo.

### ***3.2.3.2. DOLOČANJE ROS S PRETOČNO CITOMETRIJO V CELICAH THP-1 PO KRATKOTRAJNI IZPOSTAVITVI PEU***

ROS lahko določimo s pretočno citometrijo. Pri tem uporabimo barvilo H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat), ki je kemično reducirana oblika fluoresceina in je indikator ROS 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 (47).

Najprej smo pripravili 25 mM raztopino barvila H<sub>2</sub>DCFDA v DMSO, nato pa smo v 20 mL PBS pripravili 25  $\mu$ M raztopino tega barvila.  $16 \times 10^6$  celic smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 1200 RPM. Supernatant smo odstranili, celice pa resuspendirali v 20 mL toplega PBS s 25  $\mu$ M barvilom H<sub>2</sub>DCFDA. Centrifugirko smo postavili v inkubator za 15 minut, nato pa jo spet centrifugirali 5 minut pri 12000 RPM. Supernatant smo odstranili, pobarvane celice pa resuspendirali v 20 mL toplega medija. Po 1 mL homogene suspenzije celic ( $8 \times 10^5$  celic) smo prenesli v odprtine na mikrotitrski ploščici s 24 odprtinami in inkubirali 15 minut. Nato smo celice izpostavili PEU – uporabili smo najvišje necitotoksične koncentracije, ki smo jih predhodno določili z MTS testom (preglednica IX), izpostavili pa smo jih posameznim učinkovinam kot tudi vsemi kombinacijami, razen kombinaciji LEV+PREG. Za negativno kontrolo smo celice tretirali DMSO, za pozitivno kontrolo pa z 10  $\mu$ M terc-butyl peroksidom, pripravili pa smo tudi netretirano kontrolo. Po 1 h inkubacije smo celice prenesli v epruvete in nastanek ROS pomerili na pretočnem citometru. Meritve smo izvedli še po 3 h in 6 h, medtem pa smo epruvete hranili v inkubatorju. Rezultate podamo kot odstotek vzorca glede na netretirano kontrolo. Poskus smo izvedli v dveh bioloških ponovitvah.

### **3.2.3.3. TRETIRANJE CELIC ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV IN KAZALNIKOV OKSIDATIVNIH POŠKODB**

V celicah THP-1 smo po kratkotrajni izpostavljenosti visokim koncentracijam PEU želeli poleg nastanka ROS izmeriti tudi druge označevalce oksidativnega stresa, kot so MDA, GSH, CAT in SOD. Zato smo celice za 24 h izpostavili vsem učinkovinam in njihovim kombinacijam ter DMSO in netretirani kontroli v treh bioloških ponovitvah, označevalce pa smo pomerili v  $2 \times 10^6$  celicah.

Za eno tretiranje v eni biološki ponovitvi smo v vsebnik za gojenje celic vnesli  $18 \times 10^6$  celic v 11 mL medija ( $1,64 \times 10^6$  celic/mL medija) in dodali tolikšen volumen osnovne raztopine PEU, da smo dobili najvišjo necitotoksično koncentracijo (preglednica IX). Nato smo celice inkubirali 24 h. Po inkubaciji smo jih prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 1200 RPM. Supernatant smo odstranili, celice pa resuspendirali v 11 mL PBS (za spiranje celic). Nato smo po 1,5 mL suspenzije ( $2 \times 10^6$  celic) v ependorfove epruvetke (8x) in jih centrifugirali 5 min pri 1200 RPM. Supernatant smo zavrgli, celice pa shranili na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.3.4. NEENCIMSKI ANTIOKSIDANT GLUTATION**

#### **PRIPRAVA REAGENTOV**

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

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

#### **PRIPRAVA STANDARDOV GSH**

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

**Preglednica X. Priprava standardov GSH in GSSG**

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

### **PRIPRAVA CELIČNIH LIZATOV**

Celice smo odtalili in jim dodali 200  $\mu\text{L}$  1 mM HCl z 1 mM EDTA. Nato smo jih 30 s mešamo na vibracijskem mešalniku.

### **PRIPRAVA VZORCEV, STANDARDOV NA ANALIZO**

K 200  $\mu\text{L}$  vzorca (celičnega lizata ali standarda) smo dodali 400  $\mu\text{L}$  hladnega acetonitrila in premešali na vibracijskem mešalniku. Vzorce smo nato centrifugirali 10 min pri 4°C in 13100 obratih/min (obarjanje proteinov). 150  $\mu\text{L}$  supernatanta smo odpipetirali na mikrotitrne ploščice za analizo na LC-MS/MS.

### **METODA LC**

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

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

## METODA MS/MS

Uporabili smo masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Za metodo ionizacije smo uporabili ESI v pozitivnem načinu. Pri kvalifikaciji GSH smo spremljali prehod 308,1 → 76,2 pri kvantifikaciji pa prehod 308,1→179. Pri kvalifikaciji GSSG smo spremljali prehod 613,2 → 231 pri kvantifikaciji pa prehod 613,2 → 355,1. Nastavitve širine kvadrupolov Q1 in Q3 smo nastavili na wide (1,2 masne enote). Nastavitve masnega analizatorja so podane v preglednici VII (28).

### Preglednica XI Nastavitve masnega analizatorja za analizo GSH in GSSG.

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

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

## IZRAČUN

Koncentracijo GSH in GSSG izračunamo iz linearne umeritvene krivulje z uporabo uteževnja  $\frac{1}{c^2}$ .

### 3.2.3.5. ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI

#### 3.2.3.5.1. KATALAZA

Metoda po Aebiju temelji na določanju encimske aktivnosti katalaze, ki razgrajuje vodikov peroksid. V celičnih vzorcih se nahaja različna vsebnost CAT, vsem vzorcem pa dodamo standardni dodatek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pri valovni dolžini 240 nm kinetično spremljamo padec absorbance H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s časom. Absorbanco pomerimo vsakih 21 sekund 25-krat zaporedoma.

Iz naklona absorbance pri 240 nm kot funkcije časa krivulje izračunamo aktivnost CAT v celičnem vzorcu. Pred meritvijo moramo vzorec toliko razredčiti, da reakcija razgradnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poteka po kinetiki prvega reda. Rezultat podamo kot aktivnost CAT na mg proteinov v vzorcu.

### **PRIPRAVA REAGENTOV**

Fosfatni pufer: V 100 mL vode smo raztopili 1,34 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in 681 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, nato uravnali pH na 7,0.

30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 34 μL 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> smo raztopili v 10 mL fosfatnega pufra.

### **PRIPRAVA VZORCEV**

Celicam smo dodali 100 μL vode in jih 20 s mešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo celice trikrat zamrznili na -80°C in jih odtalili, pri čemer smo jih odtaljene vedno premešali na vibracijskem mešalniku. Za tem smo jih centrifugirali 5 minut na 10000 RPM pri 4°C. 12 μL supernatanta smo shranili pri -80°C za določanje vsebnosti proteinov, za merjenje katalaze pa smo supernatant še 30x razredčili - 6,6 μL supernatanta smo s fosfatnim pufrom redčili do 200 μL.

### **MERITEV**

160 μL redčenega supernatanta smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščico in dodali 80 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Padec absorbance H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> smo kinetično merili pri valovni dolžini 240 nm.

### **IZRAČUN**

Aktivnost CAT določimo v prvi minuti merjenja absorbance, ko reakcija poteka po kinetiki prvega reda. V tem primeru nam naklon krivulje poda aktivnost CAT. Naklon izračunamo preko enačbe 3:

**Enačba 3 Izračun naklona krivulje za aktivnost CAT.**

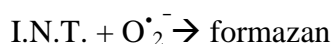
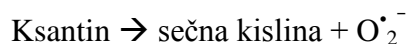
$$k = \frac{2,3}{60 \text{ s}} \times \log \frac{A_1}{A_2} \quad \left[ \frac{1}{\text{s}} \right]$$

*k: naklon premice; A<sub>1</sub>: absorbanca ob času 0s; A<sub>2</sub>: abosrbanca ob času 60s.*

Vsak dobljeni naklon delimo s koncentracijo proteinov v istem vzorcu (poglavje 3.2.3.7) , da izničimo vpliv variacij v številu celic v vzorcu (dobimo aktivnost CAT glede na mg proteinov v vzorcu). Nato rezultat podamo kot relativne vrednosti vzorcev glede na netretirano kontrolo.

### 3.2.3.5.2. SUPEROKSID DISMUTAZA

Vloga SOD je pretvorba superoksidnega radikala  $O_2^{\bullet-}$  v vodikov peroksid in molekularni kisik. Pri uporabljeni metodi smo za tvorbo  $O_2^{\bullet-}$  uporabili ksantin in ksantinsko oksidazo, nastali  $O_2^{\bullet-}$  pa je nato reagiral z I.N.T. (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid) do rdečega barvila formazan. Aktivnost SOD se nato meri kot odstotek inhibicije te reakcije. Ena enota SOD namreč povzroči 50 % inhibicijo hitrosti redukcije I.N.T. pri reakcijskih pogojih.



#### PRIPRAVA REAGENTOV IN STANDARDOV

Reagente in standarde smo pripravili po navodilih kita Randox Ransod. Substrat R1a (ksantin in I.N.T.) smo dopolnili z 20 mL pufru R1b. Ksantin oksidazo smo raztopili v 10 mL vode. Standard smo rekonstituirali z 10 mL vode (koncentracija 5,24U/mL), nato pa ga redčili po navodilih proizvajalca z redčitvenim topilom:

Preglednica XII Priprava standardov SOD.

standard	volumen dodanega standarda	volumen redčitvenega reagenta	koncentracija standarda [U/mL]
S6	neredčen standard	-	5,24
S5	50 $\mu$ L S6	50 $\mu$ L	2,62
S4	50 $\mu$ L S5	50 $\mu$ L	1,31
S3	50 $\mu$ L S4	50 $\mu$ L	0,655
S2	30 $\mu$ L S3	60 $\mu$ L	0,218333333
S1	redčitveni reagent (slepa)	-	0

#### PRIPRAVA CELIČNIH LIZATOV

Celicam smo dodali 100  $\mu$ L hladne vode in jih 20 s mešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo celice trikrat zamrznili na  $-80^{\circ}\text{C}$  in jih odtalili, pri čemer smo jih odtaljene vedno premešali na vibracijskem mešalniku. Za tem smo jih centrifugirali 5 minut na 10000 RPM pri  $4^{\circ}\text{C}$ . 12  $\mu$ L supernatanta smo shranili na  $-80^{\circ}\text{C}$  za določanje vsebnosti proteinov, za



merjenje SOD pa smo supernatant razredčili še 5x, torej smo dodamo 5 µL supernatanta 20 µL redčitvenega reagenta.

## **MERITEV**

Na mikrotitrsko ploščico smo pipetirali 5 µL standarda ali vzorca in nato mu dodali 170 µL substrata. Tik pred pričetkom meritve smo dodali še 25 µL ksantin oksidaze in kinetično merili padec absorbance formazana pri 505 nm vsakih 30 sekund 7-krat zapored. Rezultat podamo kot aktivnost SOD na mg proteinov v vzorcu.

## **IZRAČUN**

Najprej podamo spremembo absorbance v prvih treh minutah merjenja preko enačbe 4 za vzorce, standarde in slepo:

**Enačba 4** Sprememba absorbance formazana v prvih treh minutah merjenja.

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

*ΔA*: sprememba absorbance formazana na minuto; *A*<sub>2</sub>=absorbanca formazana po treh minutah merjenja; *A*<sub>1</sub>: absorbanca formazana ob začetku merjenja.

Zatem izračunamo odstotek inhibicije, ki ga k tvorbi formazana prispeva SOD (izračunamo za standarde in vzorce):

**Enačba 5** Določanje % inhibicije nastajanja formazana.

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

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

Iz logaritmskih vrednosti koncentracij standardov in vrednosti odstotkov inhibicije izračunamo umeritveno krivuljo s pomočjo linearne regresije, iz katere nato določimo koncentracijo SOD v vzorcih. Koncentracije nato delimo s koncentracijo proteinov v istem vzorcu (poglavje 3.2.3.7) , da izničimo vpliv variacij v številu celic v vzorcu (dobimo aktivnost SOD glede na mg proteinov v vzorcu). Nato rezultat podamo kot relativne vrednosti vzorcev glede na netretirano kontrolo.

### **3.2.3.6. KAZALNIK OKSIDATIVNEGA STRESA: MALONDIALDEHID**

Metoda z derivatizacijo z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) je ena najpogosteje uporabljenih derivatizacijskih metod za določanje MDA, na podlagi katerega ovrednotimo

obseg lipidne peroksidacije. MDA in DNPH tvorita hidrazonski in pirazolski derivat in slednjega določimo z LC-MS/MS.

### **PRIPRAVA REAGENTOV**

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

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

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

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

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

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

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

### **PRIPRAVA STANDARDOV**

V 10 mL bučko smo natehtali 43,50 mg malonaldehid tetrabutilamonijeve soli ter dopolnili do oznake z acetonitrilom. Tako smo dobili 1 mg/mL osnovno raztopino I (OR I). Nato smo 180  $\mu\text{L}$  OR I odpipetirali v 50 mL bučko in dopolnili do oznake z 0,1 M HCl in raztopino dobro premešali. Tako smo dobili standard MDA s koncentracijo 50  $\mu\text{mol/L}$  (osnovna raztopina II; OR II). Ta standard smo ustrezno redčili z 0,1 M HCl, da smo dobili standarde s koncentracijami 2,5 in 1,25  $\mu\text{mol/L}$ . Standard s koncentracijo 1,25  $\mu\text{mol/L}$  (naredili smo duplikat) pa smo dalje redčili z 0,1 M HCl, da smo dobili standarde s koncentracijami od 0,625 do 0,039  $\mu\text{mol/L}$ .

V 1,5 mL mikrocentrifugirkah smo pripravili po 1 mL vsakega standarda MDA z določeno koncentracijo. V preglednici XIII so prikazane pripravljane 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 ustrežno koncentracijo.

**Preglednica XIII Priprava standardov MDA.**

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

### **PRIPRAVA CELIČNIH LIZATOV**

Celice smo odtalili in jim dodali 200  $\mu\text{L}$  0,1 M HCl. Nato smo jih 30 s mešali na vibracijskem mešalniku.

### **PRIPRAVA VZORCEV NA ANALIZO**

V 1,5mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 200  $\mu\text{L}$  vzorca (celični lizat ali standard) in dodali 50  $\mu\text{L}$  6M NaOH, premešali in inkubirali 30 min v termostatanem stresalniku pri 60°C in 20 obratih/min (alkalna hidroliza na proteine vezanega MDA). Vzorce smo nato hladili v hladilniku 10min. Potem smo vzorcem dodali 250  $\mu\text{L}$  ohlajene 20 % TCA in jih centrifugirali 10minut pri 5°C in 13100 obratih/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 $\mu\text{L}$  1M 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

jih premešali. Nato smo jih inkubirali 60 minut pri 50°C na termostatisiranem stresalniku pri obratih 20 obratov/min, zaščiteno pred svetlobo (derivatizacija MDA). Nastali produkt MDA-DNPH je nestabilen v prisotnosti svetlobe, zato smo derivatizirane vzorce ohladili na sobni temperaturi (10 min), zaščitene pred svetlobo. Vzorcem smo nato dodali 150 µL acetatnega pufra ter premešali. 150 µl raztopine smo odpipetirali na mikrotistrske ploščice za analizo na LC-MS/MS.

### **METODA TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE**

Metoda LC in MS/MS, ki je bila uporabljena pri diplomski nalogi, je bila predhodno izdelana na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko (28). Uporabili smo LC sistem Agilent 1290 Infinity. Analizo smo izvajali na koloni Kinetex C18 (50 × 2,1 mm, velikost delcev 5 µm). Injicirali smo 5 µL vzorca, avtomatski vzorčevalnik je bil ohlajen na 4°C. Mobilna faza (MF) je bila sestavljena iz 0,1 % mravljične kisline (topilo A) in acetonitrila (topilo B). Obe topili smo pred analizo razplinili v ultrazvočni kadički. Čas analize je znašal 2,6 minute. Retencijski čas analita ( $t_r$ ) je bil 1,23 min. Pretok MF je bil 0,5 mL/min, analiza se je izvajala z gradientno elucijo po shemi predstavljeni v preglednici XIV.

**Preglednica XIV Shema gradientne elucije.**

t	delež topila B
0	30
2	50
2,05	30
2,6	30

### **METODA MS/MS**

Uporabili smo masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Za metodo ionizacije smo uporabili ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju oziroma elektrorazprševalno ionizacijo - ESI (angl. electrospray ionization). Pri kvantifikaciji smo spremljali prehod 235,1 (pirazolska oblika MDA-DNPH produkta) v 159,2 (fragmentacija z odcepom NO<sub>2</sub> in NO skupine) in za odziv vzeli odziv ionov 159,2. Nastavitve masnega analizatorja so podane v preglednici XV (28).

**Preglednica XV Nastavitve masnega analizatorja za analizo MDA.**

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

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

## **IZRAČUN**

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

### ***3.2.3.7. DOLOČANJE PROTEINOV***

V celičnih lizatih, ki smo jih uporabili za določanje CAT is SOD, smo določili tudi koncentracijo prisotnih proteinov, pri čemer smo uporabili kit Bio-Rad Protein Assay. Umeritveno krivuljo smo pripravili z govejimi serumski albumini. Vzorce (v duplikatu) in standarde (v triplicatu) smo pipetirali na mikrotitrsko ploščico in po navodilih dodali reagente iz kita. Po desetih minutah smo pomerili absorbanco pri 595 nm na mikrotitrskem čitalcu. Izračunali smo povprečje duplikatov in odčitali koncentracijo proteinov iz umeritvene krivulje.

### ***3.2.4. DOLGOTRAJNA IZPOSTAVLJENOST***

#### ***3.2.4.1. DOLOČANJE ROS S PRETOČNO CITOMETRIJO V CELICAH THP-1 PO TRETIRANJU S PEU***

Celice *in vivo* niso kratek čas izpostavljene visokim koncentracijam PEU, ampak so kronično izpostavljene njihovim terapevtskim koncentracijam. Zato smo celice THP-1 za en, dva in tri tedne izpostavili terapevtskim koncentracijam posameznih PEU in nato v njih pomerili nastanek ROS. Za en teden smo jih izpostavili tudi kombinacijam vseh PEU z VPA. Za negativno kontrolo smo celice tretirali z DMSO, pripravili pa smo tudi netretirano kontrolo. V 12 mL medija smo pripravili najvišje terapevtske koncentracije ene PEU ali kombinacije dveh PEU (preglednica XVI) (18).

**Preglednica XVI** Izbrane terapevtske koncentracije PEU in priprava medijev s PEU.

PEU	VPA	CBZ	TOP	LEV	PREG
izbrana terapevtska koncentracija [ $\mu\text{M}$ ]	700	50	60	300	100
volumen stock raztopine v 12mL medija [ $\mu\text{L}$ ]	8,4	0,6	0,72	3,6	4,8

Po  $1,6 \times 10^6$  celic smo prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali 5 minut pri 1200RPM. Supernatant smo odstranili, celice pa resuspendirali v 2mL medija s PEU. 1mL homogene suspenzije ( $8 \times 10^5$  celic/mL) smo prenesli v odprtine na mikrotitrski ploščici s 24 odprtinami in ploščico postavili v inkubator. Na vsake 3-4 dni smo določili koncentracijo celic in iz odprtine na mikrotitrski ploščici odpipetirali  $8 \times 10^5$  celic v mikrocentrifugirko, jih centrifugirali 5 minut pri 1200 RPM, supernatant odstranili, celice pa resuspendirali v 1mL svežega medija s PEU in suspenzijo prenesli na novo mikrotitrsko ploščico. Po končani inkubaciji (en, dva ali trije tedni) smo 500  $\mu\text{L}$  suspenzije celic prenesli v mikrocentrifugirko, jih centrifugirali 5 minut pri 1200 RPM, odstranili supernatant in celice resuspendirali v 500  $\mu\text{L}$  toplega PBS z 10  $\mu\text{M}$  barvilom  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Po 15 minutni inkubaciji v inkubatorju smo celice centrifugirali 5 minut pri 1200 RPM in odstranili supernatant, celice pa resuspendirali v svežem mediju in jih prenesli v epruvete. Nastanek ROS smo takoj pomerili na pretočnem citometru.

#### **3.2.4.2. KAZALNIK LIPIDNE PEROKSIDACIJE MALONDIALDEHID**

Po dolgotrajni izpostavljenosti celic THP-1 PEU smo želeli pomeriti tudi nastanek MDA v celicah. Zato smo  $5 \times 10^6$  celic v 5 mL medija z učinkovino (ali kombinacijo učinkovin) prenesli v vsebnik za gojenje celic in inkubirali en teden. Po štirih dneh smo celice prenesli v sveži medij -  $5 \times 10^6$  celic smo prenesli v centrifugirko, centrifugirali 5 minut pri 1200 RPM, odstranili supernatant in celice resuspendirali v 5 mL svežega medija z učinkovino. Po enotedenski inkubaciji smo medij odstranili s celic in celice shranili pri  $-80^\circ\text{C}$ . Tako smo celice izpostavili terapevtskim koncentracijam VPA, VPA+CBZ in VPA+PREG. Pripravili smo tudi netretirano kontrolo. MDA smo v celicah pomerili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.3.6.

### 3.2.5. VPLIV METABOLITOV

#### 3.2.5.1. DOLOČANJE MAKSIMALNE NECITOTOKSIČNE KONCENTRACIJE PEU S TESTOM MTS NA CELICAH HEP-G2

Vpliv VPA, CBZ in PREG na metabolno aktivnost celic smo določili tudi na celicah **Hep-G2**. Pripravili smo suspenzijo celic s koncentracijo  $1 \times 10^5$  celic/ml medija in 100  $\mu\text{L}$  suspenzije ( $1 \times 10^4$  celic) prenesli v odprtine na mikrotitrski ploščici z 96 vdolbinami. Naslednji dan, ko so se celice adherirale na površino ploščice, smo medij s celic odstranili in ga zamenjali z medijem, v katerem so bile PEU v različnih koncentracijah. Pripravili smo 1500  $\mu\text{L}$  medija z učinkovino, na celice pa smo ga prenesli 100  $\mu\text{L}$ . Kontrolni in slepi vzorci so bili pripravljene enako kot pri celicah THP-1.

Preglednica XVII Priprava 1,5 mL medijev za tretiranje celic Hep-G2 za MTS test.

koncentracija PEU [ $\mu\text{M}$ ]	200	500	1000	2000	4000	5000
volumen stock raztopine VPA [ $\mu\text{L}$ ]	0,3	0,75	1,5	3	6	7,5
volumen stock raztopine CBZ [ $\mu\text{L}$ ]	0,3	0,75	1,5	-	-	-
volumen stock raztopine PREG [ $\mu\text{L}$ ]	1,2	3	6	12	-	-

Absorbanco smo pomerili po 24, 48 in 72 h inkubaciji, pri čemer smo 3 h pred koncem inkubacije dodali 10  $\mu\text{L}$  MTS. Metabolno aktivnost smo izračunali po enačbi 2.

Vse MTS teste smo izvedli v duplikatu v dveh bioloških ponovitvah (razen za PREG na HepG2 v 1 biološki ponovitvi).

#### 3.2.5.2. DOLOČANJE ROS V CELICAH THP-1 S PRETOČNO CITOMETRIJO PO TRETIRANJU Z METABOLITI PEU

Ker predpostavljamo, da oksidativni stres lahko povzročijo tudi metaboliti PEU, smo VPA, CBZ in PREG za 72 h izpostavili metabolno aktivnim celicam Hep-G2. Te celice lahko presnovijo PEU in metabolite izločijo v medij. Zato smo medij s hepatocitov prenesli na celice THP-1 in v njih po 6 h in 24 h pomerili nastanek ROS.

$4 \times 10^6$  celic Hep-G2 v 5 mL medija smo prenesli v vsebnik za gojenje celic in inkubirali 24 h, da so se celice adherirale na dno vsebnika. Po inkubaciji smo stari medij odstranili in ga zamenjali s 5 mL svežega medija s PEU, kot je navedeno v preglednici XVIII:

**Preglednica XVIII** Tretiranje celic Hep-G2 za tvorbo metabolitov PEU.

PEU	VPA	CBZ	PREG
izbrana koncentracija [ $\mu\text{M}$ ]	1000	500	2000
volumen stock raztopine v 5mL medija [ $\mu\text{L}$ ]	5	2,5	40

Tako smo celice izpostavili VPA, CBZ, PREG ter kombinacijama VPA+CBZ in VPA+PREG, pripravili pa smo tudi netretirano kontrolo in inkubirali 72 h.

Po 72h smo odstranili medij s celic, ga prenesli v centrifugirke in ga centrifugirali 5 minut pri 1200 RPM, da smo odstranili morebitne prisotne celice. Supernatant smo prenesli v sveže centrifugirke in ga shranili na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Preostale celice v vsebnikih za gojenje smo prelili s tripsinom, da so se odlepili s površine vsebnika in jih prenesli v 2 mL mikrocentrifugirke. Centrifugirali smo jih 5 min pri 1200 RPM, supernatant odstranili in celice zamrznili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

$4 \times 10^6$  celic THP-1 smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 1200 RPM. Supernatant smo odstranili, celice pa resuspendirali v 4 mL prej pripravljenega medija z metaboliti PEU. Suspenzijo celic smo prenesli v vsebnik za gojenje celic in postavili v inkubator. Po 6 h in 24 h smo vzeli 500  $\mu\text{L}$  celic in jih prenesli v mikrocentrifugirko. Centrifugirali smo jih 5 minut pri 1200 RPM, odstranili supernatant in celice reuspendirali v 500 $\mu\text{L}$  toplega PBS z 10  $\mu\text{M}$  barvilom  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Po 15 minutni inkubaciji v inkubatorju smo celice centrifugirali 5 minut pri 1200RPM in odstranili supernatant, celice pa smo resuspendirali v svežem mediju in jih prenesli v epruvete. Nastanek ROS smo pomerili na pretočnem citometru.

### 3.2.6. OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA

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

Statistično analizo smo izvedli s programom IBM Statistical Package for Social Sciences za Windows (verzija 20.0; SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA). Naredili smo parametrični test enofaktorske analize variance, s katerim smo ugotavljali ali je proučevan parameter v eksperimentih s PEU različen od kontrole oz. tretiranja z VPA oz. s CBZ. Za post-hoc



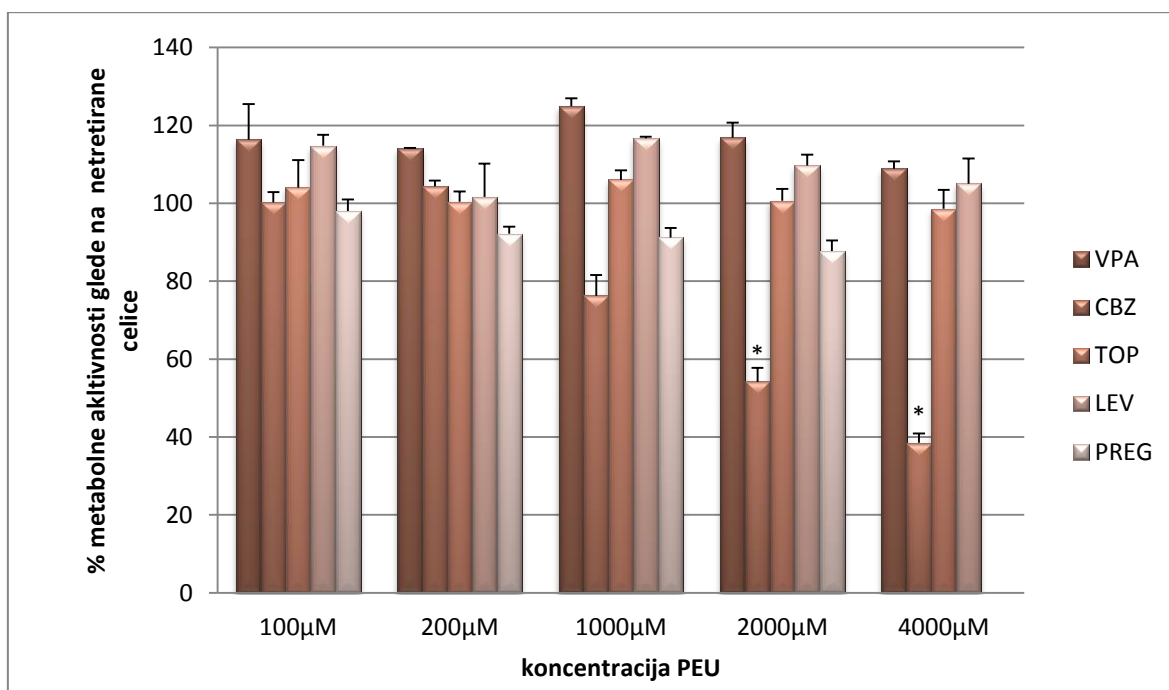
multiple primerjave smo na osnovi Levenovega testa, s katerim smo preverjali enakost varianc primerjalnih skupin, uporabili Tukeyev HSD ali Games-Howell test. Kot statistično značilne smo upoštevali p vrednosti, ki so bile manjše od 0,05 (47).

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. KRATKOTRAJNA IZPOSTAVLJENOST

#### 4.1.1. TEST METABOLNE AKTIVNOSTI MTS

Z MTS testom metabolne aktivnosti smo želeli določiti najvišje necitotoksične koncentracije PEU. Učinkovine so v visokih koncentracijah namreč toksične za celice, mi pa smo jih želeli uporabiti v koncentracijah, ki še ne vplivajo na viabilnost celic in se s tem želeli izogniti vplivu mrtvih (oz. metabolno nekativnih) celic na rezultat. Celice THP-1 smo tako 24 h tretirali z različnimi koncentracijami PEU, njihovo metabolno aktivnost pa ovrednotili glede na netretirano kontrolo. Rezultati so predstavljeni na sliki 9.

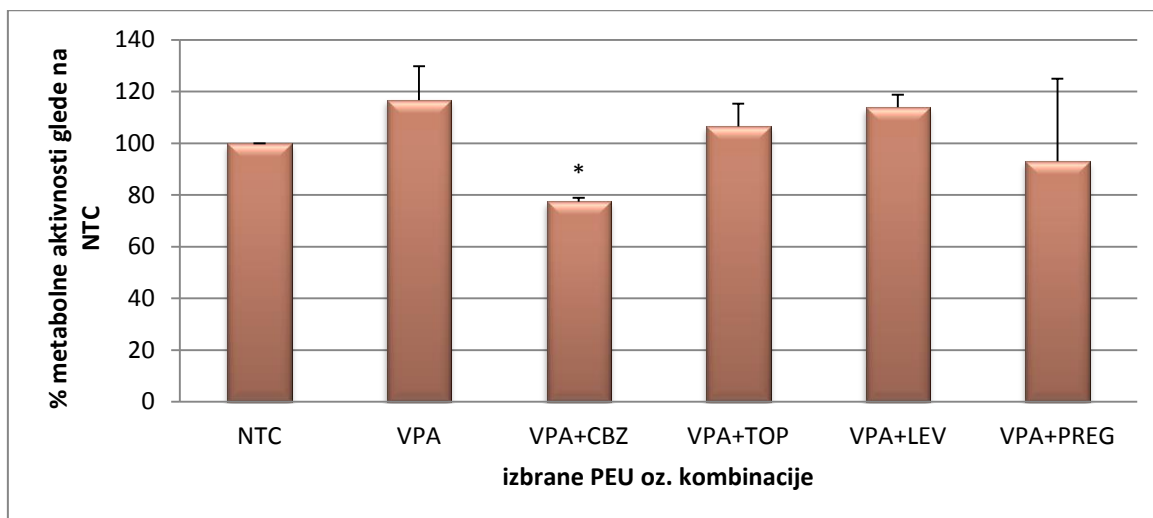


Slika 9. Odstotek metabolne aktivnosti celic po 24h tretiranju s različnimi koncentracijami PEU. \* $p < 0,05$  glede na NTC. N=2.

VPA, TOP, LEV in PREG v izbranih koncentracijah ne vplivajo na metabolno aktivnost celic, saj ta ostaja okoli 100% pri vseh poskusih. Medtem pa CBZ izkazuje koncentracijsko odvisen upad metabolne aktivnosti, ki se začne pri 1000  $\mu$ M in se stopnjuje z naraščanjem koncentracije.

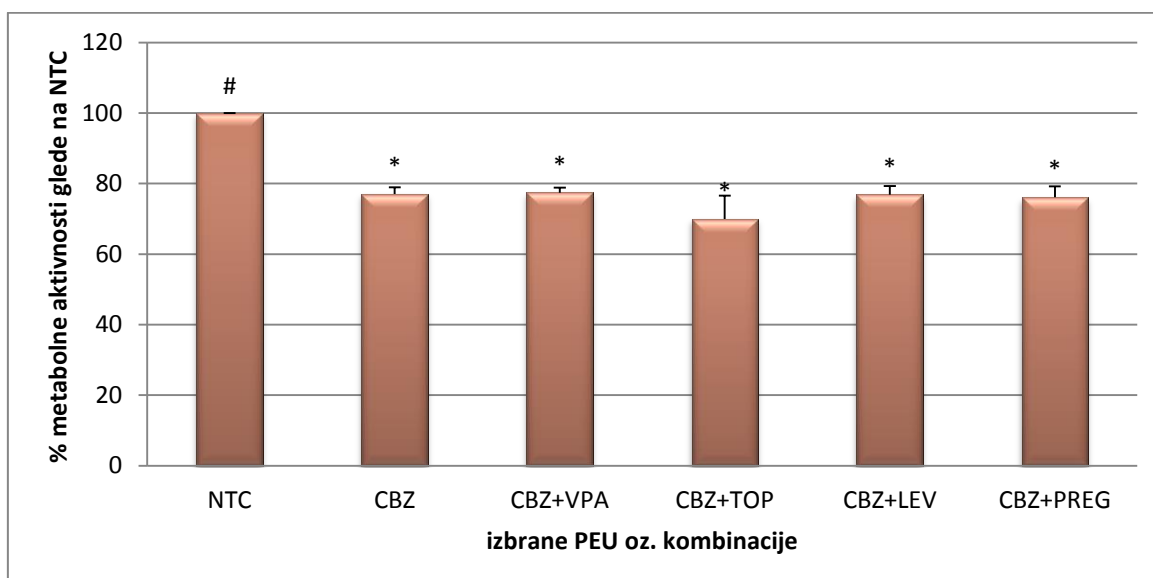
Na podlagi zgornjih rezultatov smo določili maksimalne koncentracije, ki še ne vplivajo na metabolno aktivnost celic. To so **4mM VPA**, **1mM CBZ**, **4mM TOP**, **4mM LEV** in **2mM PREG**. Z izbranimi koncentracijami PEU smo ponovno tretirali celice, pri čemer

smo jih tretirali tudi z njihovimi kombinacijami, in spet ovrednotili vpliv na metabolno aktivnost.



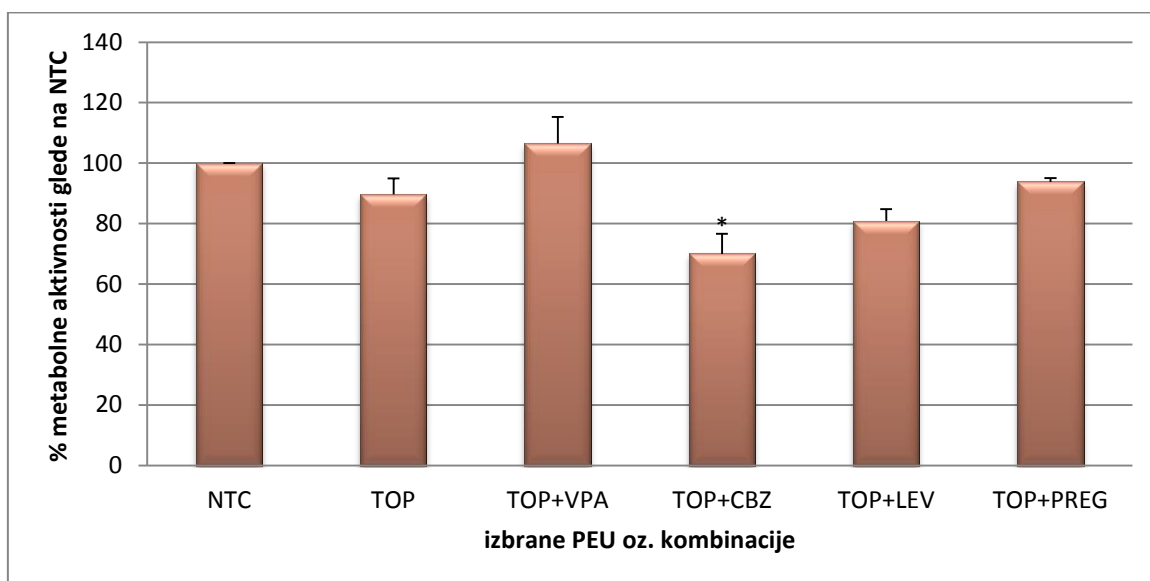
Slika 10. Metabolna aktivnost celic THP-1 glede na netretirano kontrolo po 24h tretiranju z VPA in njenimi kombinacijami. Uporabljene koncentracije: VPA 4 mM, CBZ 1 mM, TOP 4 mM, LEV 4 mM, PREG 2 mM. \* $p < 0,05$  glede na NTC. # $p < 0,05$  glede na VPA. N=2.

S slike 10 je razvidno, da CBZ v kombinaciji z VPA statistično značilno zniža metabolno aktivnost celic THP-1 v primerjavi z NTC. Izpostavljenost celic VPA ne vpliva statistično značilno na metabolno aktivnost celic v primerjavi z NTC. Prav tako ne pride do značilne spremembe v metabolni aktivnosti celic med tretiranjem samo z VPA in kombinacijo z VPA in še eno PEU.



Slika 11. Metabolna aktivnost celic THP-1 glede na netretirano kontrolo po 24h tretiranju s CBZ in njegovimi kombinacijami. Uporabljene koncentracije: VPA 4 mM, CBZ 1 mM, TOP 4 mM, LEV 4 mM, PREG 2 mM. \* $p < 0,05$  glede na NTC. # $p < 0,05$  glede na CBZ. N=2.

Tretiranje celic s CBZ ter s kombinacijami s CBZ povzroči statistično značilen upad metabolne aktivnosti celic glede na NTC. Če CBZ dodamo še eno PEU, se metabolna aktivnost celic ne spremeni bistveno v primerjavi s tretiranjem le s CBZ.

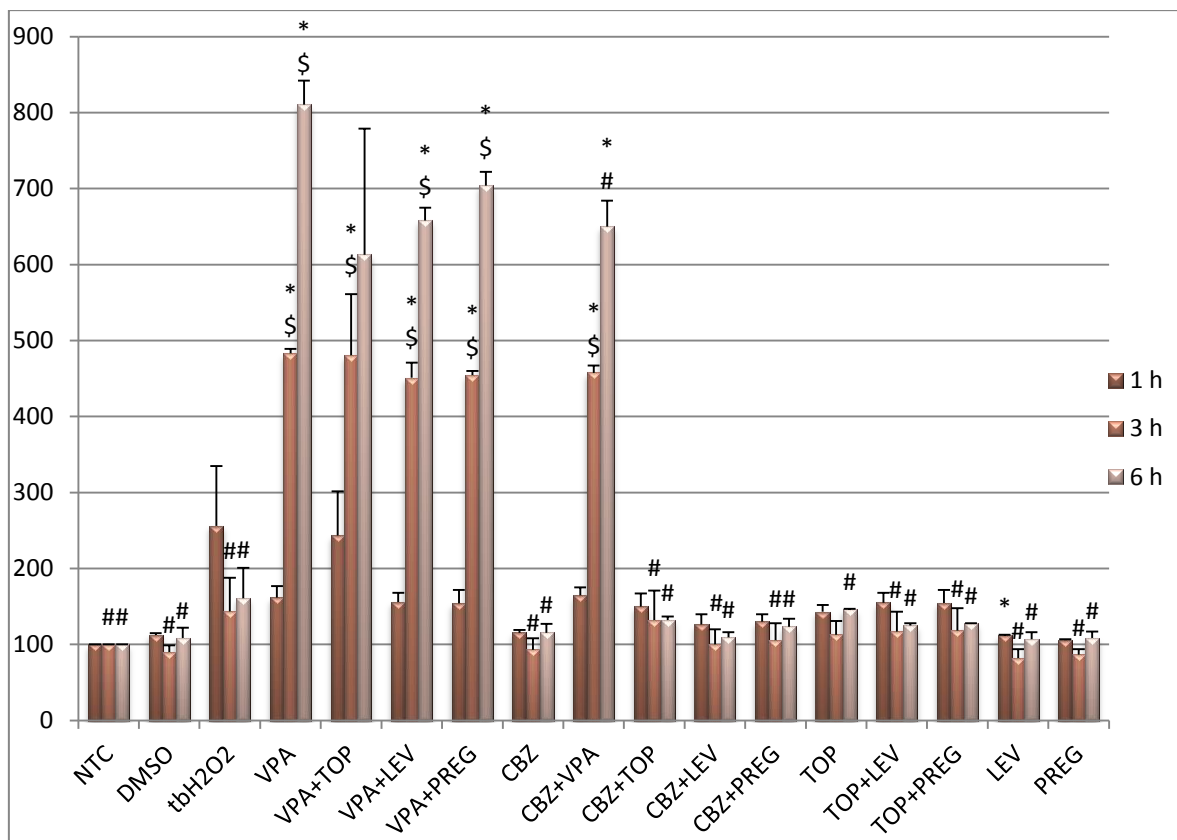


Slika 12. Metabolna aktivnost celic THP-1 glede na netretirano kontrolo po 24h tretiranju s TOP in njegovimi kombinacijami. Uporabljene koncentracije: VPA 4 mM, CBZ 1 mM, TOP 4 mM, LEV 4 mM, PREG 2 mM. \* $p < 0,05$  glede na NTC. # $p < 0,05$  glede na TOP. N=2.

Tretiranje celic s kombinacijami s TOP ne privede do statistično značilnih razlik v primerjavi s tretiranjem samo s TOP. V primerjavi z NTC pride do značilnega upada metabolne aktivnosti le po tretiranju celic s kombinacijo TOP+CBZ.

#### 4.1.2. REAKTIVNE KISIŠKOVE ZVRSTI

Oksidativni stres predstavlja porušeno ravnotežje med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno obrambo, pomaknjeno v korist oksidantov. Lahko je posledica znižanega nivoja antioksidantov ali povečane tvorbe reaktivnih zvrsti. Zvišana koncentracija ROS poruši fiziološko delovanje celice, poškoduje celične proteine, lipide in nukleinske kisline (22). Vpliv tretiranja celic z maksimalnimi necitotoksičnimi koncentracijami PEU na nastajanje ROS v celicah THP-1 smo določili s pretočno citometrijo in rezultati so predstavljeni na sliki 13.



Slika 13. Odstotek ROS v celicah THP-1 glede na netretirane celice po 1h, 3h in 6h tretiranju z maksimalnimi necitotoksičnimi koncentracijami PEU. \* $p < 0,05$  glede na NTC. # $p < 0,05$  glede na VPA. \$ $p < 0,05$  glede na CBZ. N=2.

Z zgornjega grafa je razvidno, da PEU povišajo koncentracijo ROS v celicah. Najbolj izrazito povišanje opazimo pri VPA, ki ROS močno dvigne že po 1h inkubaciji. Koncentracija ROS se s časom še viša in po 6 h je že 8x višja kot pri netretiranih celicah. Če VPA kombiniramo z učinkovinami prve ali druge generacije, prav tako opazimo povišanje ROS, le da je v teh primerih povišanje nekoliko manjše kot pri sami VPA. Tudi pri kombinacijah z VPA opazimo naraščanje ROS s časom inkubacije. Drugi predstavnik prve generacije PEU, CBZ, na povišanje ROS ne vpliva toliko, da bi bila razlika med koncentracijo ROS v NTC in celicah, tretiranih s CBZ, statistično značilna. Do razlik glede na NTC ne pride tudi, kadar je CBZ uporabljen v kombinaciji s predstavniki druge generacije. Podobno tudi predstavniki druge generacije, sami ali v kombinacijah, ROS ne zvišajo bistveno. Pri CBZ in predstavnikih druge generacije prav tako ni opaziti, da bi ROS naraščali s časom inkubacije.

Naši rezultati se skladajo z rezultati *Pukšič et al*, kjer so tudi dokazali, da VPA s časom inkubacije povzroči naraščanje koncentracije ROS, medtem ko CBZ njihove koncentracije ne spremeni. Kratkotrajen vpliv CBZ na koncentracijo ROS so proučevali tudi *Araujo et*

al, kjer so prav tako ugotovili, da CBZ po 24 h v celicah ne dvigne njihove koncentracije (48, 49). Medtem pa so *Pavone et al* v svoji študiji ugotovili, da 48 h tretiranje podganjih astrocitov s CBZ, TOP in LEV privede do dviga ROS v celicah v primerjavi z NTC (50).

#### 4.1.3. NEENCIMSKI ANTIOKSIDANT GLUTATION

Glutation je pomemben endogeni neencimski antioksidant. V svoji reducirani obliki (GSH) deluje kot kofaktor glutacione peroksidaze, obenem pa lahko donira elektron reaktivnim zvrstem in jih tako stabilizira. S tem sam postane reaktiven, a se preko tiolnih skupin takoj poveže z drugim, enakim reaktivnim glutationom v glutacione disulfid (GSSG), ki je oksidirana oblika glutaciona. Tako se v stanju oksidativnega stresa ravnotežje med GSH in GSSG premakne v smer GSSG in posledično se razmerje GSH/GSSG zniža.

**Preglednica XIX. Razmerje GSH/GSSG glede na netretirano kontrolo po 24h izpostavljenosti celic THP-1 maksimalnim necitotoksičnim koncentracijam PEU. \* $p < 0,05$  glede na netretirano kontrolo. N=3.**

	razmerje PEU/NTC [%]	SD	p-vrednost na NTC
NTC	100	0	/
VPA	58	23	0,69
VPA+CBZ	59	19	0,563
VPA+TOP	77	12	0,333
VPA+LEV	99	12	1
VPA+PREG	76	16	0,54
CBZ	75	3	0,099
CBZ+TOP	56	10	0,134
CBZ+LEV	82	7	0,558
CBZ+PREG	45	10	0,067
TOP	83	7	0,777
LEV	84	11	0,515
PREG	98	2	1
DMSO	82	10	0,552

Iz preglednice XIX je razvidno, da vse PEU znižajo razmerje GSH/GSSG, kar nakazuje na prisotnost oksidativnega stresa v celicah. Pri tretiranju z eno PEU največji upad vidimo pri VPA in CBZ, ki oba pripadata prvi generaciji PEU, močan upad je razviden tudi pri njuni kombinaciji. Kljub temu pa statistična analiza ni pokazala, da bi bile razlike v tretiranih celicah značilno manjše v primerjavi z NTC. *Martinc et al* so v klinični študiji, kjer so primerjali parametre oksidativnega stresa v bolnikih, ki se zdravijo s PEU starejše oz. novejšje generacije, ugotovili, da razmerje GSH/GSSG najbolj zniža politerapija, pri kateri pacienti prejemajo PEU iz prve in druge generacije hkrati (51). Pri nas njihovo ugotovitev podpira tretiranje celic s CBZ+PREG, kjer je razmerje najmanjše. Sicer pa kombinacija VPA in PEU druge generacije nekoliko zviša razmerje GSH/GSSG v primerjavi s tretiranjem samo z VPA, medtem ko kombinacija CBZ s PEU druge generacije izkazuje bolj mešan učinek na razmerje GSH/GSSG v primerjavi s tretiranjem samo s CBZ.

#### 4.1.4. ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI

##### 4.1.4.1. KATALAZA

CAT razgrajuje reaktivni  $H_2O_2$  na vodo in molekularni kisik. *Röhrdanz et al* so v svojih študijah pokazali, da  $H_2O_2$  kot stimulator oksidativnega stresa po 24 h zviša ekspresijo mRNA za CAT v podganjih astrocitih in hepatocitih, a ne poveča njene aktivnosti (52, 53). *Martinc et al* so v klinični študiji pokazali, da aktivnost CAT pri bolnikih v njihovih eritrocitih naraste v primerjavi z zdravimi osebami. Aktivnost CAT je bila največja pri bolnikih, ki so bili na terapiji s PEU prve generacije (51).

**Preglednica XX.** Aktivnost katalaze v celicah THP-1 glede na netretirano kontrolo po 24h izpostavljenosti celic THP-1 maksimalnim necitotoksičnim koncentracijam PEU. \* $p < 0,05$  glede na netretirano kontrolo. N=3.

	razmerje ZU/NTC [%]	SD	p-vrednost na NTC
NTC	100	0	/
VPA	92	8	1
VPA+CBZ	97	15	1
VPA+TOP	88	24	0,992
VPA+LEV	93	20	0,999
VPA+PREG	81	9	0,967
CBZ	94	23	1

CBZ+TOP	110	42	1
CBZ+LEV	81	10	0,973
CBZ+PREG	83	21	0,984
TOP	77	19	0,848
LEV	71	16	0,754
PREG	64	18	0,645
DMSO	80	12	0,945

Naši rezultati se ne skladajo s prejšnjimi študijami, saj so PEU v naših poskusih povzročile upad aktivnosti CAT. Upad aktivnosti je največji pri tretiranju s PEU druge generacije. Manjši upad aktivnosti opazimo po izpostavitvi celice PEU prve generacije ali kombinacijam učinkovin. Kljub temu da so aktivnosti upadle, pa razlike med vzorci in netretirano kontrolo niso tako velike, da bi bile statistično značilne.

#### 4.1.4.2. SUPEROKSID DISMUTAZA

SOD odstranjuje superoksidni radikal tako, da ga pretvori v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in molekularni kisik. Predhodne študije o vplivu oksidativnega stresa in PEU na aktivnost SOD so dale podobne rezultate kot pri CAT. *Röhrdanz et al* so ugotovili, da v primeru, ko podganje astrocite in hepatocite za 24 h izpostavimo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ali parakvatu, ekspresija mRNA za SOD naraste, ne pride pa do spremembe aktivnosti SOD. *Martinc et al* pa so pokazali, da pri bolnikih na terapiji s PEU aktivnost SOD v polni krvi naraste v primerjavi z zdravimi osebami (51, 52, 53).

**Preglednica XXI. Aktivnost SOD v celicah THP-1 glede na netretirano kontrolo po 24h izpostavljenosti celic THP-1 maksimalnim necitotoksičnim koncentracijam PEU. \*p<0,05 glede na netretirano kontrolo. N=3.**

	razmerje ZU/NTC [%]	SD	p-vrednost
NTC	100	0	/
VPA	91	54	0,999
VPA+CBZ	120	66	1
VPA+TOP	64	30	0,748
VPA+LEV	158	69	0,992



VPA+PREG	60	26	0,762
CBZ	79	41	0,966
CBZ+TOP	92	44	0,999
CBZ+LEV	106	18	1
CBZ+PREG	28	11	0,4
TOP	150	81	1
LEV	55	3	0,648
PREG	78	10	1
DMSO	54	0	/

Tako kot pri CAT se tudi pri SOD naši rezultati ne ujemajo s predhodnimi študijami. Nobena izmed PEU ni statistično značilno povišala aktivnosti SOD, večinoma so njene koncentracije upadle glede na netretirano kontrolo. Z rezultati CAT se najbolj skladajo rezultati po tretiranju z LEV in PREG, kjer pride do upada aktivnosti SOD. Sklepamo, da je 24 h izpostavljenost celic prekratek čas, da bi se aktivnost encimov spremenila pod vplivom PEU. Problem zgornjih rezultatov je, da so zelo razpršeni in so SD visoke, zaradi česar ne moremo pravilno ovrednotiti vpliva PEU na aktivnost SOD.

Kljub temu pa zgornje rezultate CAT in SOD lahko povežemo s prejšnjimi študijami. Povečana ekspresija mRNA še ne pomeni večje aktivnosti encima, saj je za to potrebna še sinteza encima. 24 h izpostavljenost celic oksidativnemu stresu res lahko poviša transkripcijo genov in ekspresijo mRNA, za sintezo encimov in s tem višjo aktivnost pa je potreben daljši čas, zato je upravičeno pričakovati, da bi se aktivnost encimov povišala po dolgotrajneši izpostavljenosti celic PEU. S tem bi se verjetno približali rezultatom klinične študije *Martinc et al*, saj so bili v tem primeru bolniki na kronični terapiji s PEU (51). Predvidevamo lahko tudi, da akutni oksidativni stres (24 h izpostavljenost celic PEU) povzroči kratkotrajno oslabitev obrambnih mehanizmov in šele čez nekaj časa pride do odgovora mehanizma na stres – ekspresija genov, ki stimulirajo porast obrambnih mehanizmov.

#### 4.1.5. KAZALNIK LIPIDNE PEROKSIDACIJE MALONDIALDEHID

MDA je kazalnik lipidne peroksidacije, ki je posledica interakcije ROS s PMK v celičnih membranah. Ko pride do oksidativnega stresa, se koncentracija ROS v celici poveča in posledično se zviša tudi število interakcij ROS s PMK in zato nastane več MDA, preko katerega lahko ovrednotimo obseg lipidne peroksidacije. V preglednici XXII je prikazan vpliv PEU na nastanek MDA v celicah THP-1 po 24 h inkubaciji.

**Preglednica XXII. Odstotek MDA v celicah THP-1 glede na netretirane celice po 24h tretiranju z maksimalnimi necitotoksičnimi koncentracijami PEU. \*p<0,05 glede na NTC. #p<0,05 glede na VPA. \$p<0,05 glede na CBZ. N=3.**

	razmerje PEU/NTC [%]	SD	p-vrednost na NTC	p-vrednost na VPA	p-vrednost na CBZ
NTC	100	0	/	0,999	0,93
VPA	114,44	3,8	0,999	/	0,7
VPA+CBZ	64,20	15,4	0,792	0,6	1,0
VPA+TOP	73,23	21,0	0,66	0,5	1,0
VPA+LEV	88,16	7,8	0,994	0,8	1,0
VPA+PREG	82,15	22,9	0,925	0,7	1,0
CBZ	76,40	14,7	0,93	0,7	/
CBZ+TOP	44,23	6,3	0,245	0,2	0,8
CBZ+LEV	67,06	8,0	0,471	0,4	1,0
CBZ+PREG	46,33	9,5	0,223	0,2	0,7
TOP	83,42	7,3	0,905	0,7	1,0
LEV	95,40	21,0	1	1,0	1,0
PREG	97,78	2,2	1	1,0	1,0
DMSO	79,35	6,2	0,863	0,6	1,0

Do zvišanja koncentracije MDA pride le po tretiranju celic z VPA, kar sovpada z našimi rezultati, da VPA najbolj stimulira generacijo ROS in zaradi tega je največji obseg lipidne peroksidacije tu pričakovan. Zaradi visoke SD pa ta razlika ni statistično značilna. Kljub temu pa trend rezultatov nakazuje, da VPA povzroči lipidno peroksidacijo. Z večjim

številom bioloških ponovitev bi SD lahko zmanjšali in pravilneje ovrednotili vpliv VPA na lipidno peroksidacijo. Čeprav smo po tretiranju celic s kombinacijami drugih VPA in drugih PEU dokazali povišanje ROS, pa te kombinacije ne povzročajo lipidne peroksidacije in izničijo vpliv VPA. Medtem ko predstavniki novejših generacij ne vplivajo na lipidno peroksidacijo (koncentracija MDA ostaja blizu netretirane kontrole), pa CBZ izkazuje celo manjši vpliv na lipidno peroksidacijo kot je pri netretirani kontroli, saj koncentracija MDA upade. Če CBZ uporabimo v kombinaciji s predstavniki druge generacije PEU, se koncentracija MDA še zmanjša. Kljub jasno vidnim trendom pa razlike med rezultati (glede na NTC ter tretiranje z VPA in CBZ) niso tako velike, da bi bile statistično značilne.

Naši rezultati se v meritvah MDA ne skladajo z rezultati prejšnjih študij na celičnih modelih. *Pavone et al.* so ugotovili, da CBZ, LEV in TOP precej zvišajo MDA po 48h tretiranju podganjih astrocitov (50). Zvišanje MDA po tretiranju s TOP v primerjavi z NTC podpirajo tudi rezultati študije na miših, ki so jo izvedli *Agarwal et al* (54). Nasprotno pa kažejo rezultati prejšnjih študij naše fakultete. V diplomskem delu *Pukšič et al* so celice THP-1 prav tako za 24 h izpostavili CBZ in VPA, pri čemer niso opazili statistično značilnega razlike v koncentraciji MDA glede na NTC. Kljub temu je trend njihovih rezultatov nakazal, da CBZ nekoliko zmanjša koncentracijo MDA, medtem ko jo VPA poviša, kar se sklada z rezultati naše študije (48).

Problem rezultatov po kratkotrajni izpostavljenosti celic je, da so razlike med vzorci in netretirano kontrolo majhne, standardne deviacije pa visoke in zato rezultati niso statistično značilno različni od kontrole. Kljub temu pa sklepamo, da povprečne vrednosti rezultatov in njihov trend pravilno opisujejo vpliv PEU na celice. Velike standarne deviacije bi lahko zmanjšali z večjim številom bioloških ponovitev. Predvidevamo, da bi nato dobili večje statistične razlike in tako pravilneje ovrednotili rezultate.

## 4.2. DOLGOTRAJNA IZPOSTAVLJENOST

### 4.2.1. REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI

Celice *in vivo* niso kratek čas izpostavljene visokim koncentracijam PEU, ampak so kronično izpostavljene njihovim terapevtskim koncentracijam:

- VPA: terapevtske koncentracije 346–693  $\mu\text{M}$ , naša izbrana koncentracija 700  $\mu\text{M}$
- CBZ: terapevtske koncentracije 17–51  $\mu\text{M}$ , naša izbrana koncentracija 50  $\mu\text{M}$

- TOP: terapevtske koncentracije 14,7– 58,9  $\mu\text{M}$ , naša izbrana koncentracija 60  $\mu\text{M}$
  - LEV: terapevtske koncentracije 70-270  $\mu\text{M}$ , naša izbrana koncentracija 300  $\mu\text{M}$
  - PREG: terapevtske koncentracije 5,4 –89,2  $\mu\text{M}$ , naša izbrana koncentracija 100  $\mu\text{M}$
- (18).

Da bi pravilneje ovrednotili *in vivo* vpliv PEU, smo celice THP-1 za en, dva in tri tedne izpostavili terapevtskim koncentracijam posameznih PEU in nato v njih pomerili nastanek ROS. Ker smo pri kratkotrajnih tretiranjih s kombinacijami VPA tudi opazili povišanje ROS, smo se za te kombinacije odločili tudi tokrat. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXIII.

**Preglednica XXIII.** Določanje ROS v celicah THP-1, ki so bile 1, 2 oz. 3 tedne izpostavljene PEU. Uporabljene koncentracije: VPA 700 $\mu\text{M}$ ; CBZ 50 $\mu\text{M}$ ; TOP 60 $\mu\text{M}$ , LEV 300 $\mu\text{M}$ ; PREG 100 $\mu\text{M}$ . \* $p < 0,05$  glede na netretirano kontrolo. # $p < 0,05$  glede na VPA. VPA in kombinacije po enem tednu: N=3. Ostale monoterapije po enem, dveh in treh tednih: N=1.

	1 teden			2 tedna		3 tedni
	ZU/NTC [%]	SD	p-vrednost na NTC	p-vrednost na VPA		
NTC	100	/	/	1,000	100	100
VPA	120	19	1,000	/	136	128
VPA+CBZ	94	35	0,999	0,999	/	/
VPA+TOP	141	8	1,000	1,000	/	/
VPA+LEV	88	61	1,000	1,000	/	/
VPA+PREG	141	27	0,999	0,999	/	/
CBZ	96	/	/	/	89	106
TOP	107	/	/	/	97	94
LEV	90	/	/	/	94	108
PREG	105	/	/	/	88	82

Z zgornje preglednice vidimo, da količina ROS s časom inkubacije ne narašča, saj se vrednosti med eno-, dvo- in tritedensko inkubacijo ne razlikujejo bistveno. To smo ugotovili že po prvi biološki ponovitvi, zato poskusa z dvo- in tritedensko inkubacijo nismo ponavljali. Po enotedenski inkubaciji smo ugotovili, da od samostojnih tretiranj ROS dvigne samo VPA in zato poskusov z ostalimi PEU nismo ponovili. Opazili pa smo, da kombinaciji VPA s TOP oz. PREG še dvigneta nivo ROS, medtem ko ga kombinaciji z LEV in CBZ nekoliko znižata.

#### 4.2.2. KAZALNIK LIPIDNE PEROKSIDACIJE: MALONDIALDEHID

Pri merjenju ROS po enotedenskem tretiranju z VPA in njenimi kombinacijami smo opazili, da ROS večinoma naraščajo, vendar smo pri meritvah dobili velike standardne deviacije. Zato smo se odločili, da po tretiranju z VPA, VPA+CBZ in VPA+PREG pomerimo še MDA, kazalnik lipidne peroksidacije (preglednica XXIV).

**Preglednica XXIV. Odstotek MDA v celicah THP-1 glede na netretirane celice po enotedenskem tretiranju s PEU. Uporabljene koncentracije: VPA 700 $\mu$ M; CBZ 50 $\mu$ M; PREG 100 $\mu$ M. \* $p < 0,05$  glede na NTC. N=2.**

	razmerje PEU/NTC [%]	SD	p-vrednost glede na NTC	p-vrednost glede na VPA
NTC	100	0	/	0,78
VPA	169	9	0,78	/
VPA + CBZ	178	30	0,80	1,00
VPA + PREG	160	3	0,79	1,00

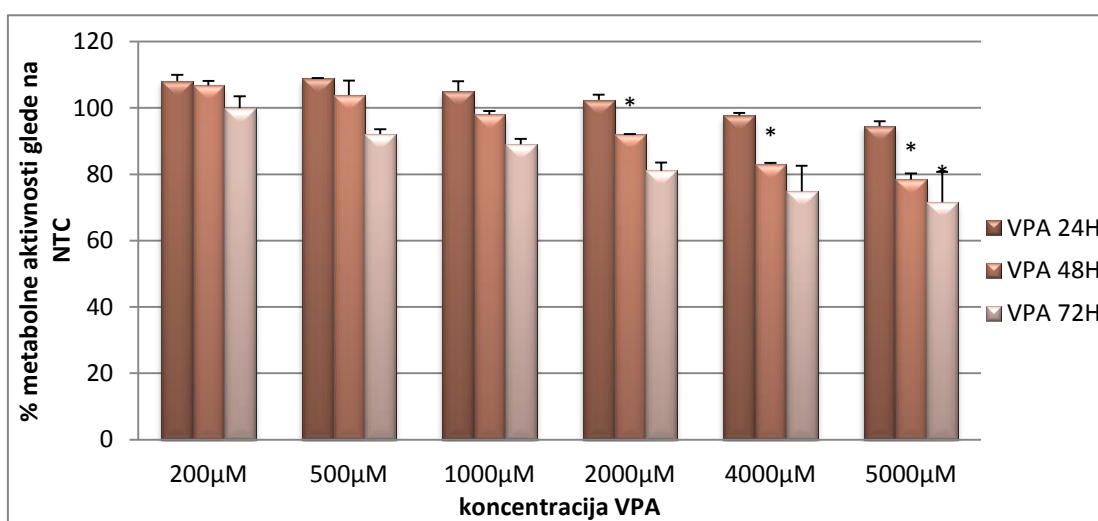
Enotedenska izpostavljenost celic terapevtskim koncentracijam izbranih kombinacij PEU močno dvigne koncentracijo MDA glede na kontrolni vzorec, kar sovpada s povišano koncentracijo ROS pri tretiranju z VPA in VPA+PREG. Kombinacija VPA+CBZ sicer ni izkazala povišane koncentracije ROS pri povprečenju rezultatov, a zaradi visoke standardne deviacije in velikega obsega lipidne peroksidacije lahko sklepamo, da so ROS vseeno prisotni v visoki koncentraciji. V primerjavi s tem, koliko se MDA dvigne po 24h tretiranju celic z maksimalnimi necitotoksičnimi koncentracijami PEU, so tu rezultati precej višji. Pri kratkotrajnem tretiranju celic MDA dvigne le VPA in to za precej nižji odstotek kot pri dolgotrajnem tretiranju. Sklepamo, da je nastanek MDA iz PMK dolgotrajen proces, ki traja več kot 24 h in se zato bolje izrazi po dolgotrajnejšem tretiranju. V tem primeru se naši rezultati skladajo s podatki klinične študije, ki so jo izvedli Martinc et al (51).

Večji obseg lipidne peroksidacije nakazuje na prisotnost oksidativnega stresa v celicah in da bi to lahko potrdili, bi v celicah, ki so bile en teden izpostavljene terapevtskim koncentracijem PEU, morali pomeriti še encimske in neencimske antioksidante in druge markerje oksidativnih poškodb (npr. protein karbonile). Tako bi rezultate na celičnem modelu verjetno lažje primerjali z rezultati raziskav na bolnikih, ki so na kronični terapiji s PEU.

## 4.3. VPLIV METABOLITOV

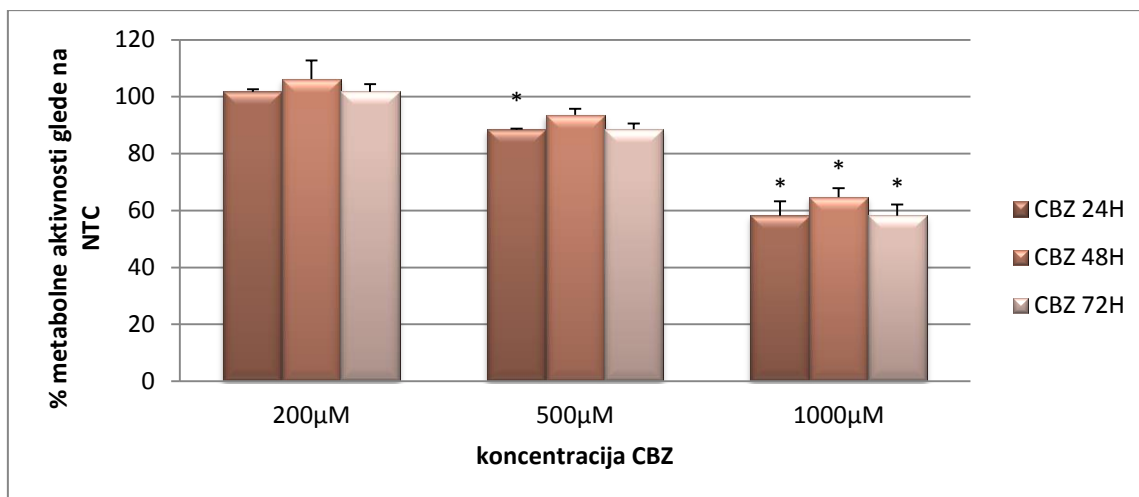
### 4.3.1. DOLOČANJE MAKSIMALNE NECITOTOKSIČNE KONCENTRACIJE PEU S TESTOM MTS NA CELICAH HEP-G2

Celice Hep-G2 smo želeli uporabiti za presnovo izbranih PEU v njihove metabolite. Pri tem smo se odločili za VPA, CBZ in PREG, ki so izkazali povišanje ROS in MDA po dolgotrajnem tretiranju. Da na celicah ne bi inkubirali citotoksične koncentracije PEU, smo določili njihove maksimalne necitotoksične koncentracije s testom MTS. Ker je proces presnove PEU dolgotrajen proces in moramo zato PEU inkubirati dalj časa, smo MTS pomerili po 24 h, 48 h in 72 h inkubaciji (PREG samo 24 h in 48 h).



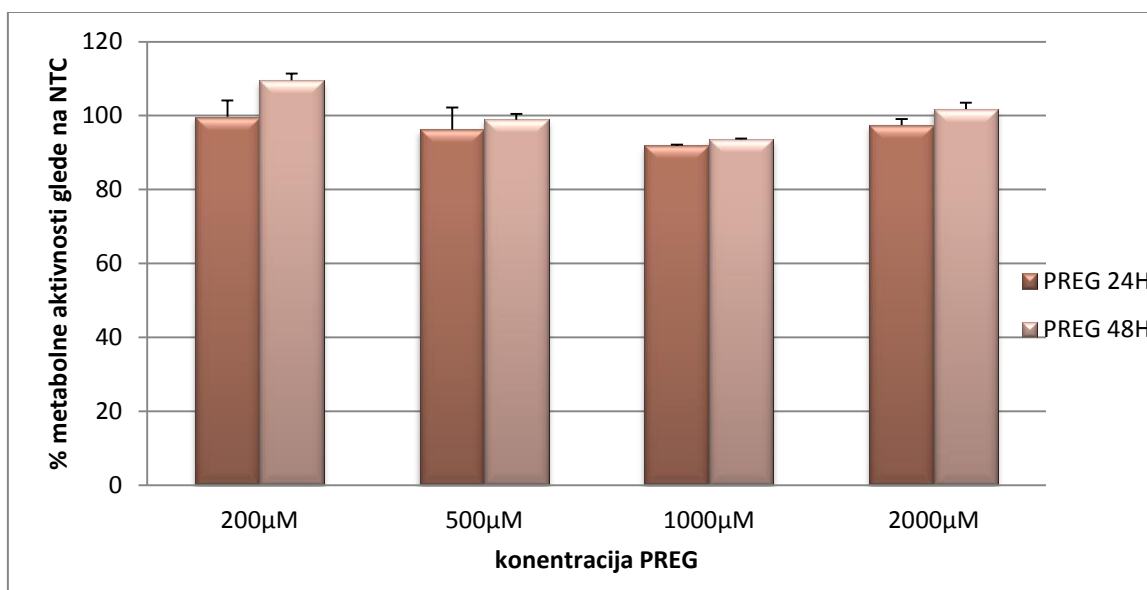
Slika 14. Odstotek metabolne aktivnosti celic Hep-G2 po 24h, 48h in 72h tretiranju s različnimi koncentracijami VPA. \* $p < 0,05$  glede na NTC. N=2.

Tretiranje z VPA izkazuje časovno in koncentracijsko odvisni upad metabolne aktivnosti. Po 24 h inkubaciji je upad metabolne aktivnosti tudi pri najvišji uporabljeni koncentraciji zelo nizek, po 72 h pa se presnovna aktivnost precej bolj zniža. Zaradi predvidene 72 h inkubacije PEU na Hep-G2 pri nadaljnjih poskusih nas je zanimalo predvsem katera je maksimalna necitotoksična koncentracija VPA po 72 h in odločili smo se za **1000 µM** (tu se metabolna aktivnost celic še ne spusti pod 80 %).



Slika 15. Odstotek metabolne aktivnosti celic Hep-G2 po 24h, 48h in 72h tretiranju s različnimi koncentracijami CBZ. \* $p < 0,05$  glede na NTC. N=2.

Tretiranje s CBZ izkazuje koncentracijsko odvisno citotoksičnost, ki pa ni odvisna od časa inkubacije. Tu smo testirali le koncentracije do 1000µM, saj smo pri višjih koncentracijah opazili, da niso topne v mediju. Zaradi tega pride do tvorbe kristalov CBZ v mediju in koncentracija ni več reprezentativna. Kot maksimalno necitotoksično koncentracijo CBZ smo izbrali **500 µM**.



Slika 16. Odstotek metabolne aktivnosti celic Hep-G2 po 24h in 48h tretiranju s različnimi koncentracijami PREG. N=2.

Tretiranje s PREG ne izkazuje ne časovno ne koncentracijsko odvisne citotoksičnosti. Na podlagi tega smo kot maksimalno necitotoksično koncentracijo PREG smo izbrali 2000 µM. Vsekakor bi bilo smiselno izvesti še poskus s 72 h inkubacijo.

#### 4.3.2. DOLOČANJE ROS V CELICAH THP-1 S PRETOČNO CITOMETRIJO PO TRETIRANJU Z METABOLITI PEU

Na podlagi prejšnjih študij predpostavljamo, da za nastanek oksidativnega stresa niso odgovorne samo PEU, temveč tudi njihovi metaboliti. Santos N.A.G. et al so v svoji študiji preučevali, kako PEU vplivajo na oksidativni stres v podganjih jetrnih mitohondrijih. Ugotovili so, da same učinkovine v mitohondrijih ne dvignejo koncentracije MDA. Če pa so PEU pred tem izpostavili metabolno aktivnim mikrosomom, so nato metabolizirane PEU dvignile koncentracijo MDA v mitohondrijih. Ugotovili so tudi, da le metabolno spremenjene PEU povzročijo upad koncentracije GSH v mitohondrijih (55). Lu Wei et al pa so v svoji študiji pokazali, da koncentracijo ROS v RAW celicah precej bolj kot CBZ dvigneta njegova metabolita 2-OH-CBZ in 3-OH-CBZ (56).

Zaradi tega smo želeli celice THP-1 tretirati z metaboliti, nato pa v njih pomeriti nastanek ROS kot kazalec oksidativnega stresa. Metabolite smo želeli pridobiti tako, da smo PEU v maksimalni necitotoksični koncentraciji (VPA 1000  $\mu$ M, CBZ 500  $\mu$ M, PREG 2000  $\mu$ M) inkubirali 72h na metabolno aktivnih celicah Hep-G2 in predpostavljali, da celice metabolite izločijo v okoliški medij. Nato pa smo medij z metaboliti prenesli na celice THP-1 in po 6 h in 24 h inkubaciji pomerili nastanek ROS.

**Preglednica XXV. Odstotek ROS v celicah THP-1 glede na netretirane celice po 6 h in 24 h tretiranju z metaboliti izbranih PEU, ki so jih celice Hep-G2 izločile v medij po 72h izpostavljenosti PEU. N=1.**

	razmerje metaboliti PEU/NTC	
	6h	24h
NTC	100	100
VPA	101	97
CBZ	103	90
PREG	113	115
VPA+CBZ	104	85
VPA+PREG	105	100

Tretiranje celic THP-1 z medijem s celic Hep-G2 ni povzročilo dviga ROS. Iz tega lahko sklepamo naslednje:

- Celice Hep-G2 ne metabolizirajo izbranih PEU;



- Celice Hep-G2 metabolizirajo PEU in metabolite izločijo v medij, vendar ti ne stimulirajo produkcije ROS;
- Celice Hep-G2 metabolizirajo PEU, vendar jih ne izločijo v okoliški medij.

V mediju, v katerem smo pričakovali metabolite, bi bilo smiselno določiti koncentracijo metabolitov in na podlagi teh rezultatov ugotoviti, ali metaboliti sodelujejo pri nastanku oksidativnega stresa. Prav tako bi bilo smiselno določiti koncentracijo metabolitov v celicah Hep-G2. Tako bi ugotovili, ali celice izločajo metabolite v okoliški medij ali ne. Če bi celice Hep-G2 tretirali z eno PEU in s kombinacijami PEU ter nato v teh celicah določili metabolite in rezultate med seboj primerjali, bi lahko ugotovili, ali pride pri politerapiji do spremembe metabolizma PEU v primerjavi z monoterapijo, kako se v tem primeru spremeni koncentracija metabolitov in kakšen je posledično vpliv na nastanek oksidativnega stresa v celicah.

## 5. SKLEP

V magistrski nalogi smo proučevali vpliv PEU na nastanek oksidativnega stresa na celicah THP-1. Ko smo celice za 1, 3 oz. 6 h izpostavili maksimalnim necitotoksičnim koncentracijam PEU, smo ugotovili, da le VPA znatno poveča koncentracijo ROS v celicah. Ob dodatku druge PEU koncentracija ROS ostaja precej višja kot v NTC, a je nekoliko nižja od celic, ki so bile tretirane le z VPA.

24 h tretiranje celic s PEU je pokazalo, da vse učinkovine in njihove kombinacije premaknejo ravnotežje glutationa v smer njegove oksidirane oblike, kar se značilno pojavi pri oksidativnem stresu. Pri meritvah encimskih antioksidantov razlik v aktivnosti CAT in SOD v primerjavi z NTC nismo uspeli statistično potrditi, prav tako pri teh rezultatih težko govorimo o trendih. Rezultati pri CAT nakazujejo na oslABLJENO aktivnost encimov, pri SOD pa je po nekaterih tretiranjih opaziti tudi dvig aktivnosti. Kazalnik lipidne peroksidacije, MDA, je pokazal trend zvišanja koncentracije le po tretiranju z VPA.

Enotedenska izpostavljenost celic THP-1 terapevtskim koncentracijam PEU ni izkazala povečane koncentracije ROS v celicah, je pa prišlo do povišanja koncentracije MDA v primerjavi z NTC. Večji obseg lipidne peroksidacije nakazuje na prisotnost oksidativnega stresa v celicah.

Tretiranje celic THP-1 z metaboliti PEU, ki smo jih dobili z inkubacijo PEU na metabolno aktivnih celicah Hep-G2, ni pokazalo dviga koncentracije ROS in tako ne moremo potrditi, da so metaboliti PEU udeleženi pri nastanku oksidativnega stresa.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko potrdimo prvo hipotezo:

- **Predstavnik prve generacije PEU povzročata večji oksidativni stres v celicah kot predstavnik druge generacije PEU:** *Hipotezo smo potrdili, saj VPA močno dvigne koncentracijo ROS ter nakazuje tudi trend zvišanja koncentracije MDA. CBZ pa tako kot VPA bolj zniža razmerje GSH/GSSG kot predstavnik druge generacije PEU.*

Drugo hipotezo smo uspeli le delno potrditi:

- **Kombinacija PEU prve in druge generacije povzroča manjši oksidativni stres na celicah kot izpostavitve le predstavnikom prve generacije:** *Hipotezo lahko potrdimo iz rezultatov merjenja ROS, saj je kombinacija VPA in PEU druge generacije zniža koncentracijo ROS v primerjavi s tretiranjem z VPA. Trend povprečnih rezultatov nakazuje, da če dodamo PEU druge generacije VPA ali CBZ, razmerje GSH/GSSG v večini primerov upade manj kot v primerjavi s tretiranjem le s PEU prve generacije. Kljub temu razlik nismo uspeli statistično potrditi in zato je potrebno izvesti dodatne poskuse.*

Zadnje hipoteze na podlagi rezultatov (še) ne moremo potrditi.

- **Kratkotrajna izpostavitve visokim koncentracijam PEU povzroči v celicah večji oksidativni stres kot dolgoročna izpostavitve terapevtskim koncentracijam PEU:** *po dolgotrajni izpostavljenosti celic terapevtskim koncentracijam PEU se koncentracija ROS v primerjavi z NTC ne dvigne toliko kot po kratkotrajni izpostavljenosti visokim koncentracijam PEU, poveča pa se obseg lipidne peroksidacije. Potrebne so nadaljnje študije.*

## 6. VIRI IN LITERATURA

1. Martinc B, Grabnar I, Vovk T: The role of reactive species in epileptogenesis and influence of antiepileptic drug therapy on oxidative stress. *Current Neuropharmacology* 2012; 10: 328-343.
2. Moshe SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T: Epilepsy: new advances. *The Lancet* 2014; 358(9971): 884-898.
3. Rowley S, Patel M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free radical biology and medicine* 2013; 62: 121 – 131.
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: *Pharmacology*, Churchill Livingstone, 5. izdaja, Edinburgh, 2003: 550-561.
5. Cvetko B: *Knjiga o epilepsiji, samozaložba, Rašica*, 1997: 18-73.
6. Appleton R E, Chappell B, Beirne M: *Epilepsija in vaš otrok*, Društvo Liga proti epilepsiji Slovenija, 2. izdaja, Ljubljana, 2011.
7. Lemke TL, Williams DA: *Foye's principles of medicinal chemistry*, 6th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2007: 521-546.
8. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: *Physiology*, 5. izdaja, Mosby, ZDA, 2003: 31-59.
9. Costanzo LS: *Physiology*, 2. izdaja, Williams & Wilkins, Filadelfija, ZDA, 1998: 13-51.
10. Brodie MJ, Sills GJ: Combining antiepileptic drugs – Rational polytherapy? *Seizure* 2011; 20: 369-375.
11. Brodie MJ: Antiepileptic drug therapy the sorry so far. *Seizure* 2010; 19: 650 – 655.
12. Sirven JI, Fife TD, Wingerchuk DM, Drazkowski JF: Second-generation antiepileptic drugs' impact on balance: a meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings* 2007; 82(1):40-47
13. Łuszczki JJ: Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacology reports* 2009; 61: 197-216.
14. Sheth RD, Stafstrom CE, Gsu D: Nonpharmacological Treatment Options for Epilepsy. *Seminars in Pediatric Neurology* 2005; 12:106-113.
15. Nanau RM, Neuman MG: Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clinical Biochemistry* 2013; 46:1323-338.
16. Bialer M: Chemical properties of antiepileptic drugs. *Advanced drug delivery reviews* 2012; 64: 887-895.

17. Ogungbenro K, Aarons L: A physiologically based pharmacokinetic model for valproic acid in adults and children. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 63:45-52.
18. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, and Perucca E: Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE commission on therapeutic strategies. *Epilepsia* 2008; 49: 1239-1276.
19. Mathieu O, Picot MC, Gelisse P, Brenton H, Demoly P, Hillaire-Buys D: Effects of carbamazepine and metabolites on IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$  secretion in epileptic patients: the influence of co-medication. *Pharmacological reports* 2011; 63:86-94.
20. Zgonc V, Čebular B: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Zdravniški vestnik* 2006; 75:379-88.
21. Potschka H: Pharmacological treatment strategies: Mechanisms of antiepileptic drugs. *Epileptology* 2013; 1:31-37.
22. Mravljak, Janez, Petrlin-Mašič, Lucija. Resnice in polresnice o antioksidantih. V: Vovk, Tomaž (ur.), Obreza, Aleš (ur.). *Prehranska dopolnila II : strokovno izobraževanje*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2010, str. 7-31.
23. Lushchak VI: Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological interactions* 2014; 224: 164-175.
24. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2007; 39:44-84.
25. Waldbaum S, Patel M: Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research* 2010; 88:2-45.
26. Boyer R: *Temelji biokemije*, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 449-486.
27. Knak Jensen SJ: Oxidative stress and free radicals. *Journal of molecular structure* 2003; 387-392.

28. Čvan M: Vpliv protiepileptičnih učinkovin na oksidativni stres v celični liniji limfocitov B. Diplomaska naloga, 2013.
29. Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Lo Bello M: Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International* 2015; 82:10-18.
30. Bellissimo MI, Amado D, Abdalla DSP, Ferreira EC, Cacalheiro EA, da Grac,a Naffah-Mazzacoratti M: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. *Epilepsy research* 2001; 46:121-128.
31. Oksidativni stres. [www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index.html](http://www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index.html)
32. Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E: Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Molecular Aspects of Medicine* 2011; 32:305-315.
33. Smith JA, Park S, Krause JS, Banik NL: Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochemistry International* 2013; 62:764-775.
34. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N: A revieww of recent study on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2005; 25:316-328.
35. Marnett LJ: Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 2002: 219-222.
36. Marnett LJ: Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* 1999; 424: 83-95.
37. Baraibar MA, Ladouce R, Friguet B: Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *Journal of proteomics* 2013; 92:63-70.
38. Tamarit J, de Hoogh A, Obis E, Alsina G, Cabisco E, Ros J: Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides. *Journal of proteomics* 2012; 75:3778-3788.
39. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003; 329:23–38.

40. Martinc B, Grabnar I, Vovk T: Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of the Current Status. *Current neuropharmacology* 2014; 12: 527-550.
41. Cardenas-Rodrigues N, Coballase-Urrutia E, Perez-Cruz C, Montesinos-Correa H, Rivera-Espinosa L, Sampieri A, Carmona-Aparicio L: Revelance of the glutathione system in temporal lobe epilepsy: evidence in human and experimental models- *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014. vol. 2014, Article ID 759293, 12 pages, 2014. doi:10.1155/2014/759293.
42. Shin EJ, Jeong JH, Chung YH, Kim WK, Ko KH, Bach JH, Hong JS, Yoneda Y, Kim HC: Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochemistry international* 2001; 59:122-137.
43. Fukuda M, Yamauchi H, Yamamoto H, Aminaka M, Murakami H, Kamiyama N, Miyamoto Y, Koitabaski Y: The evaluation od oxidative DNA damage in children with brain damage using 8- hydroxydeoxyguanosine levels. *Brain & Development* 2008; 30:131-136.
44. Jobe PC. Dailey JW: Genetically epilepsy-prone Rats (GEPRs) in drug research. *CNS Drug reviews* 2000; 6(3):241-260.
45. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ: THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology* 2013; 23(1): 37-45.
46. Celice HepG2. [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo\\_country=si](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=si). Dostopno april 2014.
47. Robnik B: Vrednotenje označevalcev oksidativnega stresa v celicah podvrženim protiepileptičnim učinkovinam. *Diplomska naloga*, 2013.
48. Pukšič P: Proučevanje vpliva starejše generacije protiepileptičnih učinkovin na nastanek oksidativnega stresa v celičnih linijah . *Diplomska naloga*, 2014.
49. Araujo IM, Ambrosio AF, Leal EC, Vardesca MJ, Malva JO, Soares da Silva P, Carvalho AP, Carvalho CM: Neurotoxicity induced by antiepileptic drugs in cultured hippocampal neurons: A comarative study between carmabazepine, oxcarbazepine and tew new putative antiepileptic drugs, BIA 2-024 and BIA 2-093. *Epilepsia* 2004; 45(12):1498-1505.

50. Pavone A, Cardile V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia*, 2003;44 Suppl 1:34–9.
51. Martinc B, Grabnar I, Lorber B, Vovk T. A comparison of oxidative stress in patients with epilepsy treated with older and newer generation antiepileptic drugs. Članek v pripravi.
52. Röhrdanz E, Schmuck G, Ohler S, Kahl R. The influence of oxidative stress on catalase and MnSOD gene transcription in astrocytes. *Brain research* 2001, 900:128-136.
53. Röhrdanz E, Kahl R: Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 1(24): 27-38.
54. Agarwal, N.B., Agarwal, N.K., Mediratta, P.K., Sharma, K.K: Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. *Seizure*, 2011; 20(3): 257-262.
55. Santos N.A.G., Medina W.S.G., Martins N.M., Carvalho Rodrigues M.A., Curti C., Santos A.C.: Involvement of oxidative stress in the hepatotoxicity induced by aromatic antiepileptic drugs. *Toxicology in vitro* 2008; 22: 1820-1824.
56. Lu W., Uetrecht J.P.: Peroxidase-Mediated Bioactivation of Hydroxylated Metabolites of Carbamazepine and Phenytoin. *Drug metabolism and disposition* 2008; 36: 1624 – 1636.