

Hepatotoksičnost valproata i valproične kiseline

Rozman, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:518969>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

HEPATOTOKSIČNOST VALPROATA I VALPROIČNE
KISELINE

HEPATOTOXICITY OF VALPROATE AND VALPROIC
ACID

SEMINARSKI RAD

Marija Rozman

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate study of Molecular biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Zagreb, 2018.

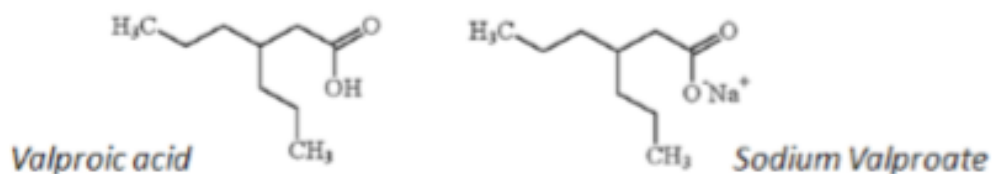
SADRŽAJ

1. Uvod.....	2
2. Učinak valproata i valproične kiseline na metabolizam u jetri.....	3
2.1. Promet masti i kolesterola.....	3
2.2. Metabolizam glukoze i energetska fiziologija.....	5
2.3. Promet i sinteza proteina i hemoglobina.....	9
2.4. Utjecaj na signalne molekule jetre.....	10
2.5. Promet i sinteza žuči.....	12
2.6. Cyp enzimi i sustavi detoksikacije lijekova i otrova u jetri.....	14
3. Utjecaj valproata i valproične kiseline na fetalnu jetru.....	16
4. Razvoj štetnih poremećaja i rizici pacijenata koju uzimaju valproat i VPA....	17
5. Buduće perspektive i daljnja istraživanja.....	18
6. Literatura.....	19
7. Sažetak.....	22
8. Summary.....	22

1. Uvod

Valproična kiselina (2 – propilpentanoična kiselina, VPA) je kratka, razgranata masna kiselina otkrivena sredinom prošlog stoljeća kao lijek protiv napadaja induciranih pentilentetrazolom. Sastojak je lijekova korištenih protiv epilepsije, bipolarnih poremećaja i migrena (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/valproic_acid#section=Identification).

Često korišten antiepileptički lijek je Depakote. Depakote (natrij divalproeks) sadrži valproičnu kiselinu i natrijev valproat u omjeru 1:1 (<https://www.rxlist.com/depakote-drug.htm#description>). Valproat je konjugirana baza valproične kiseline i najčešće dolazi u obliku, prethodno navedene, natrijeve soli. Primijećeni su mnogi pozitivni efekti valproata i valproične kiseline na centralni živčani sustav gdje pomažu smanjenju taloženja kolesterola te rastu i diferencijaciji živčanih stanica te potiče sintezu neurotransmitera GABA. Također, primijećeno je da prilikom istraživanja na štakorima koji su imali Alzheimerovu bolest, VPA potiče antiapoptične efekte te potiče ekspresiju transkripcijskih faktora nužnih za rast živčanih stanica. Unatoč pozitivnih efektima na živčani sustav, VPA ima širok spektar negativnih efekata na ostatak organizma. VPA, kao i valproat ima negativan utjecaj na jetru te je većina istraživanja antiepileptičkih lijekova usmjerena prema njihovoj hepatotoksičnosti. (Đikić i sur. 2017).¹



Slika 1. Strukturna formula valproične kiseline i natrijeva valproata (Đikić i sur. 2017).

¹ **Napomena:** Većina antiepileptičkih lijekova sadrži ili VPA ili valproat ili oboje u različitim omjerima, u narednim poglavljima negativni utjecaji objašnjeni su preko VPA, no to su ujedno i negativni utjecaji valproata.

2. Učinak valproata i valproične kiseline na metabolizam u jetri

2.1. Promet masti i kolesterola

Valproična kiselina uzrokuje skladištenje lipida, masnih kiselina i kolesterola u jetri. Zbog povišene razine masti u tijelu VPA često uzrokuje stanje steatoze jetre (masne jetre), jedne od bolesti unutar spektra nealkoholnih masnih jetrenih oboljenja. Gotovo 61% pacijenata koji su primali VPA terapiju je razvilo steatozu jetre, te njih 25% ostala, nealkoholno uzorkovana, jetrena oboljenja (Xupeng i sur. 2017). Mehanizam koji dovodi do steatoze jetre uzrokovan valproičnom kiselinom je i dalje nepoznat (Đikić i sur. 2017). Međutim, kod miševa tretiranih s VPA tijekom 14 dana dokazana je, koristeći qRT-PCR, povećana količina gena DGAT2 i CD36 važnih za razvoj steatoze jetre (Xupeng i sur. 2017). Uzimanje VPA uzrokuje povećanje tjelesne težine. Dokazana je pozitivna korelacija između uzimanja VPA i povećane abdominalne težine te povišenog tlaka. Kod pacijenata koji su imali porast tjelesne mase uzrokovan VPA su imali veće rizike razvitka metaboličkih sindroma i vaskularne poteškoće kao što je ateroskleroza (Đikić i sur. 2017). Istraživanje koje je pratilo vrijednosti razine kolesterola kod 30 pacijenata s dijagnosticiranom epilepsijom nakon 6 i 12 mjeseci uzimanja VPA pokazalo je da VPA ne utječe na količinu kolesterola visoke gustoće lipoproteina, ali je došlo do znatnog povećanja kolesterola niske gustoće lipoproteina nakon 12 mjeseci terapije. Također, isto istraživanje pokazalo je i porast triglicerida koji je bio vidljiv već nakon 6 mjeseci terapije (Abaci i sur. 2009). Nije uočena korelacija između VPA i samog metabolizma kolesterola kod miševa koji su dobivali tretman VPA prenatalno. (Cartocci i sur., 2018.)

Tablica 1. Antropometrijski i metabolički parametri pacijenata koji su tijekom 12 mjeseci uzimali VPA . Preuzeto iz: Abaci i sur. 2009.

	Pretreatment (n = 30)	Six Months After Treatment (n = 30)	Twelve Months After Treatment (n = 30)	P*
BMI (kg/m ²)	17.8 ± 2.9 ^{†‡}	18.7 ± 3.3 [†]	18.9 ± 3.5 [‡]	0.02
Standard deviation score BMI	0.38 ± 0.8 [†]	0.66 ± 0.8 [†]	0.61 ± 0.8	0.001
TG (mg/dL)	81.6 ± 30.5	88.8 ± 47.3	87.0 ± 39.1	0.283
TC (mg/dL)	126.2 ± 15.9 ^{†‡}	149.1 ± 26.6 [†]	153.4 ± 23.6 [‡]	0.001
LDLc (mg/dL)	74.5 ± 23.6 [‡]	78.1 ± 22.5 ^{‡§}	85.9 ± 22.2 ^{†§}	0.007
HDLc (mg/dL)	54.1 ± 14.2	52.2 ± 9.0	50.0 ± 10.0	0.147
Glucose (mg/dL)	83.1 ± 9.6	87.1 ± 8.6	85.5 ± 8.2	0.144
Insulin (IU/mL)	6.6 ± 5.3	7.3 ± 8.6	5.6 ± 6.4	0.545
HOMA-IR	1.4 ± 1.2	1.6 ± 2.1	1.2 ± 1.6	0.687

Data are given as mean ± SD.

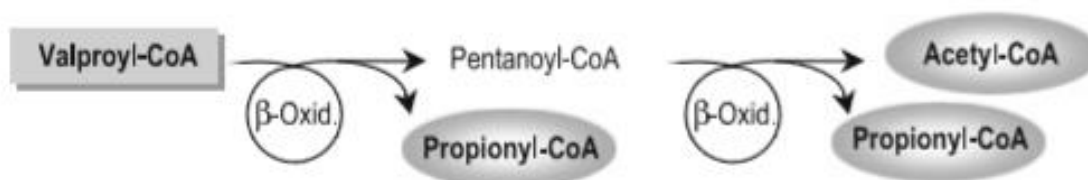
* P value of repeated-measures test ($P < 0.05$ represents statistically significant difference).

^{†‡§} Presence of superscripts indicates statistically significant difference (detected via paired-sample *t* test, $P < 0.0167$) between groups.

Abbreviations:

BMI = Body mass index
 c = Cholesterol
 HDL = High-density lipoprotein
 HOMA-IR = Homeostasis model assessment index-insulin resistance
 LDL = Low-density lipoprotein
 TC = Total cholesterol
 TG = Triglyceride

VPA je supstrat za β - oksidaciju masnih kiselina, time utječe na sniženu koncentraciju karnitina, nužnog za prijenos masne kiseline u mitohondrij i sniženu koncentraciju CoA. Mnoga stanja koja dovode do mikrovezikularne steatoze jetre su karakterizirana smanjenom β - oksidacijom masnih kiselina. Dokaz za oksidaciju VPA su njeni intermedijeri 3-hydroxy-VPA i 3-keto-VPA nađeni u urinu štakora (Silva i sur. 2008). Suplementacija karnitinom te primjena antioksidansa su se pokazale kao pozitivne strategije u liječenju hepatotoksičnosti uzorkovane tretmanom VPA (Guo i sur. 2019). Također, prilikom VPA tretmana, primijećen je porast ekspresije gena CD36, FATP i FABP1 koji su odgovorni za unos masnih kiselina (Shansen i sur., 2019).



Slika 2. Beta oksidacija valproil – CoA . Preuzeto iz: Silva i sur. 2008.

2.2. Metabolizam glukoze i energetska fiziologija:

U početnim istraživanjima se smatralo da valproična kiselina uzrokuje otpornost na inzulin, na temelju rezultata kasnijih istraživanja se smatra da povišen indeks otpornosti inzulina (HOMA - IR) uzrokovan tretmanom VPA vjerojatno ukazuje na hiperinzulinemiju. Točan mehanizam kako VPA utječe na pojavu hiperinzulinemije nije poznat, moguć je utjecaj VPA na razgradnju inzulina ili direktno stimuliranje sekrecije inzulina iz gušterače (Rakitin, 2017.)

VPA se pokazala djelotvornom u snižavanju koncentracije glukoze u krvi kod miševa s dijabetesom tipa 1 uzrokovanim streptozocinom. Nekoliko kliničkih istraživanja je potvrdilo sniženu koncentraciju glukoze i kod pacijenata koji su primali VPA. Ovaj efekt može biti posljedica hiperinzulinemije, ali kod nekih pacijenata je snižena koncentracija glukoze bila neovisna o njegovoj koncentraciji (Khan i Gopabandhu, 2016). VPA ima utjecaj i na iscrpljivanje inozitola u β stanicama gušterače (Yedulla i sur., 2018.)

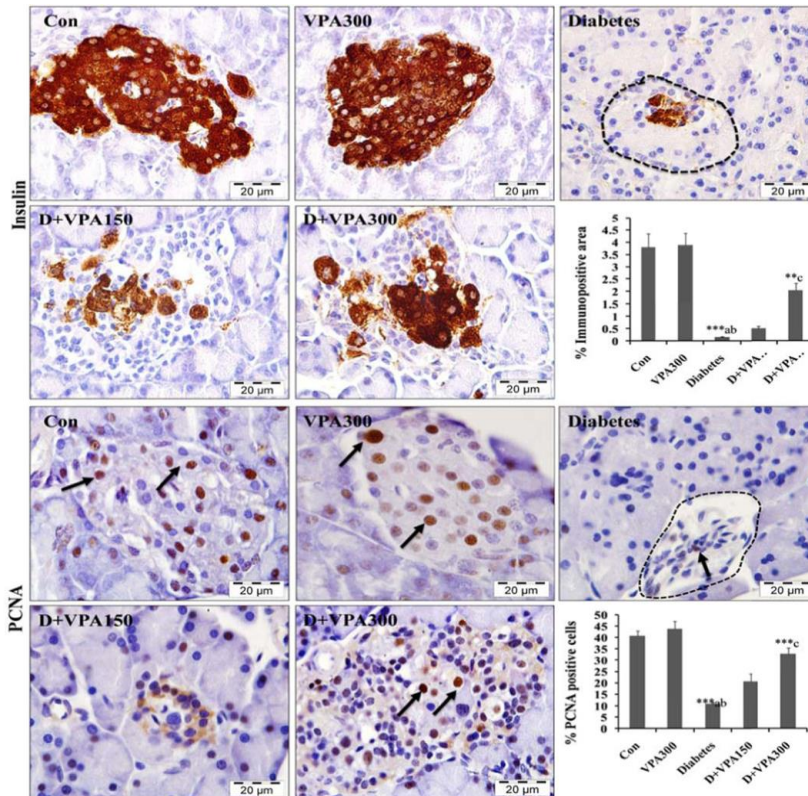
Tablica 2. Khan i Gopabandhu (2016) u svojem radu prikazuju tablicu rezultata promjene tjelesne težine, težine gušterače i jetre, glukoze i inzulina u plazmi u kontrolnoj skupini (Con), skupini koja je uzimala 300 mg/kg VPA, skupini s dijagnosticiranim dijabetesom bez uzimanja VPA, skupini s dijabetesom i 150mg/kg VPA te skupini s dijabetesom i 300mg/kg VPA.

Parameters	Groups				
	Con	VPA300	Diabetes	D+VPA150	D+VPA300
Change in body weight (g)	82.90 ± 6.37	85.90 ± 8.10	-19.29 ± 6.49 ^{***ab}	-3.57 ± 4.83	5.33 ± 7.72
Pancreas weight (g)	0.62 ± 0.03	0.61 ± 0.04	0.41 ± 0.01 ^{***ab}	0.47 ± 0.02	0.53 ± 0.05
Liver weight (g)	9.00 ± 0.35	9.04 ± 0.44	6.00 ± 0.26 ^{***ab}	6.48 ± 0.18	6.49 ± 0.41
Plasma glucose (mg/dL)	116.06 ± 4.06	110.67 ± 3.80	620.02 ± 20.54 ^{***ab}	610.45 ± 4.02	455.67 ± 69.99 ^{**c}
Plasma insulin (ng/mL)	2.55 ± 0.16	2.42 ± 0.29	0.45 ± 0.11 ^{***ab}	0.96 ± 0.23	2.25 ± 0.21 ^{***c}
%HbA1c	4.48 ± 0.25	4.32 ± 0.15	7.92 ± 0.70 ^{***ab}	7.60 ± 0.44	6.88 ± 0.23

All the values are expressed as mean ± SEM (n = 5–10), ^{***}p < 0.001 and ^{**}p < 0.01, “a” versus control “b” versus VPA control, and “c” versus diabetic control “-” show decreased in body weight (difference between final and initial body weight).

VPA se pokazala djelotvornom u snižavanju koncentracije glukoze u krvi kod miševa s dijabetesom tipa 1 uzrokovanim streptozocinom. Nekoliko kliničkih istraživanja je potvrdilo

sniženu koncentraciju glukoze i kod pacijenata koji su primali VPA. Ovaj efekt može biti posljedica hiperinzulinemije, ali kod nekih pacijenata je snižena koncentracija glukoze bila neovisna o njegovoj koncentraciji.



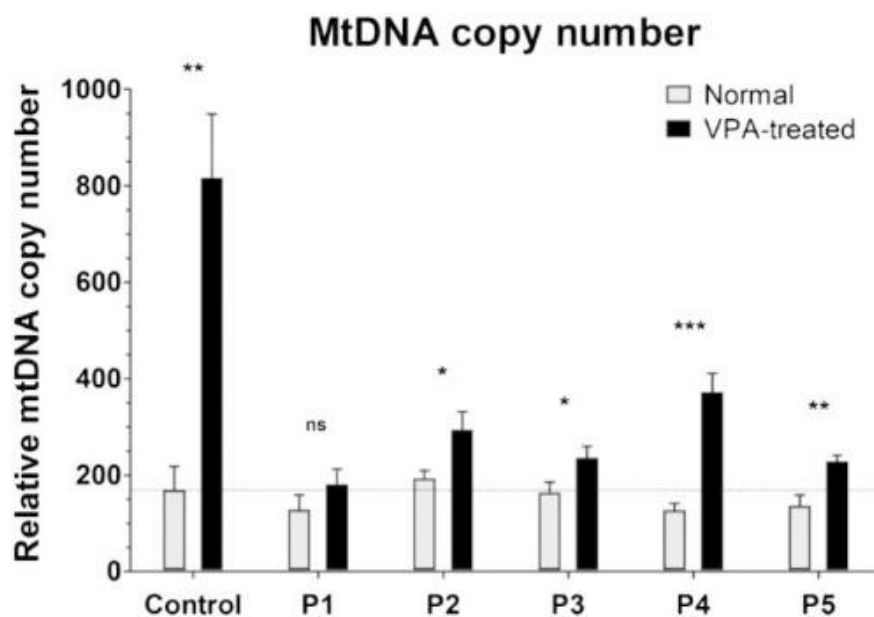
Slika 3. Efekt dijabetesa i tretmana VPA na proliferaciju beta stanica i ekspresiju inzulina u gušterači štakora kod kontrolnih stanica (Con), stanica tretiranih s 300 mg/kg VPA (VPA300), stanica s dijabetesom i tretiranih s 300 mg/kg VPA (D+VPA300) te stanica s dijabetesom i tretiranih s 150 mg/kg VPA /D +VPA150) Slika preuzeta iz: Khan i Gopabandhu, 2016.

Napomena: PCNA je univerzalni marker proliferirajućih stanica.

VPA300 je utjecala na ekspresiju odnosno povećanje inzulina više nego VPA150, što je vidljivo i kod stanica s dijabetesom. Isti slučaj bio je prisutan i kod ispitivanja proliferacije stanica pomoću PCNA, no ovdje je s VPA300 proliferacija slabije izražena ukoliko se tretman provodi na stanicama s dijabetesom.

Valproična kiselina pokazuje negativan efekt i na mitohondrijima. Oštećenje jetre inducirano VPA povezano je i s heterozigotnom genetičkom varijacijom u mutaciji mitohondrijske DNA polimeraze γ (POLG). DNA polimeraza γ na temelju lanca kalupa sintetizira novi lanac DNA tako da je nužan enzim prilikom bitnih staničnih procesa npr. replikacije i popravka DNA. Mutacija u POLG genu onemogućuje sintezu α podjedinice koja u kombinaciji s dvije β podjedinice čini funkcionalnu γ podjedinicu. To je čest uzrok Alper – Huttenlocherovog sindroma kojeg karakterizira sporiji razvoj i poremećaji jetre. Postoje i drugi uzroci nastanka Alper – Huttenlocherovog sindroma, no primijećeno je da kod djece kod kojih je prisutan ovaj sindrom uzrokovan mutacijom u POLG genu imaju veću predispoziciju za razvitak jetrenih oboljenja uzrokovanih valproičnom kiselinom (Kamil i sur. 2014).

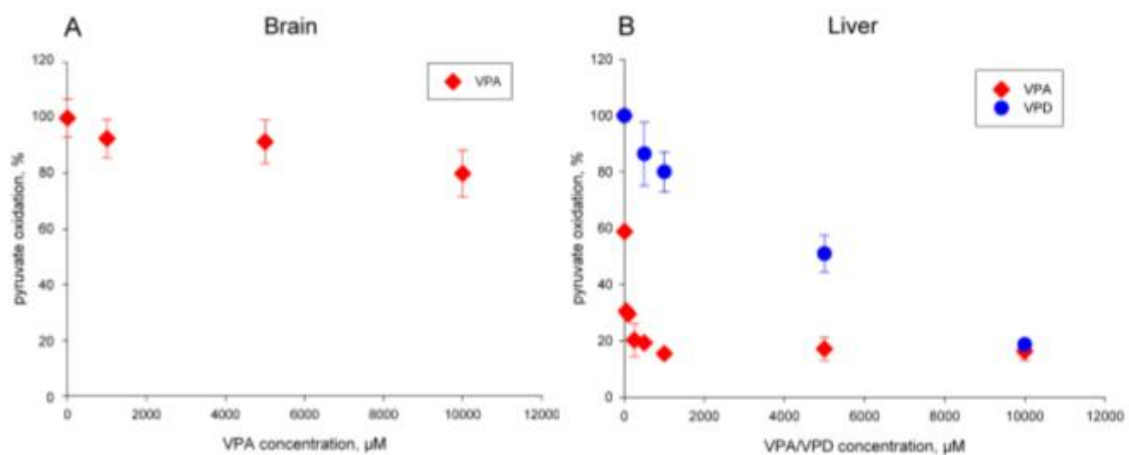
Tretman 10 mM VPA tijekom 10 dana na fibroblastima pacijenata koji su imali mutaciju u ovom genu je uzrokovao povećanje u ekspresiji mutacije i povećanje u nekoliko regulatora nužnih za biogenezu mitohondrija. Također, tretiranje fibroblasta s VPA rezultiralo je povećanjem broja kopija mitohondrijske DNA (mtDNA) što je prikazano na grafu.



Slika 4. Relativan broj kopija mtDNA u kontroli i fibroblastima pacijenata s mutacijom u POLG genu nakon tretmana s 10 mM VPA tijekom 10 dana, P1-P5 prikazuje rezultate za 5 različitih pacijenata. Preuzeto iz : Kamil i sur. 2014.

Iako je iz rezultata jasno vidljiv porast u mtDNA kod svih pacijenata nakon tretmana s VPA, najveće povećanje mtDNA bilo je u fibroblastima u kontroli, odnosno onima koji nisu imali mutaciju u POLG genu.

Daljnja istraživanja pokazala su utjecaj VPA i na oksidacijske procese mitohondrija jetre. Razina oksidacije piruvata i 2 – oksoglutarata u mitohondrijima mozga štakora nije bila promijenjena djelovanjem valproične kiseline, no u mitohondrijima jetre je oksidacija bila teško oštećena koncentracijom VPA iznad 100 μ M. VPA je imala velik utjecaj na inhibiciju α -lipoamid dehidrogenaze koja katalizira prijelaz piruvata u CoA, dok transport i koraci dehidrogenacije piruvata nisu bili promijenjeni (Kudin i sur.2017). Jedan od derivata valproične kiseline – valpromid (VPD) pokazuje znatno manju inhibiciju α -lipoamid dehidrogenaze, što je prikazano na grafu.

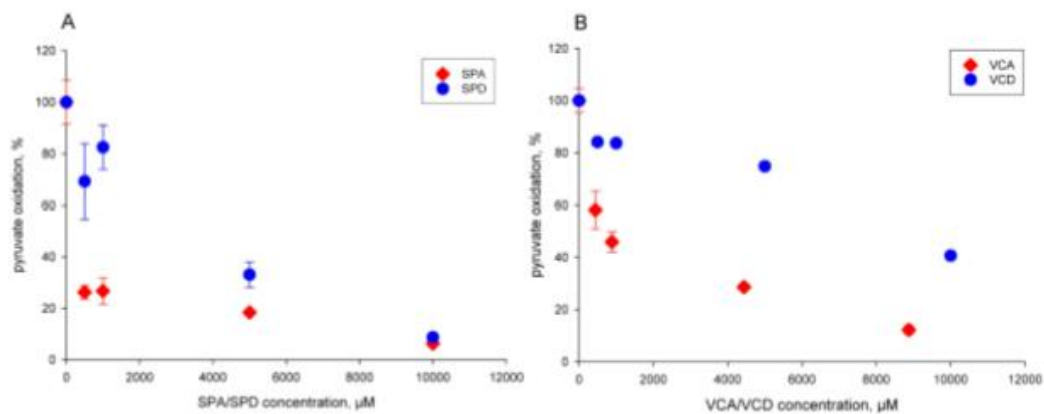


Slika 5. Inhibicija mitohondrijske oksidacije piruvata valproičnom kiselinom u mozgu štakora (A) i u jetri štakora (B). Crvena boja označava valproičnu kiselinu (VPA), a plava boja njen derivat valpromid (VPD) Preuzeto iz: Kudin i sur.2017.

U mozgu, gdje je bio ispitivan učinak samo valproične kiseline, nije vidljiva velika korelacija između povećanja koncentracije VPA i inhibicije mitohondrijske oksidacije. S druge strane, u

jetri možemo vidjeti blagi pad oksidacije povećanjem koncentracije VPA, koji je još izraženiji primjenom VPD.

Istražen je i efekt ostalih derivata VPA, kao što su sec – butilpropilacetamid (SPD), valnoktamid (VCD), te njeni kiselinski derivati (VCA i SPA) na inhibiciju α - lipoamid dehidrogenaze.



Slika 6. Inhibicija mitohondrijske oksidacije piruvata derivatima valproične kiseline u mozgu štakora (A) i u jetri štakora (B). Preuzeto iz: Kudin i sur.2017.

Iz priloženih rezultata je vidljivo da kiselinski derivati (VCA I SPA) imaju jak inhibicijski učinak na α - lipoamid dehidrogenazu, dok ostali derivati pokazuju nešto slabiju inhibiciju.

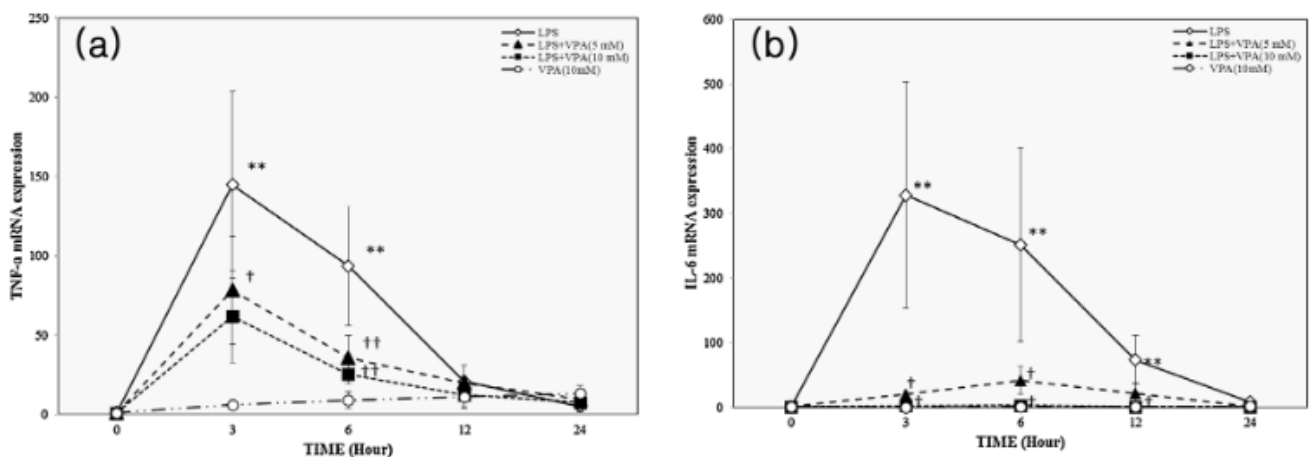
2.3. Promet i sinteza proteina i hemoglobina:

Valproična kiselina djeluje kao inhibitor histonskih deacetilaza (HDAC). Histonske deacetilaze su enzimi koji uklanjaju acetilnu skupinu sa histona čime povećavaju njihov naboj te se oni jače vežu za DNA. Jače vezanje histona za DNA onemogućava razdvajanje lanaca, odnosno utječe na smanjenje transkripcije, VPA inhibirajući HDAC indirektno utječe na povećanje sinteze proteina (Göttlicher i sur. 2001). Valproična kiselina uzrokuje formaciju tiolnih konjugata s glutationom. Glutation (GSH) je važan antioksidans proizveden u jetri koji se sastoji od triju aminokiselina: cisteina, glutamata i glicina. Posljedica formacije tiolnih konjugata glutationa je pad njegove stanične koncentracije što mijenja redoks status stanice i uzrokuje oksidativni stres (Đikić i sur. 2017). Prilikom istraživanja antitumorskog djelovanja VPA utvrđeno je da VPA inhibira angiogenezu, formaciju novih krvnih žila iz već postojećih. Ovaj proces je nužan za opskrbu tumorskih tkiva kisikom i nutrijentima nužnim za njihov rast i metastazu. Važni regulirajući faktori angiogeneze su fibroblastni faktor rasta (FGF) i vaskularni endotelijski faktor rasta (VEGF). Tretiranje stanica raka debelog crijeva valproičnom kiselinom je pokazalo da VPA utječe na faktor VEGF inhibirajući proteinsku ekspresiju VEGF, ali i smanjujući udio mRNA koje za njega kodiraju (Michaelis i sur. 2004).

Utjecaj valproične kiseline na hemoglobin istražen je u radu potaknutom slučajem trinaestogodišnjeg dječaka koji je nakon godišnjeg tretmana valproičnom kiselinom dobio anemiju. Biopsijom koštane srži utvrđen je pad sazrijevanja proeritroblasta, stanica iz koje nakon niza dioba i diferencijacije nastaju eritrociti. S obzirom da je isključena mogućnost nedostatka vitamina B12 ili folne kiseline, što je moguć uzrok anemije, došlo je do prekida tretmana s VPA što je rezultiralo povećanjem hemoglobina. Točan mehanizam na koji VPA utječe na sniženje koncentracije hemoglobina je i dalje nepoznat (Kaczorowska-Hac i sur. 2012).

2.4. Utjecaj na signalne molekule jetre:

Jetra predstavlja glavni organ nužan za aktivnost citokina, a sintetiziraju ih Kupfferove stanice. Citokini su grupa proteina čije je djelovanje slično hormonima. To su signalne molekule koje su sintetizirane u različitim stanicama i utječu na funkciju drugih stanica vežući se na specifične receptore na njihovoj površini (Ramadori i sur., 2001). Istraživanje utjecaja VPA na citokine je provedeno na mononuklearnim stanicama periferne krvi izolirane iz 5 zdravih Beagle pasa. VPA znatno smanjuje proizvodnju TNF – α i IL - 6 citokina uzrokovanu stimulacijom lipopolisaharida (LPS) *in vitro* i *in vivo*, rezultati su vidljivi na grafu. (Slika 7.) TNF- α i IL – 6 su signalni proteini uključeni u procese upale te sudjeluju u nastanku akutne faze protuupalne reakcije odgovornu za brz odgovor stanice u svrhu obrane domaćina od mikroorganizama (Song i sur. 2015).

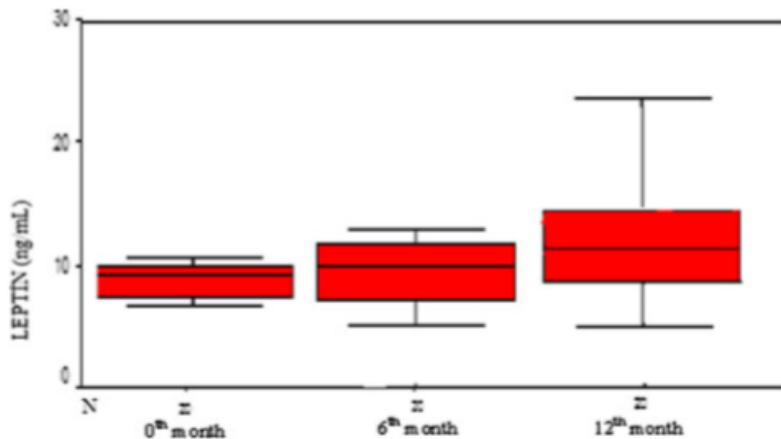


Slika 7. Utjecaj VPA na mononuklearne stanice periferne krvi izolirane iz 5 zdravih pasa. Stanice su tretirane LPS-om, LPS-om u kombinaciji s VPA (5mM), LPS-om u kombinaciji s VPA(10mM) te samom VPA (10 mM). Slika lijevo pokazuje ekspresiju TNF- α signalnih proteina, a slika desno IL – 6 ekspresiju u vremenu. Preuzeto iz Song i sur. 2015.

Rezultati ukazuju na porast ekspresije TNF- α signalnih proteina prilikom primjene samog LPS-a ili njegove kombinacije s VPA, Kod IL-6 proteina, takav izražen odnos vidljiv je samo

prilikom tretmana sa samim LPS-om te blaži porast kod primjene VPA(10mM) u kombinaciji s LDS-om.

Vrsta citokina koje luči masno tkivo zovu se adipokini. Adipokini osim što djeluju na samo masno tkivo koje ih luči, djeluju i na mozak, jetru, mišićno tkivo i imunološki sustav. Leptin je prvi otkriven adipokin koji ima važnost u regulaciji apetita jer izaziva osjećaj sitosti.



Slika 8. Povećanje koncentracije leptina nakon 6 i nakon 12 mjeseci uzimanja VPA kod djece s dijagnosticiranom epilepsijom dobi 6-12 godina. Preuzeto iz: Tokgoz i sur. 2012.

Uzimanje VPA je pokazalo znatan porast leptina nakon 6 i 12 mjeseci u 20 – ero djece s dijagnosticiranom epilepsijom u dobi 6 – 12 godina (Tokgoz i sur. 2012).

Mnoga istraživanja su pokazala pozitivnu korelaciju povećanja koncentracije VPA i tjelesne težine. Kada uzmemo u obzir da VPA također utječe i na povećanje leptina koji je odgovoran za suzbijanje apetita, dolazimo do kontradiktornog zaključka. Ovo se može objasniti time što je prilikom uzimanja valproata kod djece s dijagnosticiranom epilepsijom bila primijećena viša koncentracija grelina – peptidnog hormona želuca koji utječe na stimuliranje gladi (Gungor i sur. 2007), također jedan od mogućih uzroka porasta težine je poremećaj lipidnog metabolizma u jetri(Đikić i sur.2017). Razina koncentracija grelina u negativnoj je korelaciji s količinom inzulinu sličnog faktora rasta - 1 (IGF -1) koji se većinom izlučuje iz jetre, te je povećanjem koncentracije grelina snižena i koncentracija inzulinu sličnog faktora rasta vezujućeg proteina - 3 (Gungor i sur. 2007).

2.5. Promet i sinteza žuči:

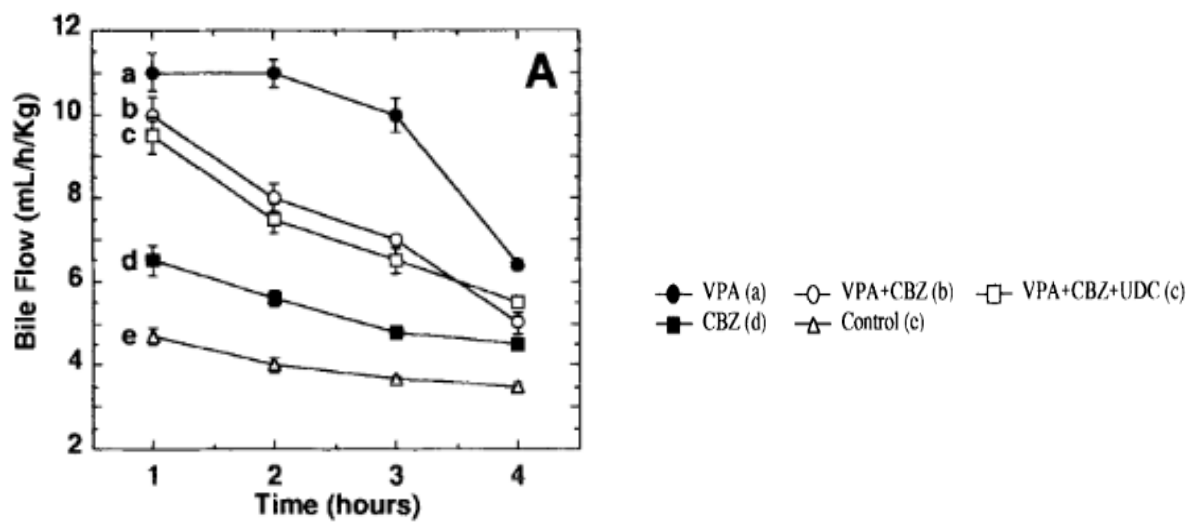
Prilikom tretiranja štakora valproičnom kiselinom tijekom 8 dana, uočeno je da VPA snažno modificira biokemijske parametre žuči što je uzrokovalo smanjenu sekreciju fosfolipida. Kada je VPA davana u kombinaciji s karbamazepinom (CBZ), lijekom također razvijenim za svrhe liječenja epilepsije, udio žučnih fosfolipida je bio povećan u usporedbi s vrijednostima gdje je VPA davana sama. Normalizirana sekrecija fosfolipida postignuta je ukoliko je u kombinaciji s VPA i CBZ dodan i ursodiol (UDC). Ursodiol se u medicini koristi za liječenje žučnog kamenca uzrokovanog kolesterolom. U vrijednostima količine žučnih soli nije bilo velikih odstupanja u usporedbi s kontrolnom grupom, najmanja vrijednost bila je nakon što su štakori primili samu VPA, a najveća nakon tretmana s CBZ (Mesdjian i sur., 1996).

Tablica 3. Usporedba toka žuči, količine žučnih soli i fosfolipida na različitim grupama štakora prilikom obrade sa VPA, CBZ, VPA+CBZ i VPA + CBZ+UDC (Mesdjian i sur., 1996).

Bile Flow and Biliary Secretion of Bile Salts and Phospholipids over 4 hours in the Different Groups of Rats.

Group	Bile flow (ml/kg/4h)	Bile salts (μ mol/kg/4h)	Phospholipids (μ mol/kg/4h)
Control	15.9 \pm 0.5 bcd	475 \pm 40	60.7 \pm 5.9 b
VPA	38.4 \pm 1.3 acd	429 \pm 23 c	36.2 \pm 2.8 acde
CBZ	21.4 \pm 0.7 abd	533 \pm 25 be	74.0 \pm 3.7 bde
VPA+CBZ	29.0 \pm 1.1 abc	499 \pm 22	46.5 \pm 2.1 bce
VPA+CBZ+UDC	29.5 \pm 1.2 abc	451 \pm 16 c	53.6 \pm 1.5 bcd

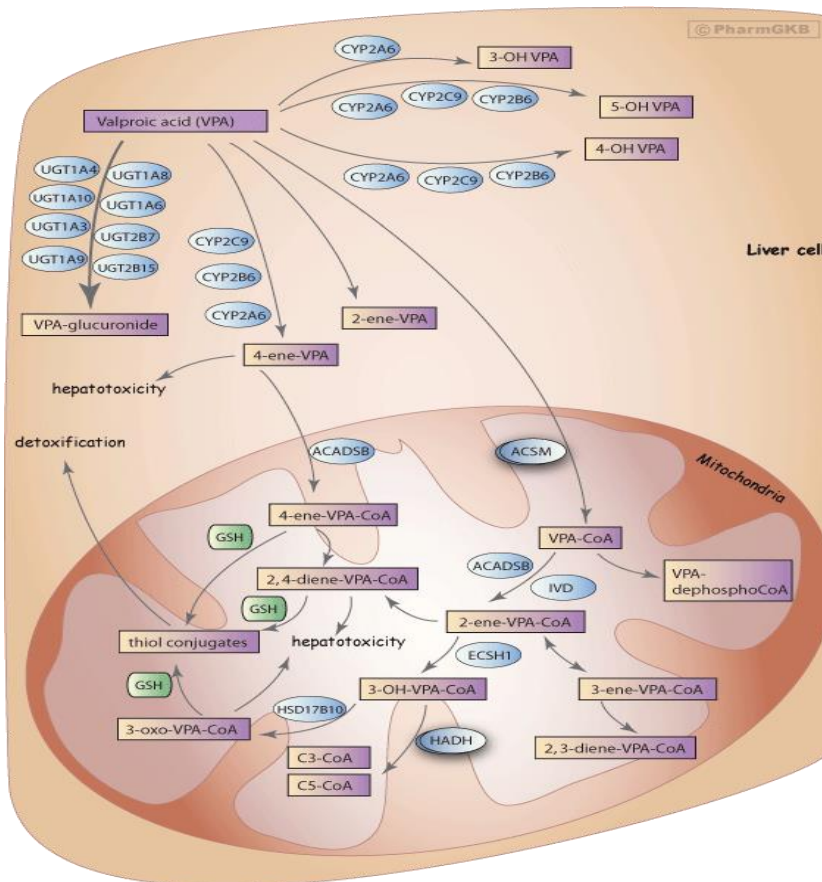
Prilikom eksperimenta praćeni su i drugi faktori primjerice izlučivanje žuči iz jetre. Vrijednosti su bile znatno povećane prilikom tretmana s VPA u usporedbi s kontrolnom grupom, ali i prilikom obrade s CBZ-om. Krivulje ovisnosti toka žuči u vremenu ukazuju da VPA i CBZ imaju najveći koleretički efekt tijekom prvog sata i zatim padaju u ovisnosti o vremenu.



Slika 9. Tok žuči tijekom vremena na različitim grupama štakora prilikom obrade sa VPA, CBZ, VPA+CBZ i VPA+CBZ+UDC te kontrolna grupa. Preuzeto iz: Mesdjian i sur., 1996.

2.6. Cyp enzimi i sustavi detoksikacije lijekova i otrova u jetri:

Citokromi su proteini koji sadrže hem, prostetičnu skupinu koja sadrži željezo, pa ih nazivamo hemoproteinima. U metabolizmu lijekova najznačajnija je obitelj citokroma Cyp450 koji su ime dobili po maksimalnoj absorbanciji na valnoj duljini 450 nm na spektrofotometru. Najviše eksprimirani oblici u jetri su CYP 3A4, 2C9, 2C8, 2E1, i 1A2, u nešto manjoj mjeri A6, 2D6, 2B6, 2C19 i 3A5, dok se oblici CYP 2J2, 1A1 i 1B1 eksprimiraju izvan jetre (Zanger i sur. 2013). Moguće su varijacije njihove ekspresije među organizmima s obzirom da ona ovisi o genetičkom polimorfizmu, hormonskoj ravnoteži, dobi, spolu te općem stanju organizma. Valproična kiselina kod čovjeka može krenuti trima putevima metabolizma, glukuronidacijom gdje je konjugirana do UDP – glukuronske kiseline u reakciji kataliziranoj UDP-glikotransferazom, β - oksidacijom u mitochondriju i ω - oksidacijom koja je najmanje zastupljena, oko 10 % (Vázquez i sur. 2014).



Slika 10. Putevi metabolizma VPA.

Preuzeto sa: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165964265>

Cyp450 su glavni enzimi koji sudjeluju u metabolizmu valproične kiseline. CYP2A6, CYP2B6 i CYP2C9 su enzimi koji sudjeluju u njejoj oksidaciji u citoplazmi te prilikom toga tvore toksične produkte 4-en VPA i 2-en VPA. Molekule VPA i dio 4-en VPA konjugiraju do CoA te u mitohondriju prolaze β – oksidaciju prilikom čega nastaje 2,4 – dien VPA. Ovaj metabolit zajedno s 4-en VPA, metabolitom nastalim oksidacijom u citoplazmi, čini glavni hepatotoksični produkt VPA (Đikić i sur. 2017). Dugoročna izloženost visokim dozama valproične kiseline rezultira trošenjem karnitina, to onemogućava prolaz masnih kiselina u mitohondrij odnosno njihovu β - oksidaciju. Kao rezultat dolazi do povećane koncentracije VPA u citoplazmi odnosno povećane razine njenog hepatotoksičnog produkta 4-en VPA nastalog oksidacijom. Povećana razina 4-en VPA u citoplazmi rezultira nepravilnošću eliminacije amonijaka u ciklusu ureje. Nepravilnost je postignuta već u prvom koraku ciklusa uree jer 4-en VPA inhibira karbamoil fosfat sintetazu (CPS) koja katalizira prijelaz amonijaka u karbamoil fosfat. Dolazi i do smanjene sinteze N- acetil glutaminske kiseline, aktivatora CPS-a zbog trošenja CoA uzrokovanog smanjenom β - oksidacijom. Posljedica nepravilnosti ciklusa uree je hiperamonemija koja može uzrokovati encefalopatiju, pogoršanu funkciju mozga zbog nakupljanja otrovnih tvari u krvi neuklonjenih zbog nepravilnosti jetrine funkcije. Simptomi hiperamonemije su napadaji i neurološke disfunkcije, zbog toga može doći do krivog zaključka o nedjelotvornosti uzimanja VPA na smanjenje napadaja uzrokovanih epilepsijom (Vázquez i sur. 2014). Također, kod pacijenata na intravenoznoj njezi koji VPA uzimaju intravenozno je rizik za razvitak hiperamonemije čak 40% (Lynd i sur., 2019).

Naime, samo kod CYP2A6 enzima je uočena korelacija njegova povećanog polimorfizma s većom koncentracijom VPA. Također, postoje potencijalni rizični faktori mutiranog genotipa enzima CYP2C9 i CYP2A6 pri višim koncentracijama VPA (Đikić i sur. 2017).

3. Utjecaj valproata i valproične kiseline na fetalnu jetru:

Korištenje VPA kao i većine drugih antiepileptičkih lijekova ne preporuča se za vrijeme trudnoće osim ako koristi lijekova ne nadilaze količinu mogućih posljedica. VPA i valproat mogu imati teratogeni efekt, odnosno izazvati deformacije prilikom razvoja fetusa. Istraživanje utjecaja VPA na embrijima miša navodi promjene u strukturi jetre kao jednu od negativnih djelovanja na fetus, no smatra se da je to posljedica generaliziranog, a ne lokalnog toksičnog djelovanja s obzirom da VPA izaziva oštećenje placente te time dovodi do poremećaja u opskrbi fetusa nutrijentima. Djeca žena koje su za vrijeme trudnoće uzimale antiepileptičke lijekove, među kojima je bio i valproat imaju mnoge abnormalnosti u razvoju što se naziva fetalnim valproatnim sindromom (FVS). Djeca sa FVS – om imaju abnormalije udova, visok rizik srčanih bolesti, deformiranu neuralnu cijev, deformacije genitalija i specifične karakteristike lica. Istraživanja dosad nisu dokazala direktan utjecaj VPA i valproata na fetalnu jetru, no s obzirom na negativan utjecaj VPA i valproata na jetru odraslih osoba i djece, svakako bi trebalo posvetiti još istraživanja i utjecaju na jetru fetusa (Clayton – Smith i sur. 1995). Najnovija istraživanja utvrdila su i pozitivnu korelaciju učestalosti pojave autizma s prenatalnim uzimanjem VPA (Zamberletti i sur. 2019)



Slika 11. Značajke lica djeteta s FVS – om, ravan nosni most, izbočene obrve, tanka granica gornje usne. Preuzeto iz: Clayton – Smith i sur. 1995.

4. Razvoj štetnih poremećaja i rizici kod pacijenata koji uzimaju valproat i valproičnu kiselinu:

Dosadašnja poglavlja bazirala su se na negativnom utjecaju VPA na jetru, no VPA, kao i valproat imaju štetan utjecaj i na ostale organe te pridonose razvoju raznih poremećaja. Kod dijela žena koje su uzimale VPA primijećen je nastanak policistričnog sindroma jajnika (POS) koji se češće javljao kod žena koje su VPA uzimale zbog dijagnosticirane epilepsije u usporedbi s onima koje su uzimale zbog dijagnosticiranog bipolarnog poremećaja (Bilo i sur. 2015). Smatra se da je moguć razlog tome neuroendokrini poremećaj prisutan zbog epileptičkih napadaja. U istraživanju gdje su pacijenti uzimali više doze VPA, 50 mg po kilogramu težine dnevno, je 27% pacijenata razvilo trombocitopeniju (<https://www.drugs.com/disease-interactions/valproic-acid.html>) manjak krvnih pločica (trombocita) nužnih za proces zgrušavanja krvi. Zabilježeno je i nekoliko slučajeva nastanka pankreatitisa (Sukanta i sur. 2015) i cerebralnog edema (Camilleri i sur. 2005) kod pacijenata koji su uzimali VPA. Jedan od poremećaja uzrokovan VPA je i FVS opisan u prethodnom poglavlju.

Uzimanje VPA najviše donosi rizik razvoju dijabetesa, ateroskleroze, hipertenzije te otpornosti na inzulin. Prekomjerno uzimanje VPA ima negativne efekte na centralni živčani sustav te može izazvati vrtoglavicu, halucinacije, jake glavobolje, ataksiju i komu (<https://www.drugs.com/sfx/valproic-acid-side-effects.html>).

5. Buduće perspektive i daljnja istraživanja

Prethodno je spomenuto da VPA djeluje kao inhibitor HDAC. Inhibicija aktivnosti HDAC se smatra mogućim novim pristupom modificiranja metabolizma glukoze za potrebe liječenja dijabetesa tipa 2. Njihova inhibicija reducira apoptozu β - stanica gušterače koje su odgovorne za lučenje inzulina, no VPA također pogoduje njihovoj proliferaciji (Göttlicher i sur. 2001).

S obzirom da VPA pokazuje negativnu korelaciju sa citokinima TNF $-\alpha$ i IL-6, što je objašnjeno u poglavlju „Utjecaj VPA na signalne molekule jetre“, smatra se da bi se VPA mogla koristiti u liječenju sepse, životno opasnog stanja koje se javlja kada odgovor tijela na infekciju uzrokuje oštećenja vlastitim tkivima i organima (Song i sur. 2015).

Mnogi mehanizmi poremećaja uzrokovanih terapijom s VPA su i dalje nejasni te je svakako, kako bi se što više izbjegle moguće posljedice na organizam i što više iskoristile prednosti koje VPA ima u liječenju epilepsije, potrebno i dalje provoditi istraživanja.

6. Literatura

Abaci A, Saygi M, Yis U, Demir K, Dirik E, Bober E, 2009. Metabolic alterations during valproic acid treatment: a prospective study, *Pediatr Neurol*, 41(6):435-9

Bilo L, Melo R., 2008. Polycystic ovary syndrome in women using valproate: a review, *Gynecol Endocrinol*,24(10):562-70

Camilleri C, Albertson T, Offerman S, 2005. Fatal cerebral edema after moderate valproic acid overdose, *AnnEmergMed.*;45(3):337-8.

Domagoj Đikić, David Jutrić, Kristina Dominko, 2017. The Dual Nature of the Antiepileptic Drug Valproic Acid, with Possible Beneficial Effects in Alzheimer's Disease, *SEEMEDJ VOL 1,NO.1*

Göttlicher Martin, Saverio Minucci, Ping Zhu, Oliver H. Krämer, Annemarie Schimpf, Sabrina Giavara, Jonathan P. Sleeman, Francesco Lo Coco, Clara Nervi, Pier Giuseppe Pelicci, Thorsten Heinzel, 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells, *EMBO J.*, 20(24): 6969–6978.

Gungor S, Yücel G, Akinci A, Tabel Y, Ozerol IH, Yologlu S, 2007. The role of ghrelin in weight gain and growth in epileptic children using valproate, *J Child Neurol*, 22(12):1384-8

Guo HL, Jing X, Sun JY, Hu YH, Xu ZJ, Ni MM, Chen F, Lu XP, Qiu JC, Wang T, 2019, Valproic acid and the liver injury in patients with epilepsy: An update,, *Curr Pharm Dess*, 25(3):343-351

Kaczorowska-Hac Barbara, Agnieszka Matheisel, Lucyna Maciejka-Kapuscinska, Jakub Wisniewski, Anna Alska, Elzbieta Adamkiewicz-Drozynska, Anna Balcerska, Iwona

Reszczynska,2012. Anemia secondary to valproic acid therapy in a 13-year-old boy: a case report, *J Med Case Rep*, 6: 239

Kamil S. Sitarz, Hannah R. Elliott, Betül S. Karaman, Caroline Relton, Patrick F. Chinnery, Rita Horvath, 2014. Valproic acid triggers increased mitochondrial biogenesis in POLG-deficient fibroblasts, *Mol Genet Metab*, 112(1): 57–63

Kudin Alexei, Hafiz Mawasi, Arik Eisenkraft, Christian E. Elger, Meir Bialer, Wolfram S. Kunz, 2017. Mitochondrial Liver Toxicity of Valproic Acid and Its Acid Derivatives Is Related to Inhibition of α -Lipoamide Dehydrogenase, *Int J Mol Sci*, 18(9): 1912

Lind J, Nordlund P, Intravenous use of valproic acid in status epilepticus is associated with high risk of hyperammonemia., 2019, *Seizure*, 69:20-24.

Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, Hoffmann K, Kotchetkov R, Busse R, Nau H, Cinatl J Jr, 2004., Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo, *Mol Pharmacol*, 65(3):520-7

Mesdjian E, Zamora AJ, Montet AM, Bonneton J, Guitaoui M, Genton P, Montet JC, Ursodeoxycholate improves hepatobiliary dysfunction induced by valproate-carbamazepine treatment in the rat. *Life Sci*, 59(13):1069-79.

J. Clayton – Smith, D. Donnai, 1995. Fetal valproate syndrome, *Med Genet*, 32:724-727

Rakitin Aleksei, 2017. Does valproic acid have potential in the treatment of Diabetes Mellitus? *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8:147

Ramadori G, Armbrust T, 2001. Cytokines in the liver, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13(7):777-84.

M. F. B. Silva, C. P. Aires, P. B. M. Luis, J. P. N. Ruiten, L. IJlst, M. Duran, R. J. A. Wanders, I. Tavares de Almeida, 2008. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation : A review. *J Inherit Metab Dis*, 31(2):205-16

Shansen Xu, Chen, Y., Ma, Y., Liu, T., Zhao, M., Wang, Z., & Zhao, L.,2019. Lipidomic Profiling Reveals Disruption of Lipid Metabolism in Valproic Acid-Induced Hepatotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, 10:819

Song R, Yu D, Yoon J, Park J, 2015. Valproic acid attenuates the expression of pro-inflammatory cytokines lipopolysaccharide-treated canine peripheral blood mononuclear cells (in vitro) and in a canine endotoxemia model (in vivo), *Vet Immunol Immunopathol*, 166(3-4):132-7

Sukanta Ray, Sujan Khamrui, Mohnish Kataria, Jayanta Biswas, Suman Saha, 2015. Valproic Acid-Induced Severe Acute Pancreatitis with Pseudocyst Formation: Report of a Case, *Cureus* v.7(8)

Tokgoz H, Aydin K, Oran B, Kiyici A.2012. Plasma leptin, neuropeptide Y, ghrelin, and adiponectin levels and carotid artery intima media thickness in epileptic children treated with valproate. *Childs Nerv Syst* ;28(7):1049-53

Ulrich M. Zanger, Matthias Schwab, 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacology & Therapeutics*, vol.138, 103 – 141

Vázquez Marta, Pietro Fagiolino, Cecilia Maldonado, Ismael Olmos, Manuel Ibarra, Silvana Alvariza, NataliaGuevara, Laura Magallanes, Ivette Olano, 2014. *BioMed Research International* Volume 2014

Xupeng Bai, Weipeng Hong, Peiheng Cai, Yibei Chen, Chuncao Xu, Di Cao, Weibang Yu, Zhongxiang Zhao, Min Huang, Jing Jin, 2017. Valproate induced hepatic steatosis by enhanced fatty acid uptake and triglyceride synthesis, *Toxicol Appl Pharmacol*, vol.324, 12-25

Yedulla NR, Naik AR, Kokotovich KM, Yu W, Greenberg ML, Jena BP. 2018, Valproate inhibits glucose-stimulated insulin secretion in beta cells, *Histochem Cell Biology*, Vol 4. 395-401

Zamberletti E, Gabaglio M, Woolley-Roberts M, Bingham S, Rubino T, Parolaro D, 2019, Cannabidiol Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal

Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats, *Front Cell Neuroscience*, 13:367

<https://www.drugs.com/sfx/valproic-acid-side-effects.html>

<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165964265>

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/valproic_acid#section=Identification

7. Sažetak

Valproat i valproična kiselina su lijekovi korišteni za poremećaje živčanog sustava kao što su epilepsija, migrene i bipolarni poremećaj. Djeluju na način da mijenjaju koncentraciju neurotransmitera u mozgu kao što je GABA. Hepatotoksičnost je čest problem kako valproata i valproične kiseline tako i ostalih antiepileptičkih lijekova. Cilj seminara je pregled poremećaja unutar procesa jetre na koje ovi lijekovi utječu. Neki od njih su poremećaji u lučenju signalnih molekula jetre, oksidacije masnih kiselina i sustavu u detoksikaciji lijekova i otrova. Negativan utjecaj primijećen je i na fetusima trudnica koje su uzimale ove lijekove. Iako je hepatotoksičnost glavno upozorenje korištenja valproata i valproične kiseline, negativan utjecaj prisutan je i na gušterači, mozgu, krvnom sastavu, spolovilu i ostalim organima. Broj istraživanja provedenih na valproatu i valproičnoj kiselini znatno je porastao u posljednjih godina, ali, radi što veće sigurnosti pacijenata, ih je potrebno provoditi i dalje.

8. Summary

Valproate and valproic acid are drugs used for nervous system dysfunctions like epilepsy, migraines and bipolar disorder. Their way of work is changing concentrations of neurotransmitters in brain like GABA. Hepatotoxicity is common problem not only with valproate and valproic acid but also with other antiepileptic drugs. The target of this seminar is to review the disorders within the liver process to which these drugs affect. Some of them are disorders in secretion of liver signal molecules, fatty acid oxidation and in system of detoxification of drugs and toxins. Negative effect has also been noticed in fetuses of women who took those medications. Although hepatotoxicity is main warning of valproate and valproic acid usage, negative effect is also present in pancreas, brain, blood system, genitals and other organs. Number of research on valproate and valproic acid has increased considerably over the last few years, but, for the sake of greater patient safety, it is necessary to continue.