

# Metaboličke i fiziološke promjene u jetri miša C57BL6 nakon združenog unosa lijeka valproata i polifenola naringenina

---

**Boroš, Almos**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:217:980067>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Almos Boroš

**Metaboličke i fiziološke promjene u jetri  
miša C57 nakon združenog unosa lijeka  
valproata i polifenola naringenina**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikić, znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno- matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Metaboličke i fiziološke promjene u jetri C57 miša nakon združenog unosa lijeka  
valproata i polifenola naringenina

Almos Boroš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Valproat je razgranata kratkolančana masna kiselina korištena kao antiepileptički lijek čija primjena uzrokuje nakupljanje lipida u jetri i promjene u metabolizmu lipida i ugljikohidrata. Naringenin je spoj iz biljaka porodice citrusa poznat po svojim hepatoprotektivnim, antioksidativnim i antihiperglikemijskim svojstvima. Cilj ovoga rada bio je utvrditi hoće li u muških C57 miševa koadministracija polifenola naringenina sa valproatom umanjiti štetne učinke valproata na jetru. Nakon 15 dana tretmana miševa izmjereni su serumski parametri lipidnog indeksa, aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT), ukupnih proteina, albumina, globulina, i glukoze. U tkivu jetre izmjereni su pokazatelji lipidne peroksidacije (malondialdehid/MDA) i aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT). Na tkivnim presezima jetre bojani su lipidi Oil Red O metodom i metodom steroidnih dehidrogenaza vizualizirane aktivnosti steroidnih dehidrogenaza. Naringenin u kotretmanu sa valproatom u ovom istraživanju pokazao je manje znakova oštećenja hepatocita temeljem ALT aktivnosti, ali i najviši lipidni indeks, te nakupljanje lipida u jetri (steatozu). Na markere lipidne peroksidacije (MDA) i antioksidacijske enzime (SOD i CAT) koadministracija naringenina u životinja nije proizvela uniformni očekivani zaštitni učinak, već su aktivnosti bile neznajčno različite od valproatnog i kontrolnog tretmana. Naringenin samostalno i u kotretmanu sa valproatom producirao je izraženu hiperglikemiju veću u odnosu na samostalni tretman valproatom.

(42 stranica, 16 slika, 12 tablica, 32 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: valproat, naringenin, oksidativni stres, serumski markeri, glukoza, lipidna peroksidacija, superoksid dismutaza, katalaza, Oil Red O

Voditelj: Izv.prof.dr.sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Domagoj Đikić

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

Liver metabolic and physiological changes after synergistic intake of the medicament  
valproate and polyphenol naringenin

Almos Boroš

Roosevelet square 6, 10000 Zagreb, Croatia

Valproate is a branched short chain fatty acid used as an antiepileptic drug. Its usage induces accumulation of lipids in hepatic tissue and changes in lipid and carbohydrate metabolism. Naringenin is a substance produced mostly by plants of the citrus family known for its hepatoprotective, antioxidative and antihyperglycaemic effects. The aim of this study was to determine if coadministration of a polyphenol naringenin with valproate will alleviate the hepatotoxic effects of valproate in male C57 mice. After 15 days of treatment, serum parameters of lipid index, alanine aminotransferase (ALT) activity, total protein, albumin, globulin, and glucose content were measured. In hepatic tissue measurements were made of lipid peroxidation markers (malondialdehyde/MDA) and antioxidative enzyme activity, more precisely superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Hepatic tissue slices were stained for lipids via Oil Red O method and steroid dehydrogenase activity was visualised via Steroid dehydrogenase method. In this study naringenin, co administered with valproate, produced less hepatocyte damage as indicated by ALT activity, yet produced the highest serum lipid index and caused elevated accumulation of lipids in liver (hepatic steatosis). On lipid peroxidation marker (MDA) and antioxidative enzymes (SOD and CAT) naringenin coadministration with valproate produced no uniform protective effect and their parameters were insignificantly different in comparison to the valproate treated and control groups. Naringenin alone and co administered with valproate produced pronounced hyperglycaemia larger than that of valproate treatment alone.

(42 pages, 16 figures, 12 tables, 32 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: valproate, naringenin, oxidative stress, serum markers, glucose, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, Oil Red O

Supervisor: Izv.prof.dr.sc. Domagoj Đikić

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

## Sadržaj:

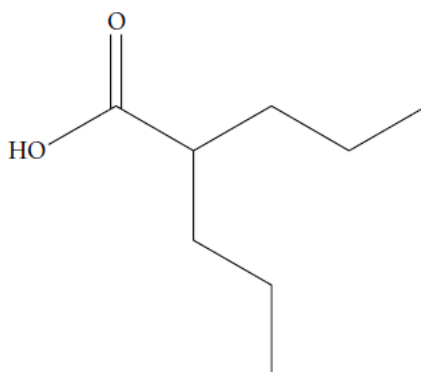
1	Uvod.....	1
1.1	Valproat.....	1
1.2	Farmakokinetika i farmakodinamika valproata .....	1
1.3	Toksičnost valproata .....	2
1.3.1	Opća toksičnost.....	2
1.3.2	Epidemiologija.....	2
1.3.3	Istraživanja na miševima, štakorima i staničnim kulturama .....	3
1.4	Jetra i valproat .....	4
1.4.1	Promjene lipidoma uslijed djelovanja valproata .....	4
1.4.2	Oksidativni i nitrozativni stres u valproatom induciranoj hepatotoksičnosti .....	5
1.4.3	CYP enzimi.....	5
1.4.4	Histološke promjene/Histopatologija .....	6
1.5	Naringenin.....	6
2	Ciljevi rada.....	8
3	Materijali i metode .....	9
3.1	Tretmani miševa .....	9
3.2	VetScan <sup>TM</sup> analiza uzoraka seruma i tkiva jetre .....	9
3.2.1	Alanin aminotransferaza (ALT).....	10
3.2.2	Albumin .....	10
3.2.3	Glukoza.....	10
3.2.4	Ukupni proteini: .....	10
3.2.5	Lipidni indeks .....	11
3.3	Histološke metode .....	11
3.3.1	Vizualizacija lipida u tkivu jetre (Oil Red O) .....	11
3.3.2	Vizualizacija metabolizma steroida u jetri (Metoda steroidnih dehidrogenaza).....	12
3.4	Mjerenje markera oksidativnog stresa .....	12
3.4.1	Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	12
3.4.2	Mjerenje koncentracije malondialdehida (MDA) u jetri .....	13
3.4.3	Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT) u jetri.....	13
3.5	Statistička obrada podataka .....	13
4	Rezultati .....	14
4.1	Lipidi u jetri i serumu .....	14
4.1.1	Lipidni indeks .....	14
4.1.2	Histologija-nakupljanje lipida u jetri (Oil Red O).....	15

4.1.3	Histologija (Metoda steroidnih dehidrogenaza) .....	19
4.2	Proteinski metabolizam .....	20
4.2.1	Ukupni proteini u serumu .....	20
4.2.2	Albumin u serumu.....	21
4.2.3	Globulini u serumu.....	22
4.2.4	Aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) u serumu.....	23
4.3	Glukoza u serumu .....	24
4.4	Antioksidativni pokazatelji u tkivu jetre.....	25
5	Rasprava.....	28
6	Zaključak: .....	32
7	Popis literature.....	33

# 1 Uvod

## 1.1 Valproat

Valproat, odnosno valproična kiselina je antiepileptički lijek dobiven od valerične kiseline, koja je porijeklom iz biljke, valerijana (*Valeriana officinalis*). Kemijski je razgranata kratkolančana masna kiselina (Slika 1.) koja u mozgu povećava koncentraciju inhibicijskog neuroprijenosnika gama-aminomaslačne kiseline (GABA) jer djeluje kao inhibitor histonskih deacetilaza (HDAC) i blokira naponom regulirane ionske kanale. Zahvaljujući spomenutim karakteristikama koristi se kao lijek koji sprječava epileptične napade, a zbog HDAC inhibitorske funkcije ima i primjenu u antitumorskoj terapiji i anti HIV terapiji (Diederich i sur. 2010; Ghodke-Puranik i sur. 2013). Lijek je u primjeni pokazan kao vrlo siguran, ali u malom broju slučajeva terapija dovodi do pojave nuspojava poput zatajenja jetre, teratogenosti, pankreatitisa, oštećenja bubrega, encefalopatije i hiperamonemije (Ghodke-Puranik i sur. 2013; Hussein i sur. 2013; De Michele i sur. 2018). Nuspojave su najčešće kod male djece, mlađe od 2 godine, a doze su među odraslima vrlo varijabilne. Za terapiju je karakteristično stalno praćenje stanja pacijenta i koncentracije lijeka u krvi (Ghodke-Puranik i sur. 2013).



Slika 1. Struktura valproične kiseline (valproata). Preuzeto iz (Diederich i sur. 2010).

## 1.2 Farmakokinetika i farmakodinamika valproata

Zahvaljujući povećanju koncentracije GABA-e u mozgu i blokiranjem naponom reguliranih kanala neurona valproat se koristi kao antiepileptički, odnosno antikonvulzivni lijek. Smanjena koncentracija GABA-e povezana je sa konvulzivnim stanjima. Povećanje koncentracije GABA-e postiže se inhibicijom aktivnosti enzima GABA transaminaze i sukcinat semialdehid dehidrogenaze koji su dio kaskade razgradnje GABA-e. Dodatno, blokiranje aktivnosti naponom reguliranih ionskih kanala  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  umanjuje mogućnost visokofrekventnog ispaljivanja neurona koje bi pokrenulo napadaj (Ghodke-Puranik i sur. 2013). Valproat inhibitorno utječe i na histonske deacetilaze koje normalno smanjuju acetilaciju histona, odnosno promoviraju kondenziranu strukturu DNA. Valproat djeluje na HDAC klasa 1a, 1b i 2a čija se aktivnost najviše spominje u neuronima što može djelomično objasniti neurofarmakološke efekte. Iznimka su HDAC9 i HDAC11 čija aktivnost je u tumorskim stanicama povećana u prisutnosti valproata, te HDAC6, 8 i 10 na koje nema utjecaja. HDAC inhibitorna aktivnost važna je u anti HIV terapiji i u protutumorskoj terapiji zbog indukcije apoptoze inficiranih i tumorskih stanica (Diederich i sur. 2010; Ghodke-Puranik



i sur. 2013). Farmakodinamiku valproata obilježava visoka vezanost valproata za proteine i posljedično sporo izlučivanje (6-20mL/h/kg). Valproat se metabolizira pomoću 3 različita metabolička puta: glukuronidacijom,  $\beta$ -oksidacija, citokrom P-450. Aktivnost ovih metaboličkih puteva ovisna je o dobi i genomskoj strukturi što objašnjava različito doziranje lijeka od pojedinca do pojedinca i djelomično osjetljivost na valproat u male djece (Diederich i sur. 2010; Ghodke-Puranik i sur. 2013; Monostory i sur. 2018). Glavni metabolički put je glukuronidacija normalno zaslužna za metaboliziranje 50% valproata, zatim  $\beta$ -oksidacija sa 40% i CYP odnosno citokrom P-450 enzimi sa približno 10%. Rezultat glukuronidacije je valproat glukuronid koji se izlučuje mokraćom. Konačni produkti CYP puta metaboliziranja valproata su 3-,4-,5-hidroksivalproat i 4-en-valproat.  $\beta$ -oksidacija valproata u mitohondrijima proizvodi 3-keto-valproat i 2-en-valproat, a u proces  $\beta$ -oksidacije može ući i 4-en-valproat. Daljnjom oksidacijom 2-en i 4-en valproata može se formirati 2,4-dien-valproat koji se konjugira sa glutationom i može iscrpiti mitohondrijske zalihe glutationa (Ghodke-Puranik i sur. 2013; Monostory i sur. 2018). Konjugati 2,4-dien valproata i koenzima A (CoA) mogu inhibirati neke enzime u kaskadi  $\beta$ -oksidacije (Ghodke-Puranik i sur. 2013).

### 1.3 Toksičnost valproata

#### 1.3.1 Opća toksičnost

Za valproat opisan je veći broj različitih toksičnih učinaka među koje se ubrajaju hepatotoksičnost, neurotoksičnost, teratogenost, utjecaj na trudnoću i razvoj ploda, hiperamonemija i više hematoloških poremećaja (Chaudhary i Parvez 2018; Diederich i sur. 2010; Ghodke-Puranik i sur. 2013). Hepatotoksičnost valproata je u velikoj mjeri rezultat biološke aktivnosti 2 i 4-en-valproatnih metabolita. Utjecaj na intrauterini razvoj i plodnost valproat postiže kroz interakcije sa ciklusom folata, dok u vitamin K ovisnoj koagulopatiji dolazi do vezanja valproata na receptore vitamina K, koji ima kraći poluzivot u serumu. Za većinu toksičnih efekata zajednički su mehanizmi oksidacijskog stresa što je i dokazano mnogim studijama koterpapije valproata i antioksidativnih spojeva (Chaudhary i Parvez 2018).

#### 1.3.2 Epidemiologija

Valproat se u praksi pokazao kao vrlo siguran lijek u usporedbi s drugim antiepilepticima i antikonvulzivima te se u kliničkoj primjeni teške nuspojave poput zatajenja jetre pojavljuju samo u 0,16% tretirane male djece (Diederich i sur. 2010). Iako je zatajenje vrlo rijetko tretman valproatom uzrokuje zamašćivanje jetre u 61% korisnika (Zhang i sur. 2014). Česte nuspojave tretmana valproatom su opisane kao blage i reverzibilne i uključuju uspavanost i produljeni san te porast tjelesne težine kod djece i tinejđera. Promjene u hematopoezi poput trombocitopenije, disfunkcije trombocita, nedostatka faktora XIII, hiperfibrinogenemije i vitamin K ovisne koagulopatije zabilježene su u 4% tretirane djece. Tretman valproatom u 67% slučajeva uzrokuje von Willenbrandovu bolest u djece i u 16% odraslih te 9 puta povećava učestalost pojave aplastične anemije. U većini hematopoetskih promjena nije poznat mehanizam kojim valproat uzrokuje bolest.

Od neuroloških nuspojave osim stanja zabilježenih u izoliranim slučajevima spominje se parkinsonizam u 1,37% tretiranih u trajanju do jedne godine pa do 5,04% u tretiranih 3 godine

i dulje. Uloga valproata u parkinsonizmu nije razjašnjena. Encefalopatija je stanje opisivano kao posljedica hiperamonemije, ali se u izoliranim slučajevima pojavljuje i samostalno zbog čega se sumnja na izravni utjecaj valproata na neurotransmitere. Posljedica terapije valproatom je i smanjena plodnost u 25% tretiranih te trostruko povećana učestalost kongenitalnih malformacija pri terapiji za vrijeme trudnoće. Opisani su i poremećaji autističnog spektra, smanjena IQ vrijednost i poteškoće u govoru kod djece nakon trudnoće sa terapijom valproatom (Diederich i sur. 2010).

### 1.3.3 Istraživanja na miševima, štakorima i staničnim kulturama

Istraživanje tretmana laboratorijskih miševa i štakora valproatom pokazuju iste mehanizme oštećenja kao ljudi i njihova tkiva. U istraživanjima utjecaja valproata na intrauterini razvoj i kasnije socijalno ponašanje i mozak kod štakora pokazano je smanjenje socijalnosti i socijalne znatiželje. Takvi nalazi slažu se s pojavom poremećaja autističnog spektra u ljudi. Pokazano je i smanjenje hipokampalne ekspresije gena za serotonin i BDNF (Brain derived neurotrophic factor) vezan uz funkciju serotonergičnih neurona i sinaptičku plastičnost. Promjene ekspresije gena za BDNF i serotonin značajne su kod mužjaka i manjeg opsega u ženki štakora. Pronađeno je i smanjenje ekspresije nurolina (NGLN) bitnih za sinaptičko sazrijevanje, povećanje markera oksidativnog oštećenja DNA u hipokampusu mužjaka te povećanje ekspresije proupalnih citokina u hipokampusu mužjaka (Win-Shwe i sur. 2018). Ispitivanjima valproatom induciranih promjena u aktivnosti neuralnih transportera nutrijenata na štakorima pronađen je pad aktivnosti glukoznog transportera Glut1. U istoj studiji pokazana je i HDAC inhibitorna funkcija valproata padom acetilacije histona H3 i H4 u ovisnosti o dozi (Bukner i sur. 2018). U tumorskih staničnih linija i štakorskim jetrama pokazan je utjecaj valproata na ekspresiju ABCB1 glikoproteina.

U gravidnih miševa pokazana je promjena ekspresije folatnog receptora  $\alpha$ . Promjene ekspresije gena za transportere folata i drugih nutrijenata pokazane su i u ljudskim placentalnim staničnim linijama (Bukner i sur. 2018). Studija neurotoksičnosti valproata na sinaptosome štakora pokazala je povećane koncentracije lipidnih peroksida, proteinskih karbonila, dušikovog (II) oksida i povećanu aktivnost monoamin oksidaza.

Ti nalazi ukazuju na mehanizam oksidativnog i nitrozativnog stresa u oštećenjima. Istom studijom pokazan je pad aktivnosti  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATP-aza te smanjena aktivnost acetilkolina u sinaptosomima (Chaudhary i Parvez 2018). Ispitivanjima hepatotoksičnosti valproata na štakorima pronađeno je povišenje markera oksidativnog stresa poput malondialdehida (MDA) i glutation-S-transferaze ( $\alpha$ -GST) u krvi. Povećane koncentracije alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) u krvnoj plazmi ukazuju na narušavanje funkcije jetre. Tretmani valproatom uzrokuju povećanje plazmatskih i jetrenih koncentracija lipida te smanjenje ukupnog kolesterola i broja HDL i LDL čestica u serumu u ovisnosti o dozi. Marker oksidacijskog stresa zajedno sa promjenama enzima i lipidnih čestica u krvi ukazuju na oštećenja jetrenog metabolizma lipida i strukture stanica. Smanjene koncentracije kolesterola, slobodnih masnih kiselina i njihovih metabolita u žuči dodatno potvrđuju narušavanje jetrenog metabolizma masti. Pronađeno smanjene plazmatskih koncentracija esencijalnih aminokiselina i smanjeno izlučivanje limunske kiseline u žuči ukazuju na kompenzaciju  $\beta$ -oksidacije pomoću katabolizma aminokiselina u jetri. U urinu su pronađeni povišeni metaboliti mikrosomalne  $\omega$ -

oksidacije masti što ukazuje na specifično narušavanje  $\beta$ -oksidacije. Smanjenje koncentracije uree i povišeni prekursori za sintezu uree u urinu ukazuju na mitohondrijska oštećenja. Pronalasci ukazuju na narušen energetskei metabolizam hepatocita i nedostatak energetskei važnih molekula i prekursora poput acetyl-CoA. Povećana koncentracija glukuronida u urinu potvrđuje glukuronidaciju kao najzastupljeniji mehanizam metaboliziranja valproata. Nakupljanje isključivo visceralnog sala u štakora ukazuje na nenarušen mehanizam  $\beta$ -oksidacije u mišićima. Hepatotoksičnost valproata povećava se u kombinaciji sa masnom dijetom (Zhang i sur. 2014). Istraživanjima na miševima i štakorima pronađeni su i spojevi koji smanjuju toksične efekte valproata. Neki od njih su melatonin u neurotoksičnosti i tiol reducirajući spojevi u hepatotoksičnosti koji djeluju kao antioksidansi (Chaudhary i Parvez 2018; Najafi i sur. 2017). Važno je naglasiti kako su lipidni metaboliti i geni metabolizma masti različiti kod miševi i čovjeka, stoga studije hepatotoksičnosti nisu direktno prevodljive na čovjeka (Xu i sur. 2019).

#### 1.4 Jetra i valproat

##### 1.4.1 Promjene lipidoma uslijed djelovanja valproata

Promjene u koncentracijama lipida u serumu i hepatocitima rasvjetljavaju oštećenja i mehanizme nastanka oštećenja prilikom tretmana valproatom. Značajne razlike u serumskom lipidomu pronađene su između pacijenata sa narušenim stanjem jetre u odnosu na zdrave tijekom kliničkih tretmana valproatom. Promjene u lipidomu koreliraju sa promjenama u serumskoj koncentraciji enzima alanin aminotransferaze (ALT) koji je uz aspartat aminotransferazu (AST) najbolji i široko korišten pokazatelj funkcije jetre. Promjene uključuju pad serumskih koncentracija lizofosfatidilkolina (LPC), sfingomijelina (SM) i ceramida (Cer), dok koncentracija triacilglicerola (TAG) porasta. Pad serumske koncentracije LPC-a posljedica je indukcije gena za enzime uključene u prevođenju LPC-a u fosfatidilkoline (PC) čija ekspresija je inducirana porastom koncentracija proupalnih citokina (IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) čije su ekspresije porasle u LO2 ljudskim staničnim linijama hepatocita tretiranim valproatom. Odnosno upalni proces prethodi smanjenju serumske koncentracije LPC-a. Porast unutarstanične koncentracije TAG pokazan je i u staničnoj liniji LO2 sa većim porastom koncentracija duljih i višestruko nezasićenih TAG. Porast unutarstaničnih TAG prati i porast unutarstaničnih koncentracija mono- i polinezasićenih masnih kiselina (MUFA i PUFA) te dugolančanih slobodnih masnih kiselina (FFA) duljih od 20 ugljikovih (C) atoma.

Valproat povećava ekspresiju CD36, FATP i FABP1 membranskih proteina zaslužnih za transport masnih kiselina u hepatocite. Povišena unutarstanična koncentracija TAG-a povezana je sa povećanom ekspresijom PPAR $\gamma$  gena za transkripcijski faktor PPAR- $\gamma$  koji potiče smanjenje  $\beta$ -oksidacije i *de novo* sintezu masnih kiselina. Povećanje količine unutarstaničnih TAG objašnjava i porast ekspresije gena za sintezu TAG (DGAT2, AGPAT1, GPAM, SCD1).

Povećane serumske koncentracije lipida povezuju se s povećanom ekspresijom lipidnih transportera ABCB1, ABCG1 i ApoB100 prilikom tretmana valproatom. Povećana ekspresija transkripcijskog faktora PPAR- $\gamma$  svojim utjecajem na ekspresiju gena CD36 i DGAT2 zajedno sa valproatom induciranim smanjenjem ekspresije gena CPT1A za limitirajući enzim u  $\beta$ -oksidaciji dovode do nagomilavanja lipida u hepatocitima jetre. U LO2 hepatocitima pokazano

je povećanje ekspresije gena dvaju enzima  $\beta$ -oksidacije (EHHADH i ALDH3A2) koji su nizvodne mete transkripcijskog faktora PPAR- $\alpha$ . Aktivnost PPAR- $\alpha$  potiče oksidaciju masti i njegova aktivnost je vjerojatno odgovor na povećane unutarstanične koncentracije masnih kiselina. Zbog efekta valproata na CPT1A, unatoč aktivnosti PPAR- $\alpha$  i nizvodnih gena odvijanje  $\beta$ -oksidacije u hepatocitima je onemogućeno. Povezanost PPAR- $\gamma$  sa CD36 i DGAT2 dokazana je tretmanima stanica specifičnim agonistima i antagonistima PPAR- $\gamma$ . Tretmanima LO2 stanica valproatom djelovalo se na signalni put Akt koji je u normalnim fiziološkim uvjetima pod inzulinskom regulacijom. Posljedica djelovanja valproata na Akt signalnu kaskadu je i povećana ekspresija gena GLUT4 za Glut4 glukozni transporter. Jedan od nizvodnih gena Akt signalne kaskade je i PPARG. PI3K/Akt signalni put važan je u regulaciji metabolizma masti. (Xu i sur. 2019)

#### 1.4.2 Oksidativni i nitrozativni stres u valproatom induciranoj hepatotoksičnosti

Postoje pretpostavke da je oksidacijski stres osnovni mehanizam u oštećenjima jetre induciranim valproatom. Studije hepatotoksičnosti valproata na laboratorijskim miševima i štakorima pa tako i ljudima pokazuju povišene serumske i stanične markere oksidacijskog stresa. Promjene uzrokovane tretmanom stanica ili životinja/ljudi valproatom uključuju povišenje markera lipidne peroksidacije poput malondialdehida (MDA), 15-Ft-izoprostana i 4-hindoksinonenala (4-HNE) i smanjene razine staničnog i mitohondrijskog glutaciona (GSH) (Ahmed i sur. 2018; Chang i Abbott 2006; Najafi i sur. 2017). U štakora pokazano je iscrpljene staničnog GSH te povišeni 15-Ft-izoprostan u stanicama i plazmi nakon tretmana valproatom. Dodatno 15-Ft-izoprostan pronađen je u urinu ljudi tretiranih valproatom u povišenoj razini (Chang i Abbott 2006).

Na ljudima je pokazano i povišenje koncentracija MDA u plazmi te smanjenje staničnog GSH uz smanjenu aktivnost superoksid dismutaze (SOD), enzima zaduženog za prevođenje superoksidnog radikala u vodikov peroksid (Ahmed i sur. 2018). Kod miševa tretiranih valproatom pokazano je i povišenje koncentracije 4-HNE u jetri (Cleary 2019). Povišeni markeri lipidne peroksidacije dokazani su i u odsustvu nižih toksičnih metabolita valproata poput 4-en-valproata što ukazuje na moguću toksičnost samog valproata (Chang i Abbott 2006; Cleary 2019). Dio oksidativnog i nitrozativnog stresa proizlazi iz upalnog odgovora, odnosno valproatom povećane ekspresije gena faktora NF- $\kappa$ B i gena iNOS (inducibilne NO sintaze). Njihova aktivnost potiče imunosni odgovor koji uključuje oksidativni i nitrozativni stres kao mehanizam obrane organizma (Ahmed i sur. 2018). Unatoč poznatoj ulozi ROS i RNS u valproatom uzrokovanj hepatotoksičnosti, nije utvrđen točan izvor oksidativnih radikala u stanici, odnosno izvor nisu isključivo mitohondriji kao jedna od glavnih oštećenih struktura. Također je nejasno prethodi li oksidativni stres steatozi i nekrozi jetre ili ne (Chang i Abbott 2006; Cleary 2019).

#### 1.4.3 CYP enzimi

Aktivnost citokrom P450 sustava (CYP enzimi) kod ljudi zaslužna je za metaboliziranje približno 10% unesenog valproata u odraslih. Neki od toksičnih metabolita valproata poput 4-

en-valproata rezultat su aktivnosti CYP enzima. Iako je CYP sustav zaslužan za mali dio metabolizma valproata, može postati vrlo bitan u ljudi kod kojih mehanizam glukuronidacije i/ili  $\beta$ -oksidacije ne funkcionira na normalnoj razini i u djece. (Ghodke-Puranik i sur. 2013; Monostory i sur. 2018) Aktivnost CYP sustava, kao i drugih sustava uključenih u metabolizam valproata ovisna je o dobi pa je tako u male djece glukuronidacija tj. aktivnost UDP-glukuronil transferaza vrlo slaba, a CYP sustav je jače eksprimiran i zauzima glavnu metaboličku ulogu. Aktivnost mehanizma glukuronidacije postepeno raste do razina utvrđenih u odraslih kroz 10 do 15 godina. Istovremeno aktivnost i ekspresija gena CYP sustava pada sa veće ekspresije od one u odraslih kod djece do adultnih razina. Veća aktivnost CYP sustava povećava vjerojatnost valproatom inducirane hepatotoksičnosti zbog povećane produkcije 4-en-valproata koji se dalje metabolizira u mitohondrijima i producira 2,4-dien-valproat koji iscrpljuje GSH u mitohondrijima. Na veliku zastupljenost CYP sustava u djece ukazuje i korelacija serumskih koncentracija valproata sa CYP genotipom što izostaje u odraslih. Geni CYP sustava podliježu vrlo velikoj intrapopulacijskoj varijabilnosti te je ekspresija CYP gena promjenjiva pod utjecajem okoliša, odnosno osjetljiva na politerapiju, prehranu, hormonsku strukturu, bolesti i druge faktore. Okolišni faktori mogu potaknuti povećanu ekspresiju CYP gena. Enzimi CYP2C9, CYP2A6 i CYP2B6 identificirani su kao značajni u metaboliziranju valproata (Monostory i sur. 2018).

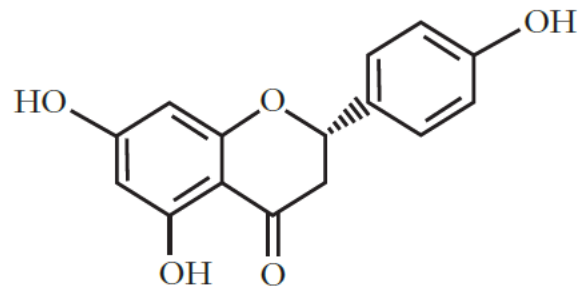
#### 1.4.4 Histološke promjene/Histopatologija

Pregledima histoloških preparata jetara valproatom tretiranih pacijenata i laboratorijskih životinja utvrđene su razne patološke promjene. U štakora utvrđene su lezije i steatoza (nakupljanje lipida), u miševa upala, piknoza i širenje sinusa jetre. (Najafi i sur. 2017; Zhang i sur. 2014) U ljudi utvrđene su upala, steatoza i nekroza hepatocita. (Ahmed i sur. 2018) Imunohistokemijskom metodama utvrđeno je veće stvaranje ROS radikala u citoplazmi hepatocita u odnosu na mitohondrije i najveće stvaranje ROS radikala u pericentralnim područjima acinusa jetre koji su ujedno i najhipoksičnije zone jetre i stoga vrlo osjetljiva na oksidativni stres (Cleary 2019).

#### 1.5 Naringenin

Naringenin je flavonoid kemijskog imena 2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on koji pripada skupini flavonona, najčešće nađen u voćkama porodice citrusa (*Citrus*). Mnoge *in vivo* i *in vitro* studije na zdravim laboratorijskim životinjama i kliničke studije pokazale su brojne pozitivne učinke naringenina na zdravlje. Pozitivni učinci uključuju smanjenje markera lipidne peroksidacije, pojačavanje sustava antioksidativne obrane, radikal sakupljačku aktivnost, promociju metabolizma ugljikohidrata, modulaciju imunskih odgovora, modulaciju metabolizma masti prema  $\beta$ -oksidaciji i sprječavanje nagomilavanja lipida u hepatocitima jetre (Assini i sur. 2015; Hartogh i Tsiani 2019; Mulvihill i sur. 2016; Rashmi i sur. 2017; Salehi i sur. 2019). Naringenin je osobito zanimljiv kandidat za koadministraciju uz valproat zbog navedenih hepatoprotektivnih i antioksidativnih svojstava, te sprječavanja nakupljanja masti u jetri. Smatramo kako bi naringenin mogao usporiti ili spriječiti oštećivanje jetre nastalo uzimanjem valproata putem svojih antioksidativnih, imunomodulacijskih i hepatoprotektivnih svojstava, osobito radikal sakupljačkom aktivnošću,

smanjenjem razine lipidne peroksidacije i smanjivanjem nagomilavanja lipida u hepatocitima jetre.



Slika 2. Struktura naringenina. Preuzeto iz (Mulvihill i sur. 2016).

## **2 Ciljevi rada**

Cilj ovog rada je odrediti može li naringenin koadministriran sa valproatom pomoći umanjiti hepatotoksične učinke valproata u jetre muških C57Bl miševa.

### 3 Materijali i metode

#### 3.1 Tretmani miševa

Pokus je proveden na odraslim C57Bl 6 miševima muškog spola, starosti cca. 30 dana, prosječne mase 25-30 g uzgojenima u uzgojnoj jedinici za laboratorijske životinje Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su raspoređene u pokusne skupine od po 6 životinja obzirom na tretman i to: kontrolna skupina (K), tretman valproatom (V), tretman naringeninom (N) i kombinirani tretman valproatom i naringeninom (V+N). Tijekom 15 dana pokusnog tretmana, životinjama su svakodnevno gastričkom kanilom aplicirane istraživane kemikalije u slijedećim količinama:

- I. Skupina K- kontrola, oralno će svakodnevno primiti 0.2 ml fiziološke otopine aplicirane gastričkom kanilom
- II. Skupina V– oralno će svakodnevno primiti terapijsku dozu valproata od 150 mg/kg životinje aplicirane gastričkom kanilom
- III. Skupina N– oralno će svakodnevno tretirati će se otopinom polifenola naringenina u dozi od 25 mg/kg životinje aplicirane gastričkom kanilom
- IV. Skupina N+V – tretirati će se sa kombinacijom doza skupina navedenih pod stavkama 2.(V) + 3.(N) aplicirane gastričkom kanilom

Prije izolacije tkiva životinje su anestetizirane mješavinom Xylapana i Narketana (ip 25 mg/kg tj.m.), te iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Jetra, mozak, bubreg i tanko crijevo izvađeni su i izvagani na analitičkoj vagi. Prije vaganja, sadržaj tankog crijeva je prethodno ispražnjen. Za određivanje biljega oksidacijskog stresa i antioksidacijskog kapaciteta, dijelovi jetre, mozga, bubrega i tankog crijeva se homogeniziraju u 50 mM fosfatnom puferu (pH = 7) u omjeru 1:10 (w/v). 50 mM fosfatni pufer pripremljen je miješanjem 17 mL 0,2 M otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i 183 mL 0,2 M otopine  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , uskladi se pH, te se nadopuni  $\text{dH}_2\text{O}$  do 800 mL. Uzorci tkiva sonificirani su ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka), snagom od 10%. Uzroci su sonificirani u 3 ciklusa po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa na +4 °C. Svi postupci su izvođeni na ledu. Sonificirani homogenati centrifugiraju se na 2000 x g 15 minuta u ultracentrifugi Mikro 200R (Hettich, Njemačka) s hlađenjem na +4 °C. Dobiveni supernatanti služe za trenutačno određivanje biljega oksidacijskog stresa ili se pohranjuju na -80 °C za naknadno određivanje njihovih aktivnosti.

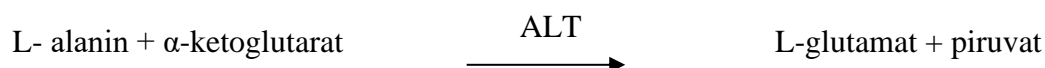
#### 3.2 VetScan<sup>TM</sup> analiza uzoraka seruma i tkiva jetre

Uzorci seruma dobiveni iz cijele krvi miševa iz tretmana odmrznuti su i prema naputcima proizvođača uređaja Abaxis VetScan<sup>TM</sup>, hepariniziranom mikropipetom prebačeni su u rotor uređaja u količini od 100µL te je pokrenuta analiza. U nastavku ulomka navedeni su detalji funkcioniranja provedenih ispitivanja na uređaju VetScan<sup>TM</sup>.



### 3.2.1 Alanin aminotransferaza (ALT)

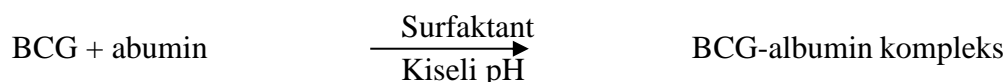
U reakciji, ALT katalizira prijenos amino skupine od L-alanina do  $\alpha$ -ketoglutarata za formiranje L-glutamata i piruvata. Laktat dehidrogenaza (LDH) katalizira konverziju piruvata u laktat. Posljedično, NADH se oksidira u  $\text{NAD}^+$  kao što je prikazano na reakcijskoj shemi.



Stopa promjene razlike u apsorbanaciji između 340nm i 405 nm postoji zbog konverzije NADH u  $\text{NAD}^+$  i direktno je proporcionalna količini ALT-a prisutnog u uzorku.

### 3.2.2 Albumin

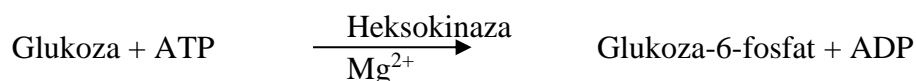
Bromkrezol zelena (BCG) je najčešće korištena metoda sa vezivanjem boja.



Koncentracija vezanog albumina proporcionalna je koncentraciji albumina u uzorku. Prikazana je konačna reakcija koja se mjeri biokromatski pri 630 nm i 405 nm valne duljine svjetlosti.

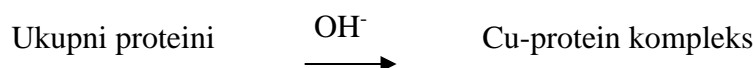
### 3.2.3 Glukoza

Abaxis metoda za mjerenje koncentracije glukoze u serumu je modificirana heksokinazna metoda. Reakcija glukoze i ATP-a katalizirana heksokinazom (HK) producira glukoza-6-fosfat (G6P) i ADP. Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) katalizira reakciju G6P-a u 6-fosfoglukonat uz redukciju  $\text{NAD}^+$  u NADH.



### 3.2.4 Ukupni proteini:

Abaxis metoda ukupnih proteina modifikacija je biuret reakcije. U biuret reakciji, otopina proteina tretira se bakrovim ionima u vrlo lužnatoj otopini. Natrij kalij tartarat i kalij jodid dodaju se kako bi se spriječila precipitacija bakrova hidroksida i autoredukcija bakra. Bakrovi (Cu(II)) ioni reagiraju sa peptidnim vezama između karbonil kisika i amid dušika čime razvijaju obojeni kompleks bakra i proteina.



Količina ukupnih proteina prisutnih u uzorku izravno je proporcionalna apsorbanciji bakar-proteinskih kompleksa. Test ukupnih proteina je konačna reakcija koja je mjerena kao razlika apsorbancija mjerenih pri 550 nm i 850nm.

### 3.2.5 Lipidni indeks

Lipidni indeks određen je na automatskim postavkama VetScan rezultata koji određuje relativnu količinu lipida u serumu procjenom lipidnog indeksa kao: 0-nizak sadržaj lipida, 1-umjeren sadržaj lipida, 2-visok sadržaj lipida, 3- vrlo visok sadržaj lipida

Svi navedeni serumski testovi opisani su u literaturnom izvoru komercijalnog proizvođača kitova za detekciju metaboličkog I serumskog profila Vet Scan Operator's Manual za sveobuhvatne informacije o korištenju uređaja (VetScan® Comprehensive Diagnostic PN: Profile 500-7123 Rev E Comp Diag Prof. © 2002, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587, edition January 2015).

## 3.3 Histološke metode

### 3.3.1 Vizualizacija lipida u tkivu jetre (Oil Red O)

Za vizualizaciju lipidnih kapljica u tkivu jetre ispitivanih miševa korišten je komercijalno dostupan kit Sigma-Aldrich Lipid (Oil Red O) Staining Kit™ prema protokolu proizvođača. Radna otopina Oil Red O boje dobivena je razrjeđivanjem 6 mL Stock otopine Oil Red O (Sigma-Aldrich) sa 4mL destilirane vode, nakon čega je ostavljena 10 minuta na sobnoj temperaturi i filtrirana filter papirom. Prerezi jetre dobiveni su rezanjem u kriostatu i prebačeni su na predmetna stakalca. Dobiveni prerezi jetre na stakalcima fiksirani su u čistim zdjelicama otopinom 4%-tnog paraformaldehida pripremljenog otapanjem 2g paraformaldehida u 50mL PBS pufera u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Stakalca sa prerezima su zatim prebačeni u zdjelice sa 60%-tnim izopropilnim alkoholom i ostavljeni 5 minuta, nakon čega bojani predpripremljenom radnom otopinom Oil Red O (Sigma-Aldrich) boje u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon bojanja stakalca sa prerezima prebačena su u 60%-tni izopropilni alkohol u trajanju od 2 minute nakon čega su isprana destiliranom vodom. Isprani stakalca sa prerezima umočena su u otopinu hematoksilina u trajanju od 10 sekundi, kratko umočena u pufer 3-4 puta i isprana destiliranom vodom. Na stakalca s prerezima dodane su pokrovnice sa kapljicom tople glicerol želatine. Prerezi su zatim promatrani svjetlosnim mikroskopom i fotografije su prikupljene u softverskom paketu Carl-Zeiss™. Fotografije su obrađene u Fiji Image J programu i izrađeni su histogrami boja.

### 3.3.2 Vizualizacija metabolizma steroida u jetri (Metoda steroidnih dehidrogenaza)

Kako bismo vizualizirali jetrene aktivnosti steroidnih dehidrogenaza, odnosno aktivnost steroidnog metabolizma i lokaciju nakupljenih steroida upotrijebili smo metodu steroidnih dehidrogenaza prema Hart, 1996.

Pripremljenje su stock otopina kolesterola u dimetilformamidu otapanjem 2mg kolesterola u 2.5mL dimetilformamida i nitroblue tetrazolija (NBT) otapanjem 1.4mg NBT-a u 2.5mL PBS pufera. Prerezi jetrenog tkiva debljine 16 $\mu$ m pripremljeni su u kriostatu i fiksirani na predmetna stakalca pa je svaki tretman podijeljen na kontrolni niz prereza i reakcijski niz. Stakalca reakcijske grupe nakapana su otopinom dobivenom miješanjem 1.25mL stock otopine kolesterola, 1.25mL stock otopine NBT-a i 5mg oksidiranog nikotinamid dinukleotida (NAD<sup>+</sup>), dok su kontrole nakapa istom otopinom gdje je stock otopina kolesterola zamijenjena sa 1.25mL dimetilformamida. Nakon nakapavanje grupirani uzorci su odmah prebačeni u termostat na 37°C u trajanju od 35 minuta.

U samom tkivu NBT reagira sa postojećim i stvorenim NADH/NADPH i reducira se do netopljivog formazana vidljivog kao plavo-ljubičasto obojenje pod mikroskopom. Nakon inkubacije preostala otopina na stakalcima se odlije te se stakalca ispiru kroz 4 urona u formol salini i 6 urona u destiliranoj vodi. Na predmetna stakalca se zatim dodaju pokrovnice i preparati se pregledavaju pod svjetlosnim mikroskopom.

### 3.4 Mjerenje markera oksidativnog stresa

#### 3.4.1 Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaza je metaloenzim koji katalizira reakciju nastajanja dvaju superoksidnih radikala ( $O_2^{\cdot -}$ ) te se temelji na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza. Temelji se na metodi Flohé i Ötting, 1971.

Metoda kojom smo mjerili aktivnost superoksid dimutaze u ovom radu koristi dvije slijepa probe. Prva slijepa proba se sastoji od otopine A (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u destiliranoj vodi) čija se apsorbancija mjeri na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služi namještanju aktivnosti enzima ksantin oksidaze (XOD). Sljedeći korak je miješanje 1,45 mL otopine A, 25 $\mu$ L dH<sub>2</sub>O te 20-30  $\mu$ L XOD (0,8 U/mL), nakon čega se otopina odmah brzo promiješa, prebaci u kivetu te se mjeri promjena apsorbancije što označava aktivnost enzima XOD. Nakon što se postigne optimalna aktivnost SOD ( $\Delta A=0,0025$ , s obzirom na volumen XOD), u svaku reakcijsku smjesu umjesto dH<sub>2</sub>O dodaje se 25  $\mu$ L uzorka i odgovarajući volumen XOD, te se odmah mjeri apsorbancija. Enzimatska aktivnost izražava se kao postotak inhibicije aktivnosti XOD  $\% \text{inhibicije} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{slijepa proba}}) * 100$ .

Reakcijska otopina A (za SOD):	190 mL 0,05 mM citokroma c (29 mg citokroma c u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
--------------------------------	---

Otopina B enzima ksantin oksidaze (aktivnost 0,8 U/mL):	40 L ksantin oksidaze i 960 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O
---	---

### 3.4.2 Mjerenje koncentracije malondialdehida (MDA) u jetri

Količina lipidne peroksidacije određena je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. 2008. Metodom se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbituratom (TBA) pri čemu se stvara kromogen čiju je količinu moguće mjeriti spektrofotometrijski.

U Eppendorfer epruvetu dodano je 100  $\mu$ L 8,1%-tnog natrij dodecil sulfata (SDS), 750  $\mu$ L 20%-tne octene kiseline (pH=3,5), 750  $\mu$ L 0,8%-tnog TBA i 100  $\mu$ L homogeniziranog uzorka jetre. Dobivena otopina je stavljena u vodenu kupelj na 100 °C u trajanju od 60 minuta, nakon čega je naglo ohlađena na ledu i centrifugirana 15 min na 5000 rpm temepraturi od 4–6 °C. Supernatant je odvojen mikropipetom i izmjerena mu je apsorbancija pri 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izražena je kao nmol MDA po mg proteina.

### 3.4.3 Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT) u jetri

Katalazna aktivnost u supernatantu jetre, određena je spektrofotometrijski metodom po Aebiju, 1984. U kiveti je pomiješano 20  $\mu$ L fosfatnog pufera i 980  $\mu$ L 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, što predstavlja slijepu probu. U sljedećoj kiveti je pomiješano 20  $\mu$ L razrijeđenog uzroka (jetra, bubreg, mozak i tanko crijevo) i 980  $\mu$ L 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, čime započinje enzimska reakcija. Svaki uzorak termostatiran je na 25 °C. Aktivnost enzima mjerena je jednu minutu pri valnoj duljini  $\lambda = 240$  nm. Pad u apsorbanciji u jedinci vremena je mjera katalazne aktivnosti, pri čemu je jedinica katalazne aktivnosti definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u minuti kod pH = 7,0 pri 25 °C gdje koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada od 10,3 do 9,2 mM. Aktivnost CAT-a u uzrocima jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva izražena je u  $\mu$ mol razgrađenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po minuti po miligramu proteina ( $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min mg proteina), što odgovara jedinicama CAT-a po miligramu proteina (U CAT/mg proteina).

### 3.5 Statistička obrada podataka

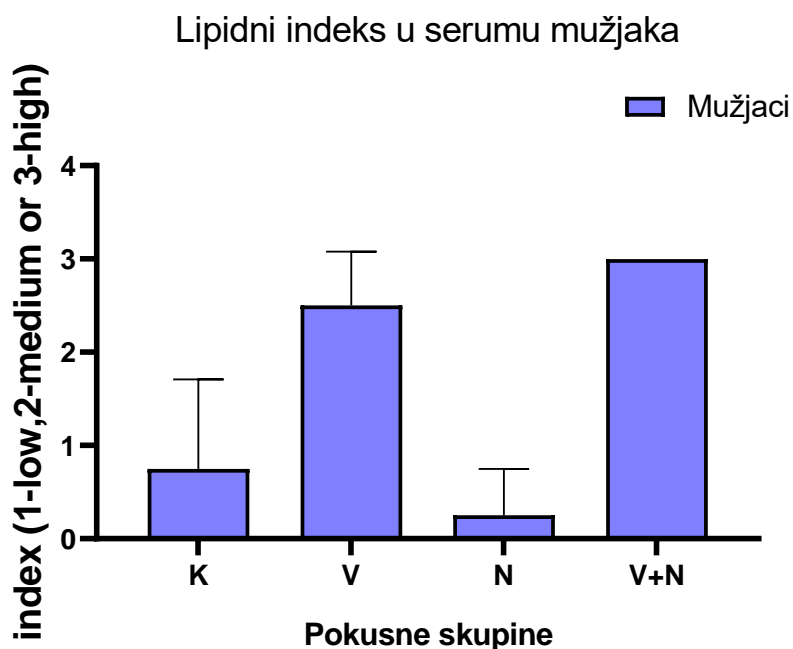
Statistička obrada provedena je u programu GraphPad Prism.

Razlike između skupina su uspoređene na razini statističke značajnosti ( $p \leq 0.05$ ), koristeći ANOVA test sa Tukey's multiple comparisons *post hoc* testom, Analize su napravljene pomoću statističkog programa GraphPad Prism.

## 4 Rezultati

### 4.1 Lipidi u jetri i serumu

#### 4.1.1 Lipidni indeks



Slika 3. Relativna koncentracija serumskih lipida (prikazana kao indeks 0-nizak, 1 -umjeren, 2 - visok, 3-vrlo visok) količine lipida prema Vet Scan™ testu. Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina

Tablica 1. Statistička analiza količine lipida u serumu prema Vet Scan™ testu (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 3.)

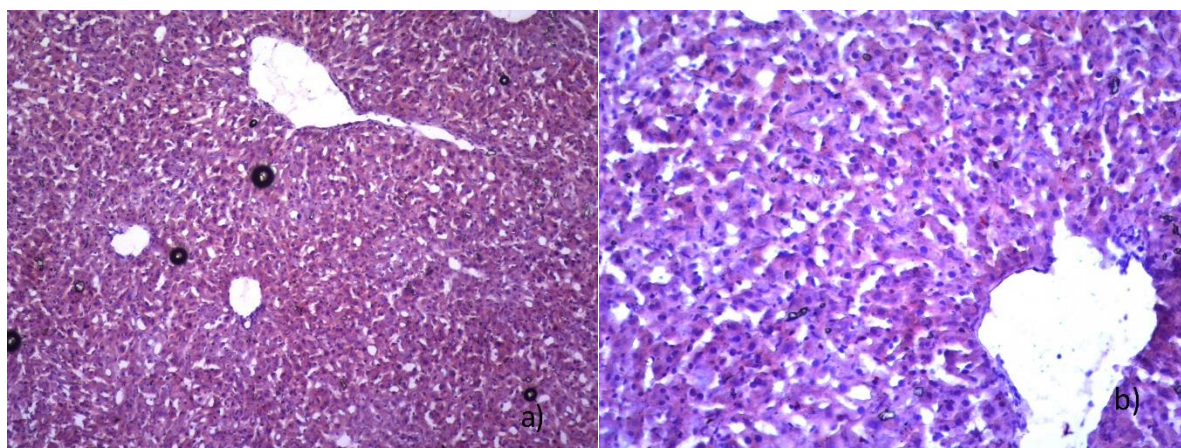
Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike	95,00% CI of diff,	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	-1,750	-3,036 to -0,4644	Da	**	0,0077
K vs. N	0,5000	-0,7856 to 1,786	Ne	nz	0,6647
K vs. V+N	-2,250	-3,536 to -0,9644	Da	**	0,0011
V vs. N	2,250	0,9644 to 3,536	Da	**	0,0011
V vs. V+N	-0,5000	-1,786 to 0,7856	Ne	nz	0,6647
N vs. V+N	-2,750	-4,036 to -1,464	Da	***	0,0002

Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina, ns-nije statistički značajno

Iz rezultata o lipidemičkom indeksu (koncentraciji serumskih lipida) (Slika 3.) i statističke analize količine lipida u serumu (Tablica 1.) vidljivo je statistički značajno povećanje

koncentracije lipida u serumu valproatom (V) tretiranih životinja u odnosu na kontrolne životinje (K). Naringenin administriran samostalno, značajno je smanjio koncentraciju lipida u serumu. Kombinirani tretman naringeninom i valproatom (V+N) doveo je do statistički značajno viših koncentracija lipida u odnosu na skupine K i N , ali statistički ne značajno većih koncentracija lipida u serumu u usporedbi sa skupinom tretiranom samo valproatom (V).

#### 4.1.2 Histologija-nakupljanje lipida u jetri (Oil Red O)



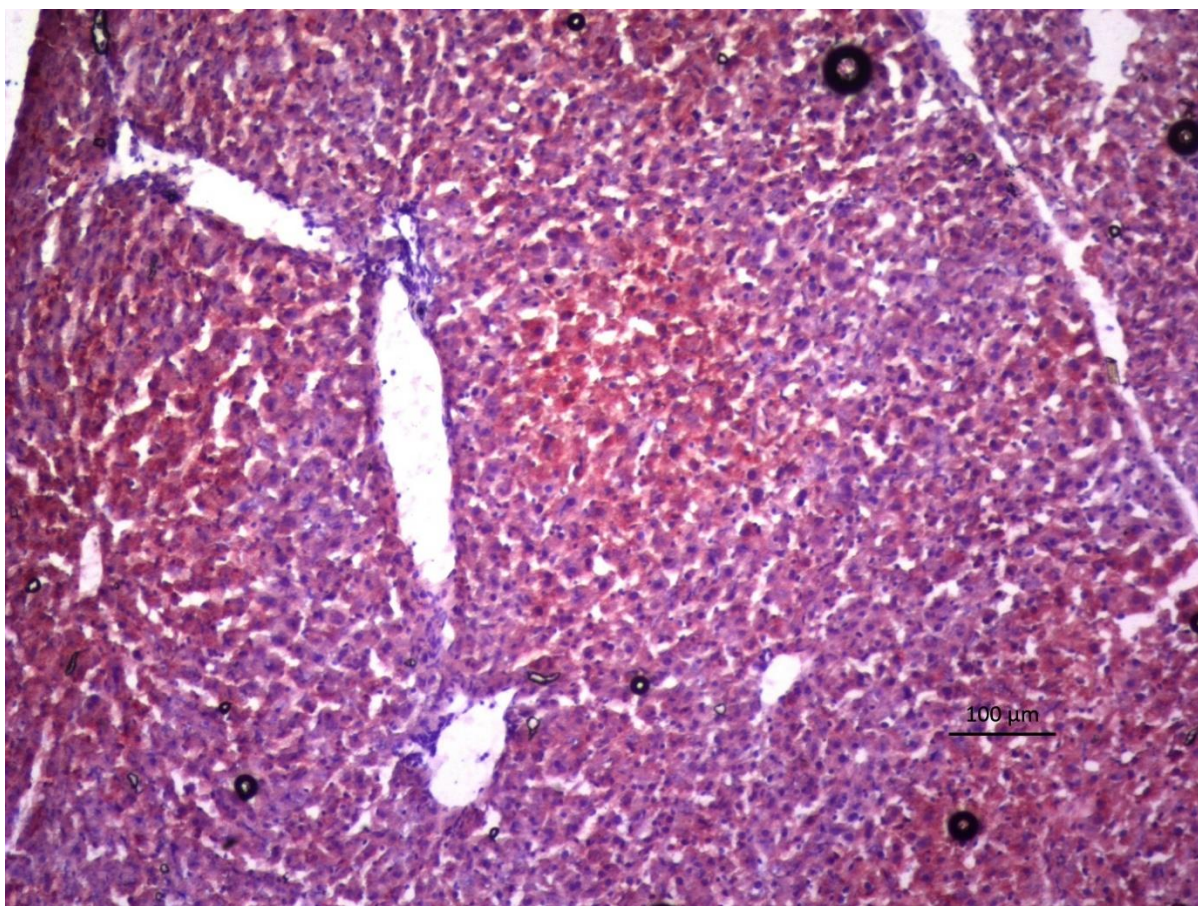
Slika 4. Prerez jetre kontrolne (K) životinje tretirane fiziološkom otopinom. Slika prikazuje nakupine lipida u hepatocitima (mikrovezikularnu steatozu) vizualiziranu Oil Red bojanjem. Lipidi su obojani crveno, a jezgre plavo. a) Povećanje 100x, b) povećanje 200x

Tablica 2. Histogram boja Slike 4.-lijevo izrađen u Fiji Image J programu.

Boja	Medijan	Standardna devijacija
Crveno	124.357	45.37
Zeleno	54.991	56.476
Plavo	134.596	21.367

Na Slici 4. a) vidljivo je plavo-ljubičasto obojenje jezgara jetrenih stanica i blaže crveno obojenje u citoplazmi hepatocita. Na slici 4. desno vidljivo je točkasto crveno obojenje u citoplazmi hepatocita što je lokacija lipidnih kapljica. Intenzivno crveno obojenje očekivano izostaje što je vidljivo i iz histograma boja (Tablica 2.) što znači da nema veće količine lipidnih kapljica u hepatocitima.





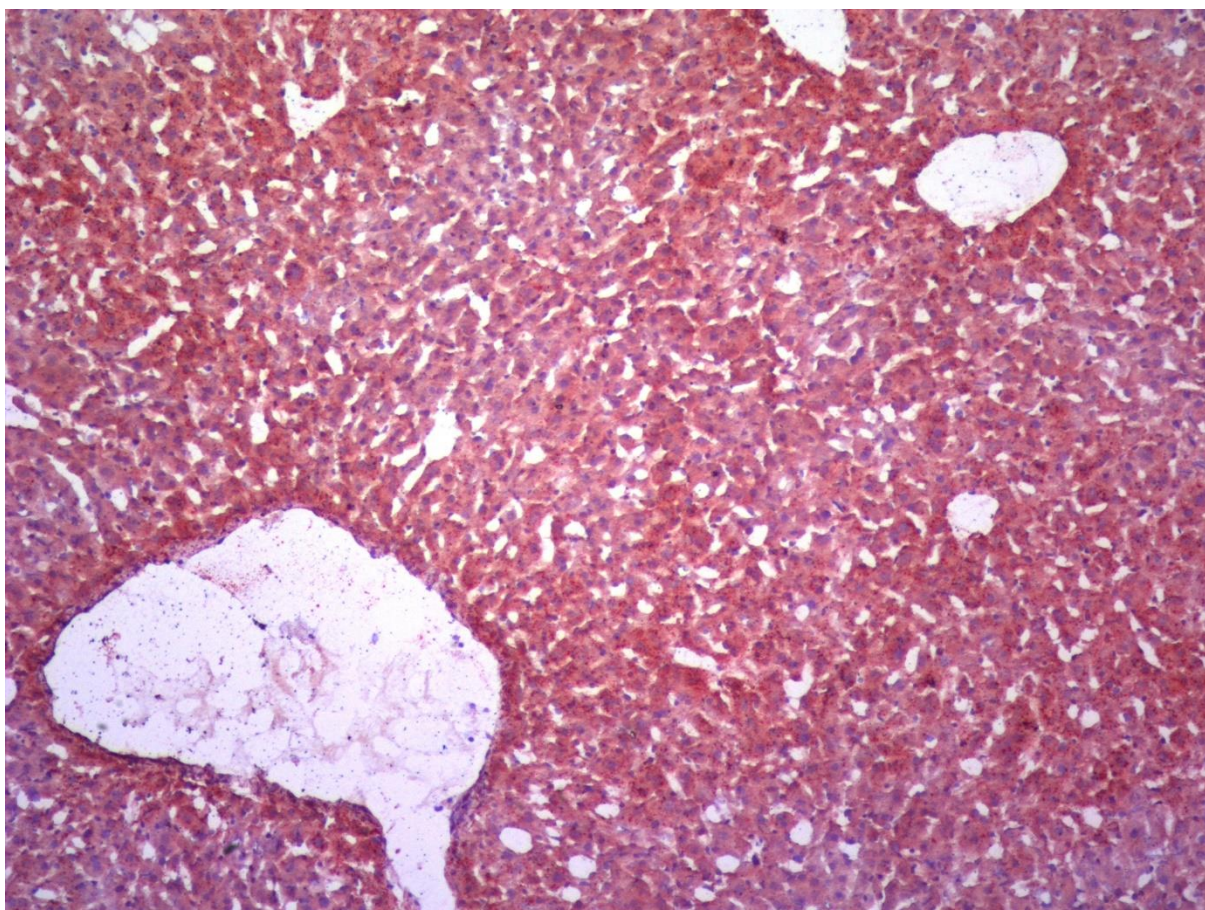
Slika 5. Prerez jetre životinje tretirane valproatom (V). Slika prikazuje nakupine lipida u hepatocitima (mikrovezikularnu steatozu) vizualiziranu Oil Red bojanjem. Lipidi su obojani crveno, a jezgre plavo. Povećanje 100x

Tablica 3. Histogram boja slike 5. izrađen u Fiji Image J programu.

Boja	Medijan	Standardna devijacija
Crveno	146.674	NaN
Zeleno	63.745	60.867
Plavo	126.135	32.93

Na Slici 5. vidljivo je intenzivnije crveno obojenje jetrenog tkiva što pokazuje veću količinu lipidnih kapljica u tkivu jetre što je očekivani učinak tretmana valproatom pokazan drugim istraživanjima. Vidljive su i zasebne jezgre stanica po cijelom preparatu obojane hematoksilinom u ljubičasto što pokazuje kako preparat nije mehanički oštećen.





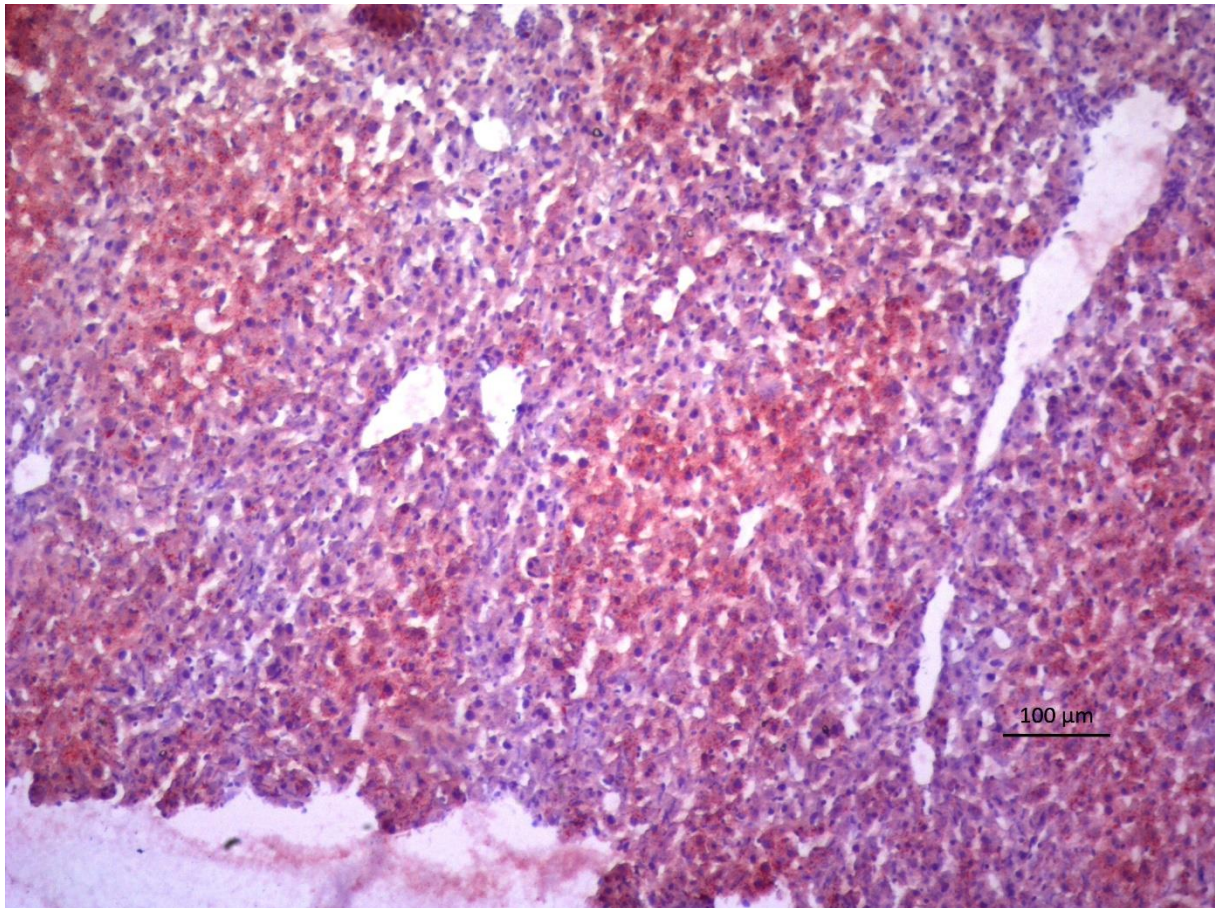
Slika 6. Prevez jetre životinje tretirane naringeninom (N). Slika prikazuje nakupine lipida u hepatocitima (mikrovezikularnu steatozu) vizualiziranu Oil Red bojanjem. Lipidi su obojani crveno, a jezgre plavo. Povećanje 100x

Tablica 4. Histogram boja slike 6. izrađen u Fiji Image J programu.

Boja	Medijan	Standardna devijacija
Crveno	165.938	36.882
Zeleno	75.492	74.59
Plavo	114.883	37.79

Na Slici 6. vidljivo je svjetlocrveno obojenje gotovo cijelog snimljenog područja tkiva i blijedije plavo-ljubičasto obojenje jezgri stanica. Intenzivnije (tamnije) crveno obojenje vidljivo je samo oko područja krvnih žila u prerezu. Crveno obojenje uzorka ukazuje na nakupljanje lipida u jetri veće od onoga u kontrolnoj skupini (K). Histogram boja slike također pokazuje veliku pristunost crvenog obojenja, većeg od onog u prerezu kontrolne skupine (K).





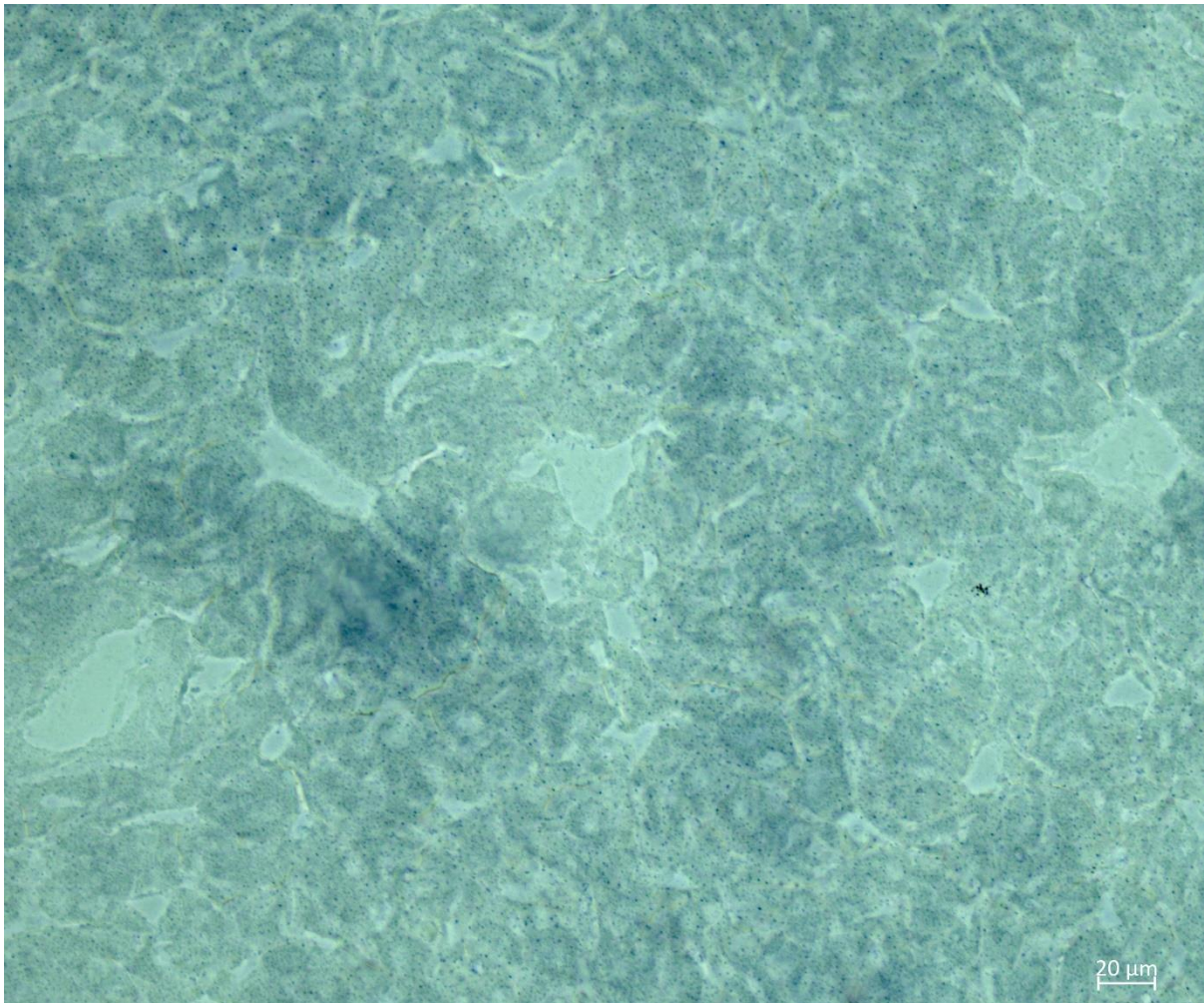
Slika 7. Prerez jetre životinje tretirane valproatom i naringeninom (V+N). Slika prikazuje nakupine lipida u hepatocitima (mikrovezikularnu steatozu) vizualiziranu Oil Red bojanjem. Lipidi su obojani crveno, a jezgre plavo. Povećanje 100x

Tablica 5. Histogram boja slike 7. izrađen u Fiji Image J programu.

Boja	Medijan	Standradna devijacija
Crveno	162.968	41.787
Zeleno	81.331	65.191
Plavo	147.916	42.653

Na Slici 7. vidljivo je na mjestima intenzivnije crveno obojenje i nema nedostatka plavo-ljubičastog obojenja što ukazuje na relativno dobru očuvanost prereza. Intenzivnije crveno obojenje ukazuje na povećano mašćenje jetre. Histološki preparati kombiniranog tretmana valproatom i naringeninom (V+N) nešto su svjetlije crvenog obojenja od onih iz valproatnog tretmana (V), iako im najviše nalikuju. Na temelju histograma boja (Tablica 5.) količina crvene boje vrlo je sličan onome u prerezima naringeninske skupine (N) (Tablica 3.), iako treba uzeti u obzir da pozadinsko osvjetljenje može utjecati na rezultate histograma boja.

#### 4.1.3 Histologija (Metoda steroidnih dehidrogenaza)



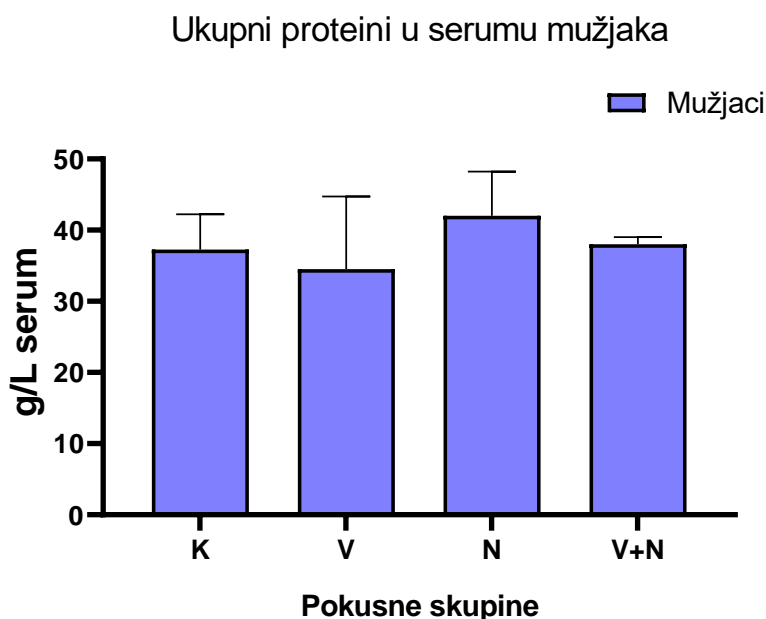
Slika 8. Prerez jetre kontrolne životinje (K) tretiran reakcijskom mješavinom. Plavo obojenje daje netopljivi formazan nastao iz NBT-a.

Iz slike 8. vidljivo je ponegdje intenzivnije točkasto obojenje plavom bojom gdje je više aktivnih steroidnih dehidrogenaza. Zbog tretmana više nije moguće jasno razlučiti pojedine stanice i mnogi dobiveni prerezi tretirani reakcijskom mješavinom jednolike su blijede plavičaste boje vidljive ovdje na slici. Metoda nije producirala vidljive razlike niti među tretmanima primjerice valproatni (V) u odnosu na kontrolni (K) pa su rezultati ove metode u raspravi izostavljeni.



## 4.2 Proteinski metabolizam

### 4.2.1 Ukupni proteini u serumu



Slika 9. Koncentracija ukupnih serumskih proteina (g/L seruma). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina

Tablica 5. Statistička analiza koncentracije ukupnih proteina u serumu (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 9.).

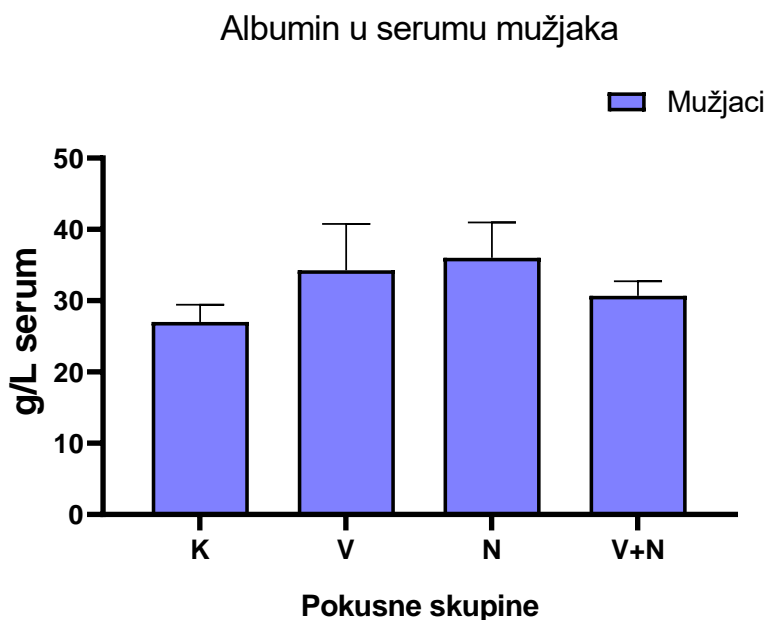
Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike	95,00% CI of diff,	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	2,750	-12,05 to 17,55	Ne	nz	0,9392
K vs. N	-4,750	-20,73 to 11,23	Ne	nz	0,8005
K vs. V+N	-0,7500	-16,73 to 15,23	Ne	nz	0,9989
V vs. N	-7,500	-23,48 to 8,481	Ne	nz	0,5071
V vs. V+N	-3,500	-19,48 to 12,48	Ne	nz	0,9060
N vs. V+N	4,000	-13,08 to 21,08	Ne	nz	0,8884

Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina, ns-nije statistički signifikantno (značajno)

Iz podataka o koncentraciji ukupnih serumskih proteina (Slika 9.) i njihove statističke analize (Tablica 5.) vidljivo je kako niti jedan od tretmana nije statistički značajno promijenio koncentracije serumskih proteina u odnosu na druge skupine. Tretman naringeninom jedini je producirao koncentracije veće od 40g/L, dok je tretman valproatom najviše smanjio koncentracije ukupnih proteina. Kombinirani tretman valproatom i naringeninom pokazuje

razine ukupnih serumskih proteina slične onima kontrole, ali s manjom standardnom devijacijom.

#### 4.2.2 Albumin u serumu



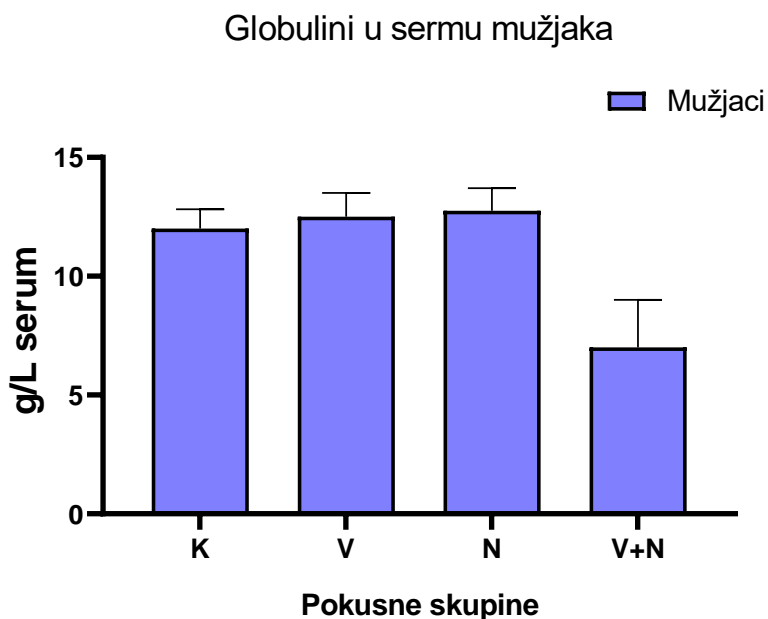
Slika 10. Koncentracije serumskog albumina (g/L seruma). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina

Tablica 6. Statistička analiza koncentracije serumskog albumina (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 10.).

Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike	95,00% CI of diff,	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	-7,250	-16,93 to 2,426	Ne	nz	0,1684
K vs. N	-9,000	-18,68 to 0,6761	Ne	nz	0,0708
K vs. V+N	-3,667	-14,12 to 6,785	Ne	nz	0,7218
V vs. N	-1,750	-11,43 to 7,926	Ne	nz	0,9462
V vs. V+N	3,583	-6,868 to 14,03	Ne	nz	0,7351
N vs. V+N	5,333	-5,118 to 15,78	Ne	nz	0,4506

Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina, ns-nije statistički signifikantno (značajno)

#### 4.2.3 Globulini u serumu



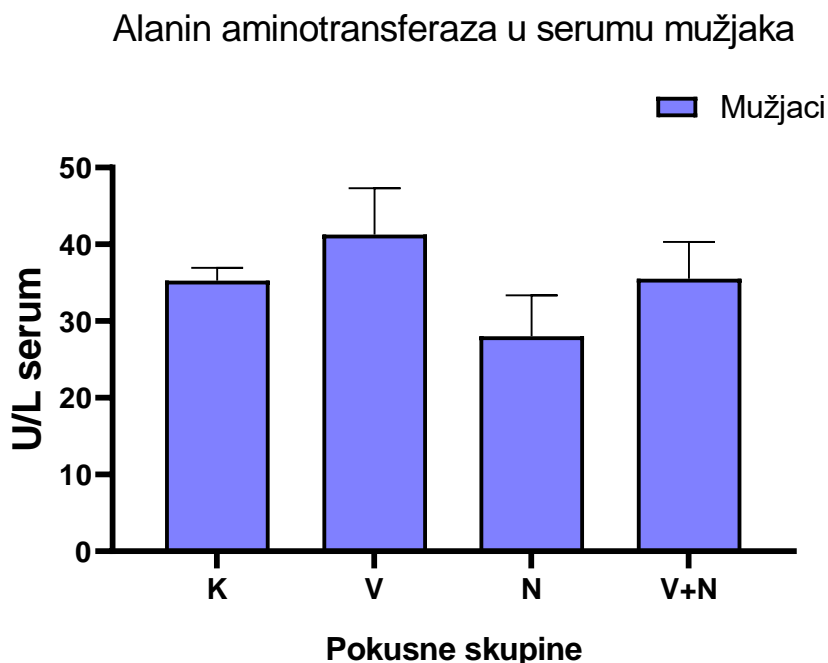
Slika 11. Koncentracije serumskog globulina (g/L seruma). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina

Tablica 7. Statistička analiza koncentracije serumskog globulina (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 11.).

Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike	95,00% CI of diff,	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	-0,5000	-3,046 to 2,046	Ne	nz	0,9327
K vs. N	-0,7500	-3,296 to 1,796	Ne	nz	0,8120
K vs. V+N	5,000	2,250 to 7,750	Da	***	0,0009
V vs. N	-0,2500	-2,796 to 2,296	Ne	nz	0,9905
V vs. V+N	5,500	2,750 to 8,250	Da	***	0,0004
N vs. V+N	5,750	3,000 to 8,500	Da	***	0,0003

Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina, ns-nije statistički značajno.

#### 4.2.4 Aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) u serumu



Slika 12. Aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) u serumu (U/L seruma). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina.

Tablica 8. Statistička analiza aktivnosti alanin aminotransferaze u serumu. (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 12.).

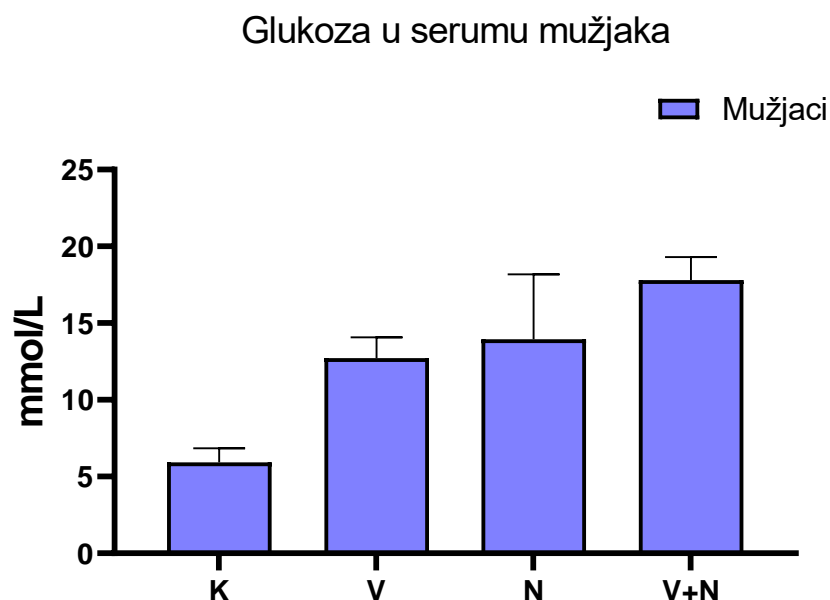
Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike	95,00% CI of diff.	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	-6,000	-16,04 to 4,041	Ne	nz	0,3312
K vs. N	7,250	-2,791 to 17,29	Ne	nz	0,1945
K vs. V+N	-0,2500	-10,29 to 9,791	Ne	nz	0,9998
V vs. N	13,25	3,209 to 23,29	Da	**	0,0095
V vs. V+N	5,750	-4,291 to 15,79	Ne	nz	0,3652
N vs. V+N	-7,500	-17,54 to 2,541	Ne	nz	0,1736

Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina, ns-nije statistički značajno.

Aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) u serumu (Slika 11.) i njihova statistička obrada (Tablica 8.) pokazuju statistički neznačajno povećanu aktivnost u valproatom tretirane skupine u odnosu na kontrolu i statistički neznačajno manju aktivnost u skupini tretiranoj samo naringeninom u odnosu na kontrolu. Aktivnost ALT u serumu prilikom kombiniranog tretmana valproatom i naringeninom (N+V) pokazuje vrlo slične rezultate kao i u kontrolnoj grupi. Statistički se značajno razlikuju aktivnosti ALT u serumu samo između samostalnog tretmana

naringeninom (N) i valproatom (V). Valproatom tretirana skupina (V) pokazuje povišenu aktivnost ALT-a u serumu.

#### 4.3 Glukoza u serumu



Slika 13. Glukoza u serumu (mmol/L). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina.

Tablica 9. Statistička analiza koncentracija glukoze u serumu. (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 13.).

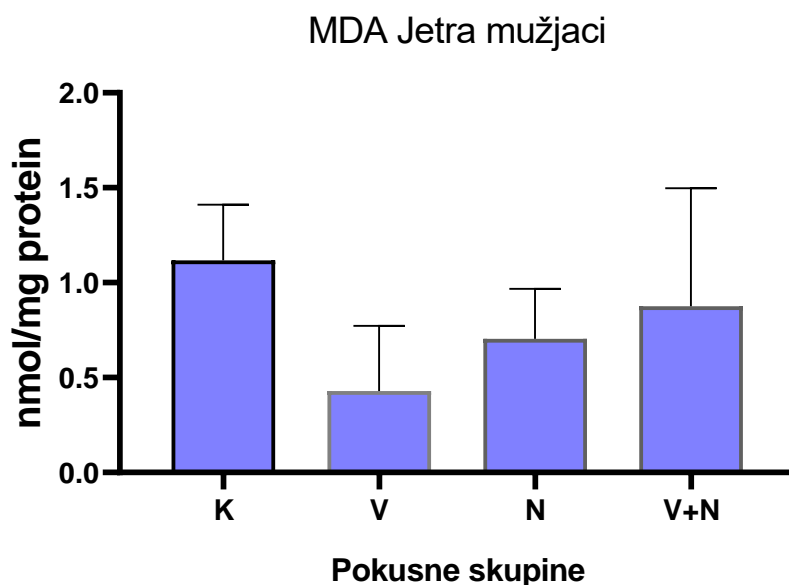
Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike	95,00% CI of diff,	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	-6,800	-11,81 to -1,790	Da	**	0,0078
K vs. N	-8,025	-13,04 to -3,015	Da	**	0,0023
K vs. V+N	-11,88	-16,89 to -6,865	Da	****	<0,0001
V vs. N	-1,225	-6,235 to 3,785	Ne	nz	0,8849
V vs. V+N	-5,075	-10,09 to -,06493	Da	*	0,0468
N vs. V+N	-3,850	-8,860 to 1,160	Ne	nz	0,1571

Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina, ns-nije statistički značajno.

Podatci o koncentraciji glukoze u serumu (Slika 13.) i njihova statistička obrada (Tablica 9.) pokazuju statistički značajno povećane količine glukoze u tretmanima valproatom (V), naringeninom (N) i naringeninom i valproatom (N+V) u odnosu na kontrolu. Tretman

valproatom uzrokovao je najmanji porast koncentracije glukoze u odnosu na kontrolu, a zatim slijede tretman naringeninom i kombinirani tretman naringeninom i valproatom (N+V) koji je uzrokovao najveći porast. Kombinirani tretman (N+V) statistički je značajno povećao koncentraciju glukoze u serumu čak i u usporedbi sa tretmanom valproatom (V).

#### 4.4 Antioksidativni pokazatelji u tkivu jetre



Slika 14. Malondialdehid (MDA) u tkivu jetre (nmol/mg proteina). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina.

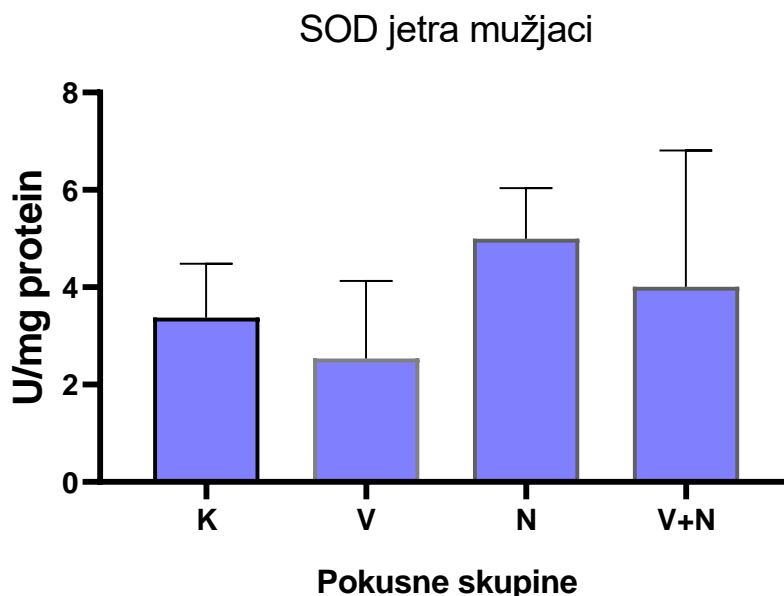
Tablica 10. Statistička analiza koncentracija MDA u tkivu jetre. (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 14.).

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank razlika	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	16,13	Da	**	,004
K vs. N	9,000	Ne	nz	,330
K vs. V+N	7,875	Ne	nz	,559
V vs. N	-7,125	Ne	nz	,772
V vs. V+N	-8,250	Ne	nz	,472
N vs. V+N	-1,125	Ne	nz	>,999

Iz podataka o koncentracijama malondialdehida (MDA) u tkivu jetre (Slika 14.) i njihove statističke obrade (Tablica 10.) vidljiva je statistički značajno smanjena koncentracija MDA u tretmanu valproatom (V) u odnosu na kontrolnu skupinu (K). U odnosu na tretman valproatom, tretman naringeninom (N) producirao je veće koncentracije MDA. Kombinirani tretman



valproatom i naringeninom (V+N) pokazao koncentracije MDA najbliže kontrolnom tretmanu (K), ali sa vrlo velikom standardnom devijacijom. Rezultati upućuju na povećane razine lipidne peroksidacije u jetri prilikom administracije naringenina što je vidljivo iz usporedbe tretmana naringeninom (N) i kombiniranog tretmana (V+N) u usporedbi sa tretmanom samo valproatom (V).



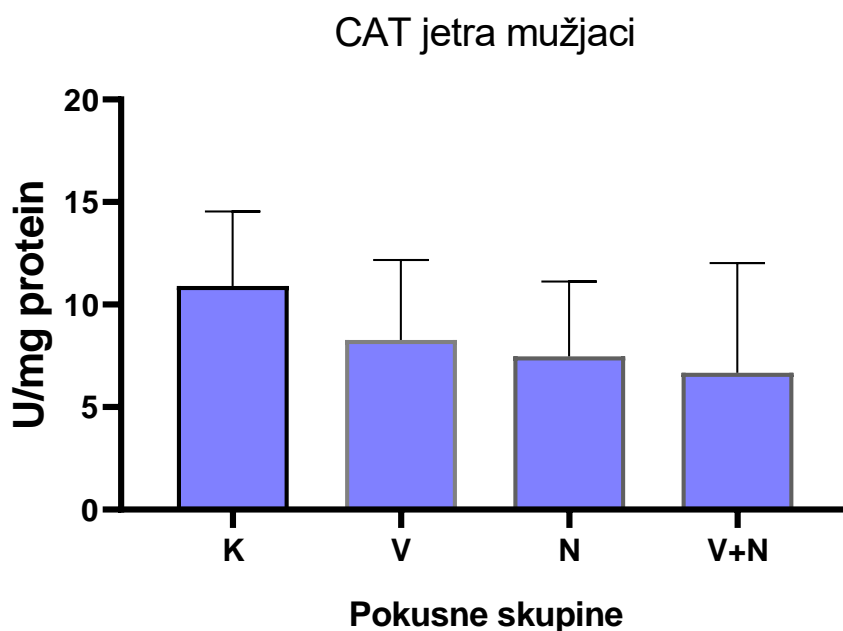
Slika 15. Aktivnost superoksid dismutaze u tkivu jetre (U/mg proteina). Pokusne skupine: K- kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina.

Tablica 11. Statistička analiza aktivnosti SOD u tkivu jetre. (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 15.).

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank razlika	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	3,518	Ne	nz	>,999
K vs. N	-9,232	Ne	nz	,299
K vs. V+N	-1,482	Ne	nz	>,999
V vs. N	-12,75	Da	*	,030
V vs. V+N	-5,000	Ne	nz	>,999
N vs. V+N	7,750	Ne	nz	,529

Iz podataka o aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u tkivu jetre (Slika 15.) i njihove statističke obrade (Tablica 11.) vidljiva je povećana aktivnost SOD u tretmanima naringeninom (N) i kombiniranom tretmanu naringeninom i valproatom (V+N) u odnosu na kontrolu (K) i tretman valproatom (V). Tretman valproatom (V) producirao je statistički neznačajno snižene aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu (K). Statistički značajno odstupaju jedino tretman valproatom (V) u odnosu na tretman naringeninom (N) koji je producirao značajno veću aktivnost SOD tkivu jetre životinja. Veća aktivnost SOD u tretmanu naringeninom (N) i

kombiniranom tretmanu (V+N) u odnosu na kontrolu (K), a osobito u odnosu na valproatni tretman (V), ukazuje na povećano stvaranje superoksidnog radikala ( $O_2^{\cdot}$ ) u tkivu jetre kao rezultat administracije naringenina.



Slika 16. Aktivnost katalaze (CAT) u tkivu jetre (U/mg proteina). Pokusne skupine: K- kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina.

Tablica 12. Statistička analiza aktivnosti CAT u tkivu jetre. (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 16.).

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank razlika	Značajnost?	Sažetak	Prilagođena P vrijednost
K vs. V	4,750	Ne	nz	>,999
K vs. N	6,411	Ne	nz	>,999
K vs. V+N	9,500	Ne	nz	,219
V vs. N	1,661	Ne	nz	>,999
V vs. V+N	4,750	Ne	nz	>,999
N vs. V+N	3,089	Ne	nz	>,999

Iz podataka o aktivnosti katalaze (CAT) u tkivu jetre (Slika 14.) i njihove statističke obrade (Tablica 12.) vidljiva je snižena aktivnost CAT u tretmanima valproatom (V), naringeninom (N), i valproatom i naringeninom (V+N) u odnosu na kontrolnu skupinu (K). Takav ishod ukazuje da nije došlo do većeg nakupljanja vodikovog peroksida u hepatocitima, odnosno unutarstanični mehanizmi antioksidativne obrane poput glutaciona (GSH) i glutation reduktaze (GR) još uvijek funkcioniraju. Kombinirani tretman valproatom i naringeninom (V+N) pokazuje najniže srednje vrijednosti aktivnosti katalaze, ali sa vrlo velikom standardnom devijacijom. Tretman valproatom (V) u odnosu na ostale tretmane izuzev kontrolnog, pokazuje najveću aktivnost CAT.

## 5 Rasprava

Jetra je centralni organ u tijelu zadužen za metabolizam lipida, proteina i ugljikohidrata (glukoze). Mjerenja serumskih parametara pokušat ćemo razmotriti kroz promjene u homeostazi ovih glavnih metaboličkih skupina.

U ovom radu zabilježeno je da je tretman valproatom tijekom 15 dana uzrokovao promjene u prometu lipida. Rezultati ukazuju da je u miševa izloženih valproatu, serum obilovao lipidima u odnosu na kontrolu. Histološka analiza nagomilanih lipida u jetri, detektirana metodom Oil red otkriva povećanu mikrovezikularnu steatozu (nagomilavanje lipida u hepatocitima). Iz literaturnih izvora, poznato je da dugotrajna terapija valproatom u ljudi uzrokuje taloženje lipida u jetri i oštećenja jetre vidljiva iz povećanja serumskih aktivnosti enzima alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) čije aktivnosti koreliraju sa promjenama serumskog lipidoma (Xu i sur. 2019). Također, rezultati ovog rada pokazali su očekivane rezultate povišenog lipidnog indeksa i aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) u serumu miševa tretiranih valproatom (V) u odnosu na kontrolnu skupinu (K). Normalna funkcija ALT-a je u glukoza-alaninskom ciklusu, odnosno u prometu glukoze-piruvata i aminokiselina alanina i aspartata (metabolički putevi proteina). Uloga ALT-a je reverzibilna transaminacija amino skupine L-alanina na  $\alpha$ -ketoglutarat što producira L-glutamat u jetri, dok se u mišićima prilikom mišićnog rada odvija obratna reakcija i nastali L-alanin prenesen krvlju do jetre postaje gradivna čestica za piruvat i proces glukoneogeneze u jetri. Koncentracije ALT-a najveće su u citoplazmi jetre zbog čega je serumska aktivnost ALT-a dobar i standardni indikator oštećenja hepatocita jer uslijed oštećenja dolazi do otpuštanja ALT-a iz hepatocita u krv (Ahmed i sur. 2018; Senior 2012). Povišena aktivnost ALT-a u serumu skupine tretirane valproatom (V) ukazuje na oštećenje hepatocita i mašćenje jetre tj. mikrovezikularnu steatozu potvrđenu histološkim preparatima jetre bojanima Oil Red O bojom i hematoksilinom.

Budući da povećanje ALT-a u serumu ukazuje i na povećanu glukoneogenezu u jetri važno je ustanoviti i razine glukoze u serumu koje smo također mjerili u ovom radu. Tretman valproatom (V) rezultirao je statistički značajno povišenim serumskim koncentracijama glukoze u odnosu na životinje kontrolne skupine (K). Takav rezultat je očekivan obzirom na povećane koncentracije lipida u serumu i jetri, te narušenom mehanizmu  $\beta$ -oksidacije što može dovesti do pojave inzulinske rezistencije jetre. Slučajevi hiperglikemije i debljanja kao posljedica tretmana valproatom zabilježeni su u kliničkoj praksi kod ljudi (Diederich i sur. 2010; Fathallah i sur. 2015).

Razina proteina u serumu nije bila poremećena niti u jednoj skupini ali podaci za albumine i globuline odskaču za 20+% u rezultatima kod svih naših skupina miševa od razina albumina i globulina koje je za C57Bl6 miševe u odnosu na literaturni izvor (Zaias i sur. 2009). Pretpostavljamo da je do ovakvog odstupanja u odnosu na literaturu došlo uslijed predugog pohranjivanja uzoraka u hladnjaku nakon prikupljanja i obrade krvi, što je dovelo do raspada proteina u serumskim uzorcima. Zbog toga što među rezultatima ukupnih serumskih proteina

nema značajnih razlika među skupinama i zbog toga što pretpostavljamo da podatci o koncentracijama albumina i globulina možda nisu vjerodostojni u odnosu na literaturu stoga iz njih nisu izvedivi zaključci i u ostatku diskusije ih nećemo komentirati.

Jedna od radnih hipoteza ovog rada bila je da naringenin je zbog svojih protuupalnih svojstava i dokazanih učinaka smanjenja nagomilavanja lipida u hepatocitima jetre te antioksidativnih svojstava interesantan kandidat za koterapiju sa valproatom kako bi se potencijalno umanjila mogućnost oštećenja i nagomilavanja lipida u hepatocitima jetre.

Skupina tretirana naringeninom (N) pokazuje niže serumske aktivnosti ALT-a i lipidni indeks u odnosu na kontrolnu (K) i sve ostale skupine životinja što ukazuje na izostanak oštećenja tkiva jetre. Rezultati lipidnog indeksa slažu se sa sličnim istraživanjem prema (Zhao i sur. 2018) i drugim prethodnim radovima (Mulvihill i sur. 2016). Studija prema (Zhao i sur. 2018) pokazuje povećane serumske aktivnosti ALT-a u odnosu na kontrolnu skupinu što nije u skladu s našim pronalascima. Do razlike je vjerojatno došlo zbog različitog koncepta istraživanja (pokusnog protokola), gdje je njihova kontrolna skupina tretirana otopinom Natrij-karboksimetilceluloze, dok je ispitna skupina tretirana samo naringeninom. Naši rezultati smanjene serumske aktivnosti ALT-a za skupinu tretiranu naringeninom (N) slažu se sa istraživanjem (Chen i sur. 2017) u kojoj su autori pokazali sniženje serumske ALT aktivnosti u ovisnosti o dozi naringenina. (Wang i sur. 2020) pokazali su slične rezultate u svom istraživanju. Oil Red O i hematoksilinskim bojanjem prereza jetre naringeninske skupine (N) utvrdili smo povećano nakupljanje lipida u jetri što se ne slaže sa sličnim istraživanjima (Chen i sur. 2017; Zhao i sur. 2018) koja pokazuju smanjeno nakupljanje lipida u jetri nakon tretmana naringeninom.

Tretman naringeninom dovodi do indirektno indukcije  $\beta$ -oksidacije i glikolize, odnosno većeg općeg utroška energije, te smanjenja lučenja inzulina putem adenozin monofosfat kinaze (AMPK) aktivacije (Long i sur. 2006; Mulvihill i sur. 2016; Zhao i sur. 2018). Naringenin također dovodi i do povećanja osjetljivosti na inzulin putem neovisnim o inzulinskom receptoru aktivacijom fosfatidil-inozitol 3 kinaze (PI3K) i MAPK/ERK signalnog puta. (Assini i sur. 2015; Mulvihill i sur. 2016). Slične nalaze navode i (Kannappan i Anuradha 2010). U našem istraživanju tretman naringeninom (N) producirao je statistički značajno veće serumske koncentracije glukoze u odnosu na kontrolni tretman (K) te veće koncentracije glukoze od onih u valproatnog tretmana (V) čiji su rezultati također statistički značajno veći od rezultata kontrolnog tretmana (K). Podatci iz literature ukazuju na antihiperglikemijska svojstva u različitim modelima bolesti poput dijabetesa tipa 1 i 2 i alkoholom ne induciranog nagomilavanja lipida u hepatocitima jetre u miševa i štakora, ali studije ne uspoređuju utjecaj isključivo naringenina na serumske koncentracije glukoze u odnosu na netretiranu kontrolnu skupinu (Assini i sur. 2015; Hartogh i Tsiani 2019; Yoshida i sur. 2014). Istraživanje na štakorima (Alam i sur. 2013) posjeduje kontrolni tretman naringeninom u hrani čiji je probavni metabolit naringenin i netretiranu kontrolu na normalnoj prehrani. Njihovo istraživanje pokazalo je blago povećanje lučenja inzulina u naringenskoj grupi, doze od 100 mg/kg, u

odnosu na kontrolnu grupu, zajedno sa značajno povišenim serumskim trigliceridima u naringinskoj skupini. Povećana serumska koncentracija inzulina mogla bi ukazivati na povećane serumske koncentracije glukoze iako ih autori ne navode i ne komentiraju ovdje navedene promjene. Istraživanje (Kannappan i Anuradha 2010) kao rezultate nema značajne razlike u serumskim koncentracijama glukoze i inzulina između netretirane kontrolne skupine i naringeninske kontrolne skupine u štakora pri dozama naringenina od 50 mg/kg mase životinje administriranih gastričkom kanilom.

Kombinirani tretman valproatom i naringeninom (V+N) rezultirao je serumskim aktivnostima ALT-a najslabijima onima kontrolnog tretmana uz najviši lipidni indeks od svih tretmana. Histološki preparati tretmana (V+N) najslabiji su onima tretmana valproatom (V) i naringeninom (N). Ovi rezultati ukazuju na ubrzano mašćenje jetre iako temeljem serumskih aktivnosti ALT-a nema naznaka oštećenja hepatocita. Kombinirani tretman valproatom i naringeninom (V+N) rezultirao je najvišim serumskim koncentracijama glukoze u usporedbi sa ostalim skupinama koje su statistički značajno veće i od onih produciranih valproatnim tretmanom (V). Rezultati ukazuju kako naringenin iako inducira  $\beta$ -oksidaciju u jetri za razliku od valproata nije uspio pomaknuti metaboličku ravnotežu u smjeru oksidacije masti. Usljed tretmana valproatom može doći do pojave inzulinske rezistencije hepatocita zbog dugoročno mnogo nakupljenih lipida unutar hepatocita i u cirkulaciji (Samuel i sur. 2010; Verrotti i sur. 2009). Zbog hepatotoksičnih učinaka valproata na hepatocite koji za rezultat imaju *de novo* lipogenezu i akumulaciju masti u jetri te proces glukoneogeneze, ne dolazi do smanjenja serumskih koncentracija glukoze. Moguće je kako naringenin u kotretmanu sa valproatom nije mogao ostvariti zaštitne učinke na jetru i glikemijski indeks zbog relativno male doze (25mg/kg). Valproatni tretman (V) jedini je uzrokovao veću aktivnost katalaze (CAT) u odnosu na druge tretmane izuzev kontrolne skupine (K) što ukazuje na veće nakupljanje vodikova peroksida u tkivima, odnosno oksidativni stres. Niže razine MDA, koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije, u valproatnog tretmana (V) u odnosu na kontrolu (K) u našem eksperimentu vjerojatno su rezultat povećane aktivnosti CAT koja je uspješno uklonila vodikov peroksid nakupljen u stanici i onemogućila daljnju lipidnu peroksidaciju. Slična studija bila je drugačijeg ishoda na rezultate koncentracije MDA pri tretmanu valproatom i producirala je povišene vrijednosti MDA vjerojatno zbog dvostruko viših dnevnih doza valproata i unosa intraperitonealnim putem (Ahmed i sur. 2018).

U tretmanu naringeninom (N) koncentracije MDA, iznenađujuće su povišeni u jetri u odnosu na tretman valproatom (V). Slična studija U naringeninskom tretmanu (N) statistički je značajno povećana aktivnost SOD-a u jetrenom tkivu u odnosu na tretman valproatom (V). Taj rezultat ukazuje na indukciju antioksidacijskih enzima od strane naringenina više puta spominjanu u literaturi (Rashmi i sur. 2017; Renugadevi i Prabu 2010; Zhao i sur. 2018). Aktivnost CAT u jetrenom tkivu naringeninskog tretmana (N) očekivano je niža od onih u valproatnom (V) tretmanu, ali tretmani se ne razlikuju statistički značajno. Rezultati koncentracije MDA naringeninske skupine (N) i aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD,

CAT) u jetrenom tkivu pokazuju kako nema značajno veće produkcije reaktivnih kisikovih radikala (ROS) u jetri i rezultati su vrlo slični onima kontrolne skupine (K). Ovakvi nalazi slažu se drugim sličnim radovima (Rashmi i sur. 2017; Renugadevi i Prabu 2010; Zhao i sur. 2018).

Kotretman valproatom i naringeninom (V+N) producirao je neznatno veće koncentracije MDA u tkivu jetre u odnosu na valproatni (V) i naringeninski tretman (N), ali sa vrlo velikom standardnom devijacijom gdje su neke životinje pokazale vrlo visoke koncentracije MDA u jetri, veće od najviših mjerenih koncentracija MDA iz kontrolnog (K) tretmana. Velika standardna devijacija pokazuje da je kotretman (V+N) nejednoliko djelovao na miševe ove skupine. Aktivnosti CAT statistički se ne razlikuju od ostalih skupina i u prosjeku su malo niže od rezultata drugih skupina, ali sa velikom standardnom devijacijom. Očekivano je povećanje aktivnosti CAT zbog valproata kao izvora reaktivnih kisikovih radikala i upalnih procesa. Slično opažanje tiče se i aktivnosti SOD u jetri kotretirane (V+N) skupine gdje su one neznatno niže od onih u naringeninskoj skupini (N), ali sa velikom standardnom devijacijom. Očekivana je indukcija SOD od strane naringenina slična onoj vidljivoj u tretmanu naringeninom (N).

## 6 Zaključak:

Zaštitni učinak naringenina pri našim ispitnim dozama tiče se manjim dijelom antioksidacijske obrane u pojedinim životinjama i smanjenog oštećenja hepatocita što je vidljivo iz rezultata o aktivnosti ALT-a. Povećane serumske koncentracije glukoze producirane koadministracijom naringenina sa valproatom mogle bi dovesti do povećanog crpljenja citoplazmatskih zaliha reduciranog nikotinamid dinukleotida (NADPH) u svrhu uklanjanja povišenih staničnih razina glukoze putem aldoza reduktaze. Pritom je važno naglasiti kako upravo glutacion reduktaza (GR) također koristi citoplazmatske zalihe NADPH, odnosno može doći do pojave glukozne toksičnosti i oksidacijskih oštećenja u mnogim stanicama i tkivima organizma osim same jetre. Ponavljanje istraživanja sa drugačijim načinom administracije naringenina ili povećanjem doze uz dodatak mjerenja serumskih koncentracija inzulina uz dnevna mjerenja serumske glukoze, mjerenja jetrenih staničnih koncentracija glutaciona (GSH) i aktivnosti glutacion reduktaze (GR) te primjene "Periodic Acid Schiff" histološke metode kao u (Kannappan i Anuradha 2010) kako bi se predočile zalihe glikogena na prerezima jetre. Takve postavke istraživanja jasnije bi pridonijela hipotezi o potencijalnom zaštitnom djelovanju naringenina na hepatocite i njegovom mehanizmu.

## 7 Popis literature

- Ahmed N., Aljuhani N., Al-Hujaili H.S., Al-Hujaili M.A., Elkablawy M.A., Noah M.M., Abo-Haded H., El-Agamy D.S. (2018): Agmatine protects against sodium valproate-induced hepatic injury in mice via modulation of nuclear factor- $\kappa$ B/inducible nitric oxide synthetase pathway. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **32**: 1–6.
- Alam M.A., Kauter K., Brown L. (2013): Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats. *Nutrients* **5**: 637–650.
- Assini J.M., Mulvihill E.E., Burke A.C., Sutherland B.G., Telford D.E., Chhoker S.S., Sawyez C.G., Drangova M., Adams A.C., Kharitonov A., Pin C.L., Huff M.W. (2015): Naringenin prevents obesity, hepatic steatosis, and glucose intolerance in male mice independent of fibroblast growth factor 21. *Endocrinology* **156**: 2087–2102.
- Brukner A.M., Ben-Hur T., Honig A., Ekstein D., Eyal S. (2018): Effects of valproic acid on cerebral nutrient carriers' expression in the rat. *Front. Pharmacol.* **9**: 1–7.
- Chang T.K.H., Abbott F.S. (2006): Oxidative stress as a mechanism of valproic acid-associated hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* **38**: 627–639.
- Chaudhary S., Parvez S. (2018): Valproic Acid Induced Neurotoxicological Manifestations and its Mitigation by Melatonin in Rat Brain Synaptosomes. *Arch. Med. Res.* **49**: 441–450.
- Chen C., Jie X., Ou Y., Cao Y., Xu L., Wang Y., Qi R. (2017): Nanoliposome improves inhibitory effects of naringenin on nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Nanomedicine* **12**: 1791–1800.
- Cleary M. (2019): Obeticholic acid ameliorates Valproic acid-induced Hepatic Steatosis and Oxidative Stress. *J. Chem. Inf. Model.* **53**: 1689–1699.
- Diederich M., Chateauvieux S., Morceau F., Dicato M. (2010): Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**: .
- Fathallah N., Slim R., Larif S., Hmouda H., Salem C. Ben (2015): Drug-Induced Hyperglycaemia and Diabetes. *Drug Saf.* **38**: 1153–1168.
- Ghodke-Puranik Y., Thorn C.F., Lamba J.K., Leeder J.S., Song W., Birnbaum A.K., Altman R.B., Klein T.E. (2013): Valproic acid pathway. *Pharmacogenet. Genomics* **23**: 236–241.
- Hartogh D.J.D., Tsiani E. (2019): Antidiabetic properties of naringenin: A citrus fruit Polyphenol. *Biomolecules* **9**: 4–9.
- Hussein R.R.S., Soliman R.H., Abdelhaleem Ali A.M., Tawfeik M.H., Abdelrahim M.E.A. (2013): Effect of antiepileptic drugs on liver enzymes. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2**: 14–19.
- Kannappan S., Anuradha C.V. (2010): Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. *Eur. J. Nutr.* **49**: 101–109.
- Long Y.C., Zierath J.R., Long Y.C., Zierath J.R. (2006): AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation Find the latest version : Review series AMP-activated



- protein kinase signaling in metabolic regulation. **116**: 1776–1783.
- Michele G. De, Sorrentino P., Nesti C., Rubegni A., Ruggiero L., Peluso S., Antenora A., Quarantelli M., Filla A., Michele G. De, Santorelli F.M. (2018): Reversible valproate-induced subacute encephalopathy associated with a MT-ATP8 variant in the mitochondrial genome. *Front. Neurol.* **9**: 1–5.
- Monostory K., Nagy A., Tóth K., Búdi T., Kiss Á., Déri M., Csukly G. (2018): Relevance of CYP2C9 Function in Valproate Therapy. *Curr. Neuropharmacol.* **17**: 99–106.
- Mulvihill E.E., Burke A.C., Huff M.W. (2016): Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.* **36**: 275–299.
- Najafi N., Heidari R., Jamshidzadeh A., Fallahzadeh H., Omid M., Abdoli N., Najibi A., Azarpira N., Niknahad H. (2017): Valproic Acid-Induced Hepatotoxicity and the Protective Role of Thiol Reductants. *Trends Pharm. Sci.* **2017**: 63–70.
- Rashmi R., Magesh S.B., Ramkumar K.M., Suryanarayanan S., SubbaRao M.V. (2017): Antioxidant potential of naringenin helps to protect liver tissue from streptozotocin-induced damage. *Reports Biochem. Mol. Biol.* **7**: 76–84.
- Renugadevi J., Prabu S.M. (2010): Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Exp. Toxicol. Pathol.* **62**: 171–181.
- Salehi B., Fokou P.V.T., Sharifi-Rad M., Zucca P., Pezzani R., Martins N., Sharifi-Rad J. (2019): The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. *Pharmaceuticals* **12**: 1–18.
- Samuel V.T., Petersen K.F., Shulman G.I. (2010): Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* **375**: 2267–2277.
- Senior J.R. (2012): Alanine aminotransferase: A clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clin. Pharmacol. Ther.* **92**: 332–339.
- Verrotti A., Torre R. La, Trotta D., Mohn A., Chiarelli F. (2009): Valproate-induced insulin resistance and obesity in children. *Horm. Res.* **71**: 125–131.
- Wang Q., Ou Y., Hu G., Wen C., Yue S., Chen C., Xu L., Xie J., Dai H., Xiao H., Zhang Y., Qi R. (2020): Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF- $\kappa$ B pathway in mice. *Br. J. Pharmacol.* **177**: 1806–1821.
- Win-Shwe T.T., Nway N.C., Imai M., Lwin T.T., Mar O., Watanabe H. (2018): Social behavior, neuroimmune markers and glutamic acid decarboxylase levels in a rat model of valproic acid-induced autism. *J. Toxicol. Sci.* **43**: 631–643.
- Xu S., 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. *Front. Pharmacol.* **10**: 1–18.
- Yoshida H., Watanabe H., Ishida A., Watanabe W., Narumi K., Atsumi T., Sugita C., Kurokawa M. (2014): Naringenin suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in an early phase of high-fat diet-induced obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**: 95–101.
- Zaias J., Mineau M., Cray C., Yoon D., Altman N.H. (2009): Reference Values for Serum Proteins of Common Laboratory Rodent Strains. .

- Zhang L.F., Liu L.S., Chu X.M., Xie H., Cao L.J., Guo C., A J.Y., Cao B., Li M.J., Wang G.J., Hao H.P. (2014): Combined effects of a high-fat diet and chronic valproic acid treatment on hepatic steatosis and hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**: 363–372.
- Zhao L., Zhang N., Yang D., Yang M., Guo X., He J., Wu W., Ji B., Cheng Q., Zhou F. (2018): Protective effects of five structurally diverse flavonoid subgroups against chronic alcohol-induced hepatic damage in a mouse model. *Nutrients* **10**: .

## **Životopis:**

Rođen sam u Zagrebu, 10.03.1996. godine. Pohađao osnovnu školu Vjenceslava Novaka i 3. gimnaziju Zagreb. Maturirao sam 2014. godine i upisao PMF u Zagrebu, preddiplomski studij molekularne biologije. 2016. godine stekao sam zvanje voditelja ronjenja po organizaciji PADI odnosno ronilačku kategoriju EN 14153-3: Dive Leader, te sam 2. lipnja 2016. u Splitu osposobljen za voditelja ronjenja u turističko-rekreativnom ronjenju. 2017. godine na Pagu stekao sam zvanje instruktora ronjenja po ronilačkoj organizaciji NAUI pod brojem #59272 i ponovno se kvalificirao 2018., te 2019. godine kao aktivni instruktor. Postao sam prvostupnik molekularne biologije na PMF-u u Zagrebu 30.5.2018. na temi "Fiziologija ljudskog ronjenja". Iste godine upisao sam diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija. Tijekom diplomskog studija osposobljen sam za rukovanje laboratorijskim životinjama te upisan u elektroničku bazu Uprave veterinarstva pod brojem HR 191/02/P. Od 2017. godine sudjelovao sam i u radu Udruge studenata biologije (BIUS) kao član i kasnije voditelj sekcije za biologiju mora.