

# Učinak antiepileptika valproata na antioksidacijski sustav u neciljnim stanicama i tkivima

---

Marić, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:988982>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Elena Marić

**Učinak antiepileptika valproata na antioksidacijski sustav u  
neciljnim stanicama i tkivima**

Diplomski rad

Zagreb, 2018

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Elena Marić

**Učinak antiepileptika valproata na antioksidacijski sustav u  
neciljnim stanicama i tkivima**

Diplomski rad

Zagreb, 2018

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Domagoja Đikić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem prije svega mentoru dr.sc. Domagoju Đikiću na pruženoj prilici, uloženom vremenu i trudu, ukazanom povjerenju, udijeljenim savjetima prilikom izvođenja eksperimenata i prenesenom znanju, te vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem djelatnicima iz Zavoda za animalnu fiziologiju na savjetima, podršci i bezuvjetnoj pomoći, posebno tehničarki Mariji Potočić koja mi je svojim profesionalnim i prijateljskim pristupom olakšala rad u laboratoriju.*

*Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama na podršci tijekom izrade ovog rada, ali i tijekom svih godina studiranja na strpljenju i podršci u dobrim i lošim trenucima, a posebno hvala kolegi i prijatelju Draganu Juriću koji je zajedno sa mnom sudjelovao u eksperimentima.*

*Na kraju posebna zahvala i najveće hvala mojim roditeljima i sestrama na razumijevanju i podršci tijekom studija. Bez njihove podrške i savjeta privesti kraju studij bilo bi mnogo teže. Zahvaljujem na svim razgovorima kojima su mi pomogli da danas budem gdje jesam.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Učinak antiepileptika valproata na antioksidacijski sustav u neciljnim stanicama i tkivima

Elena Marić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Cilj rada bio je istražiti kako tretman antiepileptikom valproatom utječe na razine antioksidacijskih enzima *in vitro* i *in vivo* u jetri i bubregu miševa (C57Bl6) te na staničnim modelima CHO, PK15 i HEPG2 te usporediti rezultate. Nakon tretmana valproatom *in vivo* i *in vitro*, u homogenatima bubrega i jetre miševa i u stanicama iz stanične kulture, izmjerena je lipidna peroksidacija odnosno razina malonilaldehida, koncentracija ukupnog glutaciona te aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze i katalaze. U jetri mužjaka i ženki valproat uzrokuje smanjenu koncentraciju malonilaldehida (MDA) odnosno manju lipidnu peroksidaciju u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. Slično je zabilježeno i u staničnom modelu, pri čemu jetrene stanice HEPG2, reagiraju sa smanjenom koncentracijom lipidne peroksidacije nakon 24 satnog tretmana s koncentracijama od 10, 70 i 100 mM valproata u staničnoj kulturi. Stanični model bubrega u kulturi, s obzirom na trend promjene antioksidacijskih parametara uglavnom slijedi slične promjene kao i u *in vivo* te se zaključno može reći da je PK stanični model oksidacijskog stresa uzrokovanog valproatom dobra zamjena za *in vivo* mišji model. Za razliku od PK15 stanica, HEPG2 stanice nisu pokazale slične promjene antioksidativnog sustava kao i jetra tretiranih miševa.

(59 stranica, 32 slike, 4 tablice, 52 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: valproat, valproična kiselina, oksidativni stres, lipidna peroksidacija, superoksid dismutaza, katalaza, glutation

Voditelj: dr.sc. Domagoj Đikić, izv. prof.

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

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

izv. prof. dr. sc. Davor Zanella

Rad prihvaćen:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### Antiepileptic valproate effect on antioxidative defence system in non-target cells and tissues

Elena Marić

Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of the study was to investigate how the antiepileptic valproate treatment affects the levels of antioxidative enzymes *in vitro* and *in vivo* in the liver and kidney of the mice (C57B16) and on the CHO, PK15 and HEPG2 cellular models and compare the results. After valproate treatment *in vivo* and, lipid peroxidation, ie malonilaldehyde levels, total glutathione concentration and antioxidant enzyme activity of superoxide dismutase and catalase were measured. In the liver of males and females, valproate caused a decrease in MDA or lower lipid peroxidation relative to the associated control group. Similarly, in the cell model, and the HEPG2 dairy cells reacted with reduced lipid peroxidation concentrations after 24 hours of treatment at concentrations of 10, 70 and 100 mM valproate in cell culture. The cellular model of the kidney in culture, mainly followed the similar changes as *in vivo* and it can be concluded that the PK cellular model of oxidative stress caused by valproate is a good replacement for an *in vivo* mouse model. Unlike PK15 cells, HEPG2 cells did not show similar changes in the antioxidative system as liver-treated mice.

(59 pages, 32 figures, 4 tables, 52 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: valproate, valproic acid, oxidative stress, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione

Supervisor: dr.sc. Domagoj Đikić, izv. prof.

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

assist. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

assoc. prof. dr. sc. Davor Zanella

Thesis accepted:

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Upotreba valproata u medicini .....	3
1.2. Štetni učinci.....	5
1.2.1. Štetni učinci na ljudima .....	7
1.2.2. Štetni učinci na životinjskim modelima.....	10
1.3. Oksidacijski stres.....	12
1.3.1. Superoksid dismutaza (SOD).....	14
1.3.2. Katalaza.....	15
1.3.3. Glutation peroksidaza (GPx).....	15
1.3.4. <i>In vitro</i> istraživanja valproata do sada .....	16
2. Cilj rada .....	17
3. Materijali i metode.....	18
3.1. Materijali .....	18
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Pokusne životinje.....	20
3.2.2. Izlaganje miševa valproatu .....	21
3.2.3. Stanična kultura .....	21
3.2.4. Tretman stanica.....	21
3.2.5. Određivanje proteina metodom po Lowryju .....	22
3.2.6. Mjerenje lipidne peroksidacije .....	23
3.2.7. Količina ukupnog glutationa (GSH).....	23
3.2.8. Mjerenje enzimske aktivnosti SOD.....	24
3.2.9. Statistička obrada podataka .....	24
4. REZULTATI .....	25
4.1. HEPG2 stanice MDA .....	25
4.2. HEPG2 stanice SOD .....	26
4.3. HEPG2 stanice CAT .....	26
4.4. HEPG2 stanice GSH .....	27
4.5. Jetra MDA .....	28
4.6. Jetra SOD .....	29



4.7.	Jetra CAT .....	30
4.8.	Jetra GSH .....	31
4.9.	PK stanice MDA .....	33
4.10.	PK stanice SOD .....	33
4.11.	PK stanice CAT .....	34
4.12.	PK stanice GSH .....	35
4.13.	BUBREG MDA.....	36
4.14.	BUBREG SOD.....	37
4.15.	BUBREG CAT .....	38
4.16.	BUBREG GSH.....	40
4.17.	CHO stanice MDA .....	41
4.18.	CHO stanice SOD.....	41
4.19.	CHO stanice CAT.....	42
4.20.	CHO stanice GSH.....	43
5.	RASPRAVA.....	45
6.	ZAKLJUČAK.....	52
7.	LITERATURA .....	54
8.	ŽIVOTOPIS.....	59

## 1. Uvod

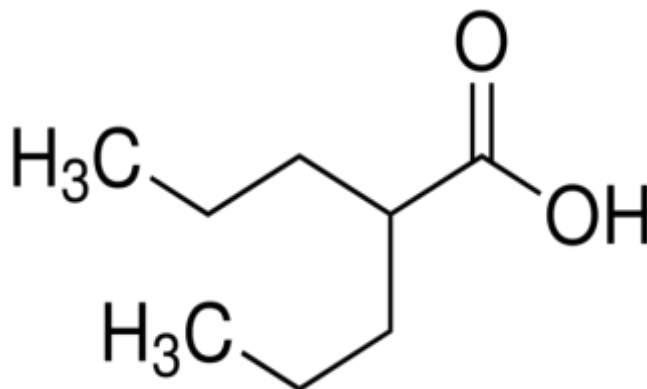
Valproičnu kiselinu, dobivenu iz valerične kiseline, koja je prirodni produkt biljke *Valeriana officinalis*, prvi je sintetizirao Burton 1882. godine. To je razgranata kratkolančana masna kiselina koja stvara bistru tekućinu na sobnoj temperaturi i čiji je poluživot 9 do 16 sati. Gotovo cijelo stoljeće ova se molekula koristila kao „fiziološki inertno“ otapalo za organske spojeve (Chateauvieux i sur 2010).

Ova kratkolančana masna kiselina razgranatog lanca (**Slika 1**) ima antikonvulzivna svojstva. Valproat (natrij valproat) je sol valproične kiseline (**Slika 2**). Ovaj spoj je jedan od lijekova koji se najviše koristi za mnoge tipove epilepsije kod djece i odraslih, za tretiranje bipolarnog poremećaja te za prevenciju migrene. Primjenjuje se kao natrijeva sol, natrij valproat i valproična kiselina ili kao smjesa oba spoja. Koncentracija koja se primjenjuje u terapiji varira između 50 i 150 mg/l u serumu. U serumu pri koncentracijama od 200mg/l i više, valproična kiselina može imati neželjene učinke pa je potrebno smanjiti dozu lijeka da bi se izbjegli akutni toksični efekti koji mogu uključivati hipertermiju/hipotermiju, tahikardiju, hipotenziju u slučaju teškog predoziranja, respiratorne probleme i zastoj srca pri teškom predoziranju. U središnjem živčanom sustavu (CNS) predoziranje valproičnom kiselinom može uzrokovati komu, zbunjenost, pospanost, pogoršanu kontrolu napadaja, vrtoglavicu, halucinacije, razdražljivost, glavobolju, ataksiju i cerebralni edem (Đikić i sur. 2017). Točan način djelovanja valproične kiseline u tretmanu bipolarnog poremećaja još nije potpuno razumljiv, ali je poznato da dolazi do povećanja aktivnosti neurotransmitera gama-amino maslačne kiseline (GABA) povećanjem količine GABA dostupne u prazninama između živčanih stanica. VPA ima široku ulogu u povećanju koncentracije GABA unutar mozga putem enzimatskog sustava kojeg čine GABA transaminaza,  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaza i sukcininska polualdehid dehidrogenaza (Lloyd 2013).

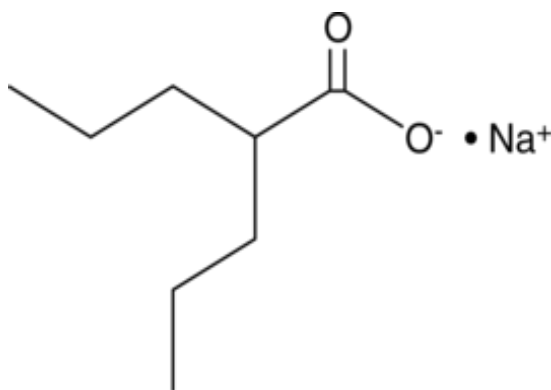
Valproat ima sličnu strukturu kao ostale kratkolančane i dugolančane masne kiseline pa se u tijelu apsorbira isto kao i ostali trigliceridi. Gotovo 90% VPA u serumu je vezano za proteine, većinom albumin. Samo slobodni VPA je fiziološki aktivan i može prijeći pomoću transportera ili difuzijom u jetru i mozak. Poluvrijeme eliminacije iz tijela pacijenata je između 6-16 sati, dok kod djece mlađe od 18 mjeseci može biti i duže. Svega 5% ukupnog valproata izluči se ne promijenjen iz tijela preko bubrega. Ostatak se izlučuje kao konjugirana glukuronska kiselina ili kao neki produkt beta oksidacije (Perucca 2002).

Osim terapijskih učinaka valproata u vidu sprječavanja napadaja epilepsije u novije vrijeme sve se više istražuju i negativni učinci primjene valproata. Mehanizmi nastanka takvih negativnih posljedica još uvijek nisu poznati, ali se očitavaju kao dobitak mase, ateroskleroza, nealkoholna steatoza jetre, policistični ovarijski sindrom i drugo (Đikić i sur. 2017).

Valproat je prvi puta sintetiziran 1882. godine, a lijekovi koji sadrže valproat su dostupni od sredine 1960-ih. Takvi lijekovi prodaju se u svim državama članicama Europske unije (EU) pod različitim trgovačkim imenima uključujući Depakine/Deprkine, Depakote i Epilim te kao generički lijekovi.



**Slika 1** Strukturna formula valproične kiseline (*preuzeto:*  
<https://www.mpbio.com/product.php?pid=02190286&country=223>)



**Slika 2** Strukturna formula natrij valproata (*preuzeto:*  
<https://www.caymanchem.com/product/13033>)

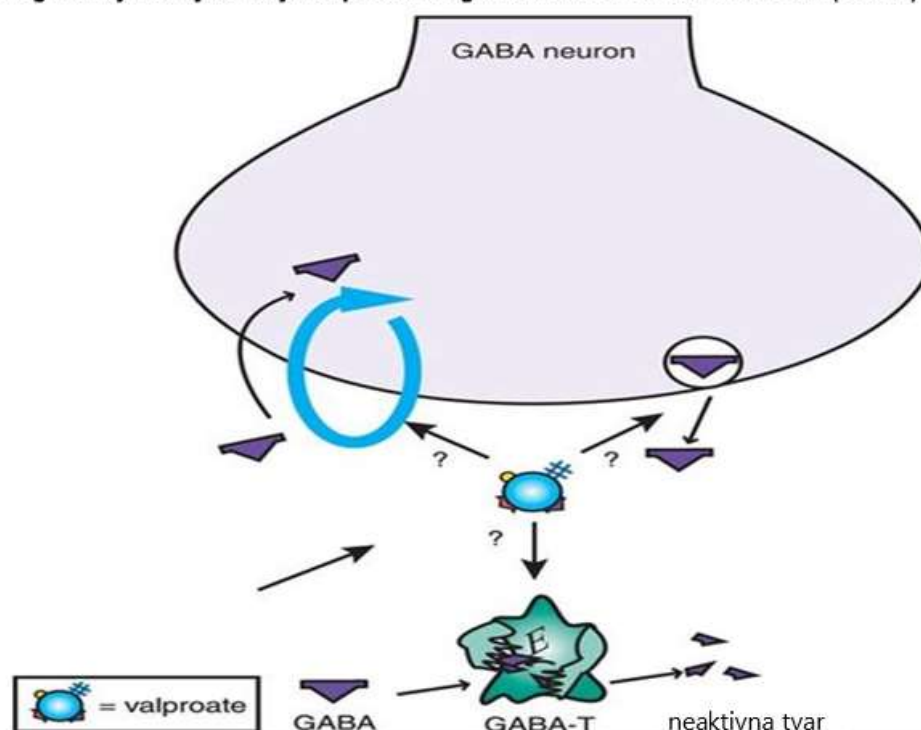
## 1.1. Upotreba valproata u medicini

Valproična kiselina je antikonvulzivni lijek čije se djelovanje očituje u mijenjanju koncentracije određenih neurotransmitera u mozgu. Valproat se primarno koristi u tretiranju epileptičnih napadaja, međutim terapijske primjene VPA mogu imati potencijal širenja primjene na tretiranje različitih tipova raka (Minucci i Pelicci 2006) i infekcije virusom humane imunodeficijencije (Lehrman i sur. 2005) jer se smatra učinkovitim inhibitorom histon deacetilaze. VPA je relativno siguran lijek, ali s njegovom upotrebom povezani su teratogenost, pankreatitis i toksičnost jetre (Perucca 2002).

VPA je trenutno najviše korišten antiepileptički lijek (AED) zbog svoje antiepileptičke učinkovitosti u ublažavanju velikog broja različitih napadaja kao što su tonik-klonski, mioklonski, napadaj odsutnosti i djelomični napadaj. Osim što pruža antiepileptičke učinke, za VPA se pokazao terapijski učinak kod bipolarnog poremećaja, neuropatske boli, poremećaja hiperaktivnosti s nedostatkom pažnje (ADHD), pri prevenciji migrene te se također provode temeljita istraživanja s fokusom na nove indikacije, uglavnom Alzheimerove bolesti, HIV-a i terapije raka. Za većinu patoloških stanja za koje VPA ima terapijsku vrijednost vrijedi zajednički mehanizam neuronske disfunkcije koja se razlikuje samo u lokaciji unutar središnjeg živčanog sustava (CNS), ali to isključuje HIV i rak kod kojih se VPA koristi kao senzibilizirajuće sredstvo unutar režima politerapije (Lloyd i sur. 2013).

Smatra se da je glavni fiziološki mehanizam terapijskih svojstava valproične kiseline u liječenju epilepsije inhibicija 4-aminobutirat aminotransferaze (ABAT), transaminaze u putu gama amino maslačne kiseline (GABA). Stoga valproična kiselina povećava otpuštanje GABA. Pretpostavlja se da antimanični učinci valproata mogu biti posljedica pojačavanja GABA neurotransmisije inhibicijom reapsorpcije GABA, pojačavanjem otpuštanja GABA ili ometanjem metabolizma GABA pomoću GABA transaminaze (GABA-T) (**Slika 3**). Može djelovati i mijenjanjem svojstava natrijevih kanala koji ovise o naponu i na taj način zaustavlja epileptični napadaj. Valproat ima širok spektar djelovanja kao antiepileptički lijek i može se koristiti u liječenju i generalnog i žarišnog napadaja, sam ili u kombinaciji s nekim drugim lijekovima. U upravljanju složenim, parcijalnim napadajima naznačena je samostalna upotreba ili kao dodatna terapija.

### Moguća mjesta djelovanja valproata na gama-amino maslačnu kiselinu (GABA)



**Slika 3** Moguća mjesta djelovanja valproata na gama-amino maslačnu kiselinu (GABA)  
(preuzeto: <https://doctorlib.info/ophthalmology/vaughan-asbury-general-ophthalmology/8.html>)

U tretman ljudi s bipolarnim poremećajem valproat je prvi put uveden 1966. godine, a u posljednjim desetljećima njegova primjena u ovoj indikaciji je porasla. Smatra se da pomaže u upravljanju maničnim epizodama povezanim s bipolarnim poremećajem i može se koristiti zajedno s drugim lijekovima koji pomažu u smanjenju depresivnih epizoda. Međutim, nedavni pregled dostupnih kliničkih podataka upućuje na to da postoji ograničen broj dokaza koji navode učinkovitost i prihvatljivost lijeka u usporedbi s placeboom ili alternativnim lijekovima za ovaj poremećaj. Iako se valproična kiselina često koristi u tretmanu bipolarnog poremećaja, potrebna su daljnja istraživanja za procjenu kliničkih ishoda njegove upotrebe.

Osim za navedene poremećaje, valproična kiselina je inicirana i za profilaktičko liječenje migrene, ali ne postoji dovoljan broj dokaza da bi se utvrdio njezin učinak na prevenciju akutne migrene. Preventivna terapija migrene se obično uzima u obzir kod pojedinaca koji doživljavaju česte napadaje, uglavnom barem jednom mjesečno. Iako su trenutno prve opcije u prevenciji migrene amitriptilin, propranolol i pizotifen, znanstveni pregledi podržavaju i smatraju upotrebu valproata učinkovitim i tolerantnom.

Ponekad se valproat koristi i za ublažavanje neuropatske boli kao što je ona koja je povezana s dijabetičkom neuropatijom. Međutim, dostupni dokazi ograničavaju upotrebu valproata u liječenju neuropatske boli i umjesto toga se njegovo korištenje preporučuje samo kada su drugi dokazani načini liječenja neuspješni.

Djeca s ADHD-om koja doživljavaju eksplozije agresije također mogu imati koristi od liječenja valproičnom kiselinom. Nije jasno jesu li prednosti liječenja agresije povezane s ADHD-om neutralizirale rizike povezane s njezinom upotrebom. Stoga se alternativne opcije moraju iscrpiti prije nego se valproat uzme u obzir za ovu indikaciju.

## 1.2. Štetni učinci

Iako se VPA pokazao kao učinkovit lijek u liječenju navedenih poremećaja, mnoge studije su pokazale i neke štetne učinke. Isto tako postoje slučajevi u kojima se ovaj lijek ne bi smio koristiti, a oni uključuju prisutnost obiteljske povijesti bolesti jetre, porfiriju ili druge poremećaje ciklusa uree. Liječenje valproatom također trebaju izbjegavati trudnice i dojilje. Bolesnici s oštećenjem ili zatajenjem bubrega trebaju koristiti manju dozu. Za valproičnu kiselinu se pokazalo da u jetri i kod modela *in vivo* i *in vitro* uzrokuje nakupljanje lipida, kolesterola i masnih kiselina s kasnijim razvojem steatoze jetre (masna jetra) i bolesti nealkoholne masne jetre (NAFLD). Takve nuspojave vjerojatno su posljedica poremećaja u transportu lipida, iako točni mehanizmi tih nuspojava uzrokovanih valproičnom kiselinom još uvijek nisu jasni, kao ni mehanizmi kojima VPA inducira bezalkoholnu bolest masne jetre (NAFLD) (Đikić i sur. 2017).

Hepatotoksičnost uzrokovana tretmanom s VPA je najveća kod djece mlađe od 2 godine podvrgnute politerapijama.

Izloženost jetre degradacijskim produktima VPA je najvjerojatnije objašnjenje za slučajeve hepatotoksičnosti zabilježene tijekom tretmana, posebno kod djece. Metaboliti i rezidue metaboličke razgradnje su spojevi VPA (E)-2,4-dien VPA i dvije forme konjugata s glutationom N-acetilcistein (NAC), NAC1 i NAC2. Ovi spojevi su najvjerojatnije glavni čimbenici koji uzrokuju hepatotoksičnost. Statistička studija, provedena 2003. godine, na skupinama mladih pacijenata liječenih s VPA u mono- ili politerapiji tipa A ili B pokazuje jasnu korelaciju između dobi, doze i količine konjugata zabilježenih u urinu pacijenta, s povećanim izlučivanjem kako dob

opada i izraženim učinkom između 0 i 7,5 godina. Ova studija također pokazuje nedostatak učinka politerapije tipa A (non-P450-induktor enzima) u usporedbi s monoterapijom. Međutim, tip B politerapije (P-450-induktor enzima) povećava metabolizam VPA i time povećava njegovu vrijednost što inducira značajno povećanje izlučivanja NAC (Chateauvieux i sur. 2010).

Bezalkoholna masna jetra zabilježena je kod pacijenata s epilepsijom liječenih s karbamazepinom (CBZ) i valproatom (VPA). CBZ i VPA se obično koriste zajedno kao antiepileptični lijekovi za liječenje različitih tipova napadaja i epileptičnih sindroma kod djece kao i kod odraslih posebice u zemljama u razvoju (Hamed i sur. 2018).

Bubrežne bolesti su rijetka nuspojava antiepileptičnih lijekova. Međutim, tijekom zadnja tri desetljeća mnogi autori bilježe Fanconijev sindrom kod djece s epilepsijom kao negativni učinak VPA terapije. Kod ovog sindroma bubrežni tubuli gube sposobnost reapsorpcije elektrolita, fosfata, uree, glukoze, aminokiselina i proteina što rezultira neravnotežom elektrolita, hiperfosfatemijom, izlučivanjem viška mokraćne kiseline u urinu i hipourikemijom, glikozurijom, proteinurijom, metaboličkom acidozom, osteopenijom, sekundarnim nedostatkom karnitina i povećanim izlučivanjem mokraćnog beta2-mikroglobulina. Kod djece koja boluju od epilepsije i liječena su s VPA ili CBZ u sklopu mono- ili politerapija pokazalo se povećanje urinarnog izlučivanja N-acetil-beta-D-glukozaminidaze (NAG), alfa 1-mikroglobulina i NAG kreatinin (NAG/Cr) omjera koji predstavljaju markere disfunkcije odnosno ozljede proksimalnih tubula bubrega. Točan mehanizam ozljede bubrega inducirane djelovanjem antiepileptičnih lijekova još uvijek nije poznat. Eksperimentalne i *in vitro* studije pokazale su da VPA potiče oksidativni stres, upalu i fibrozu u bubrežnom tkivu miša (Hamed i sur. 2018).

Izvorno se smatra da je toksičnost VPA niska, s minimalnim nuspojavama povezanim s dozom (dobivanje na težini, gubitak kose, mučnina i povraćanje) i rjeđe preosjetljive reakcije (hematološka toksičnost, hepatotoksičnost, pankreatitis i sindrom policističnih jajnika). Ove nuspojave su veće incidencije kada su u dječjoj primjeni. Međutim, VPA je poznati ljudski teratogen (uzrokuje porođajne nedostatke) s visokim kontraindikacijama kada se primjenjuje tijekom prvog tromjesječja trudnoće (Lloyd i sur. 2013).

Kod nekih pacijenata pokazale su se blage nuspojave tijekom ili nakon završetka tretmana. Jedna studija na mladim pacijentima je pokazala povećanje trajanja spavanja za vrijeme tretmana s VPA. Budući da je temeljena na trajanju spavanja i promjenama tijekom tretmana i 8 tjedana

nakon tretmana, pokazala je da nakon izuzimanja dobi kao mjerila za san, prekid tretmana s VPA izaziva smanjenje trajanja spavanja. Za većinu pacijenata se pokazala umjerena razina trajanja spavanja, dok je kod podskupine djece zabilježena znatna razina trajanja spavanja, posebno kod najmlađih što upućuje na to da tretman s VPA ima ulogu u pospanosti tijekom dana (Chateauvieux i sur. 2010).

VPA također može dovesti do povećanja težine, promjena u trigliceridima u serumu, kolesterola i glukoze. Indeks tjelesne mase (BMI) obično se povećava za vrijeme prvih 16 mjeseci liječenja, a zatim se stabilizira što rezultira porastom udjela male djece u kliničkoj kategoriji osoba s prekomjernom težinom s 6.9% na 16%. Međutim ukupni rezultati istraživanja nisu pokazali značajne varijacije u sastavu masnih kiselina u serumu (Chateauvieux i sur. 2010).

Kao što je prethodno spomenuto, liječenje epileptičnih pacijenata s VPA može biti povezano sa značajnim promjenama težine što može dovesti do povećanja morbiditeta i narušiti pridržavanje režima liječenja. Povećanje tjelesne težine tijekom primjene VPA povezano je i sa srodnim endokrinim abnormalnostima pa se preporučuje izbjegavati ovaj lijek kod pretilih pacijenata, posebice kod pacijentica u razdoblju puberteta, jer može doći do pojave policističnih jajnika. Značajan porast tjelesne težine zabilježen je kao jedan od najčešćih poremećaja kod pacijenata s epilepsijom (10-70%) obuhvaćajući sve od pedijatrijske do odrasle upotrebe VPA. Ne postoji samo jedan mehanizam djelovanja antiepileptičnog lijeka VPA koji može objasniti njegove brojne učinke i široku kliničku aktivnost. Mnoga opažanja i eksperimentalna istraživanja pokazuju da promjene koje uključuju razine ključnih molekula ili neurotransmitera kao što su inzulin, leptin, neuropeptin, grelin i adiponektin mogu utjecati na povećanje tjelesne težine i pojavu pretilosti induciranu tretmanom s VPA s kasnijim metaboličkim posljedicama (Belcastro i sur. 2013).

#### 1.2.1. Štetni učinci na ljudima

*In vivo* istraživanja na humanim staničnim linijama HEPG2 su pokazala da tretman valproičnom kiselinom uzrokuje propuštanje ALT, AST i LDH u dozama koje uzrokuju oštećenje hepatocita (Ji i sur. 2010). 4-en-VPA i 2,4-dien-VPA metaboliti i enzimi CYP1A1, CYP2A6, CYP2C9, ABCG1 i CPT1A su povezani s nuspojavama u hepatocitima ljudi i u određenim staničnim linijama hepatocita (Ji i sur. 2010; Zhao i sur. 2017). Međutim, samo je polimorfizam enzima CYP2A6 bio povezan s većim koncentracijama 4-en-VPA i 2,4-dien-VPA. Potencijalni



čimbenici rizika uključuju mutirane genotipove enzima CYP2C9 i CYP2A6 i veće koncentracije valproične kiseline (Zhao i sur. 2017).

Izlaganje stanične kulture humanih hepatocita natrij valproatu inducira smanjenu regulaciju nekoliko transkripta u kultiviranim hepatocitima. Njihova niska razina vremenom rezultira fluktuacijama staničnog ATP-a što može dovesti do stanične smrti. Na staničnim linijama humanih HEPG2 stanica pokazalo se da izloženost valproičnoj kiselini više od 72 sata povećava razinu proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta u mitohondrijima, a smanjuje razinu mitohondrijske superoksid dismutaze SOD2 što ukazuje na oksidacijski stres uzrokovan slabljenjem eliminacije mitohondrijskih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (Komulainen i sur. 2015).

Ispitivan je genetski polimorfizam u beta podjedinici G proteina (GNB3) i povezanost s metaboličkim fenotipovima pacijenata tretiranih valproičnom kiselinom. Pacijenti nositelji T alela za GNB3 C825T polimorfizam imaju manji rizik od VPA induciranih metaboličkih abnormalnosti, međutim autori nalažu daljnje istraživanje mehanizama VPA induciranih metaboličkih abnormalnosti i G proteina (Chang i sur. 2010).

Rizik od neželjenih nuspojava u jetri izazvanih primjenom VPA povećava se kod pacijenata s bolestima mitohondrija, posebno kod onih čiji je gen POLG1 mutiran. POLG geni kodiraju mitohondrijsku DNA polimerazu gama i njihove mutacije mogu uzrokovati Alpers-Huttenlocherov sindrom, neurometabolički poremećaj povezan s povećanjem rizika od razvoja smrtonosnih hepatskih nuspojava nakon izlaganja valproičnoj kiselini. Uočena je i povezanost nuspojava u jetri nakon korištenja VPA s varijacijama u POLG genu. U tom slučaju, to je bio heterozigot POLG gena koji je prvenstveno bio posljedica supstitucije p.Q1236H i bio je snažno povezan s VPA induciranom toksičnošću jetre (Stewart i sur. 2010). Terapeutske doze VPA primijenjene na primarnim staničnim linijama ljudi zaustavljaju humanu staničnu proliferaciju, a visoke doze VPA induciraju ne-apoptičku staničnu smrt koja nije povezana s trošenjem mitohondrijske DNA, poremećajem u metabolizmu masnih kiselina ili mutacijama. Stoga, drugi mehanizam ozljede jetre uzrokovane valproičnom kiselinom je smanjena regeneracija jetre. Jedan od načina prevencije je potencijalno testiranje POLG gena kako bi se mogle identificirati osobe s visokim rizikom za potencijalno smrtonosne posljedice VPA tretmana (Stewart i sur. 2010).

Veća pojava sindroma policističnih jajnika (PCOS) u usporedbi s drugim antiepileptičkim lijekovima je jedna od glavnih nuspojava zabilježenih kod žena tretiranih s VPA (Petersen i sur.

2017; Viswanathan i sur. 2016). Nekoliko molekularnih mehanizama moglo bi objasniti ovakvu epidemiološku pojavu. VPA tretman može biti povezan s hiperandrogenizmom, hiperandrogenemijom, neredovitom ovulacijom (oligoovulacija), pojavom policističnih jajnika na ultrazvuku, povišenim razinama testosterona i nepravilnim menstrualnim ciklusima. Učestalost pojavljivanja policističnih jajnika kod žena koje uzimaju VPA je 1.95 puta veća nego kod žena koje se liječe drugim antiepilepticima (Hu i sur. 2011).

Liječenje s VPA tijekom trudnoće ima značajan rizik od teratogenih učinaka utemeljenih na istraživanju gdje je 15 od 229 (6.6%) žena kojima je prepisan valproat rodilo dijete s većom urođenom malformacijom (Petersen i sur. 2017). Budući da se razina testosterona neznatno povećava, a razine progesterona i estradiola smanjuju tijekom dužeg liječenja s VPA, vjeruje se da takva neravnoteža inducira promjene policističkih jajnika i menstrualne suspenzije (izostanak menstruacije) što kasnije dovodi do sindroma policističkih jajnika (Herzog 2008).

VPA tretman tijekom dužeg vremenskog razdoblja povezan je s povećanom razinom testosterona. Zabilježena je i povezanost s razvojem menstrualnih abnormalnosti. Postoji i značajna korelacija između liječenja s VPA i smanjenja razine mRNA koja kodira alfa receptor estrogena (ER alfa) što uzrokuje nedostatak ER alfa proteina u staničnim linijama dojke i jajnika. VPA također uzrokuje i smanjenje izlučivanja LH (luteinizirajućeg hormona), FSH (folikostimulirajućeg hormona) i prolaktina. Zajedno, neravnoteža steroidnih spolnih hormona, hiperinzulinemija i pretilost kod ljudi, koji nastaju nakon VPA tretmana, dodatno doprinose porastu seksualnih poremećaja (Verrotti i sur. 2016).

Postoji mnogo dokaza koji ukazuju na to da valproat može uzrokovati ozljedu bubrežnih tubula kod djece, a sve više istraživanja govori i o tome da VPA inducira Fanconijev sindrom kod kojeg bubrežni tubuli gube sposobnost reapsorpcije elektrolita, uree, glukoze i proteina. Djeca kod kojih je epilepsija tretirana valproatom imaju veći rizik od ozljeda bubrega. Oko polovice populacije može biti podložno takvim nuspojavama, iako procjene sežu i do 78%, a mnogi od tih pojedinaca će vjerojatno ostati podklinički. Kako se ozljeda tubula bubrega uzrokovana valproatom nastavlja, gubitak sposobnosti reapsorpcije elektrolita, uree, glukoze i aminokiselina postaje sve vjerojatniji, pri čemu Fanconijev sindrom postaje očit. To se gotovo univerzalno javlja u subpopulaciji djece koja boluju od epilepsije i tretirana su valproatom, a uz to su ili teško onesposobljena, usporenog razvoja, nepokretna, hranjena preko sonde ili imaju mješavinu

navedenih poteškoća. Iako se pokazalo da postoji veliki broj dostupnih markera za procjenu ozljede bubrežnih tubula (mikroalbumin,  $\alpha$ (1)mikroglobulin,  $\beta$ -galaktozidaza), najčešći marker koji je trenutno u upotrebi jeste NAG (N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminidaza). S daljnjim istraživanjima razine NAG prije i nakon pojave Fanconijeva sindroma, indeks koji korelira razinu NAG sa stupnjem ozljede tubula može pružiti klinički alat za predviđanje razvoja ovog sindroma. Povišena razina mokraćnog NAG direktno je povezana sa stupnjem ozljede tubula (Knights i Finlay 2013).

### 1.2.2. Štetni učinci na životinjskim modelima

Poremećaji jetre uzrokovani valproičnom kiselinom također su povezani s mitohondrijskim poremećajima, s inhibicijom enzima u beta-oksidacijskom putu i oksidacijskim stresom. VPA može formirati tiol konjugate, osobito s glutationom. Takva smanjena unutarstanična razina glutaciona mijenja redoks status stanice i dovodi do oksidacijskog stresa stanice. Primjerice, VPA inkubacija hepatocita štakora *in vitro* uzrokovala je smanjenje razine glutaciona što ukazuje na mogući stanični oksidacijski stres nakon izlaganja valproičnoj kiselini (Kiang i sur. 2011). Međutim, još uvijek je nedovoljno istraženo je li VPA potencijalni oksidans.

Istraživanja na mitohondrijima jetre štakora *in vitro*, tretiranim valproičnom kiselinom, pokazala su povećanje formiranja ROS-a sa smanjenjem membranskog potencijala mitohondrija, a sve to je bilo zabilježeno prije signalizacije za staničnu smrt. Reaktivne kisikove vrste mogu biti povezane s povećanjem lipidne peroksidacije i kolapsom mitohondrijske membrane. Bubrenjem mitohondrija i otpuštanjem citokroma c započinje signalizacija stanične smrti. Citotoksično djelovanje VPA manifestira se curenjem lizosomalne membrane povezanim s formiranjem ROS i smanjenjem membranskog potencijala. Sve navedeno događa se prije nego što počne liza stanice (Pourahmad i sur. 2012; Jafarian i sur. 2013).

Metabolizam lipida jetre je oštećen tijekom liječenja valproičnom kiselinom. Izlučivanje triacilglicerola i fosfolipida na sinusoidnom polu hepatocita je smanjeno akutnom primjenom VPA. Smatra se da je ova inhibicija sekrecije faktor u razvoju nuspojava u jetri štakora nakon tretmana hepatocita valproičnom kiselinom (Bellringer i sur. 1988).

Ekspresija gena u hepatocitima može biti povezana s nuspojavama u hepatocitima uzrokovanih natrij VPA. Podaci o genima pokazali su značajne promjene u ekspresiji gena povezanih s lipidima, masnim kiselinama, metabolizmom steroida, onkogenezom, transdukcijom signala i razvojem kod miševa tretiranih VPA. Utvrđeno je da je 1156 gena uključeno u povećanje i smanjenje produkata nakon izlaganja natrij valproičnoj kiselini. 60 gena uključeno je u

metabolizam lipida i povezano s biološkim putovima za biosintezu triglicerida i kolesterola, katabolizmom masnih kiselina i transportom lipida (Lee i sur. 2007).

Za utjecaj tretmana valproičnom kiselinom na ovarije kod modela hormonska neravnoteža se navodi kao izravna posljedica diferencijalne aktivnosti u ekspresiji CYP enzima uključenih u sintezu hormona što narušava pretvorbu testosterona u estradiol (Taubøll i sur. 2003; Gustavsen i sur. 2009).

Supresija ekspresije aromataze odvija se u granuloznim stanicama kao odgovor na VPA tretman. Primjerice, razvoj folikula kod štakora starih 14 dana bio je suprimiran, a testosteron, estradiol, androstendion i kombinirane razine svih steroidnih hormona imali su tendenciju opadanja s vremenom izlaganja valproičnoj kiselini. Supresija ekspresije aromataze znači da je sintetski put od kolesterola do estradiola, uključujući *de novo* sintezu kolesterola, suprimiran. Suprotno tim *in vivo* rezultatima u izoliranim mitohondrijima, *in vitro* istraživanja su pokazala da VPA stimulira egzogenu promjenu kolesterola u progesteron (Inada i sur. 2012). Na modelima *in vitro* pokazalo se da je ekspresija gena koji kodiraju za enzime u ranoj steroidogenezi smanjena (Gustavsen i sur. 2009).

U pokusu na stanicama TC i na granulozna stanicama (GC) (model usko povezan s ljudskim ciklusom), TC su izložene VPA (7.8-500 $\mu$ g/ml) sa/bez LH i GC sa/bez FSH ili IGF analoga. U stanicama goveda, VPA smanjuje lučenje bazalnog androstenediona za 70%, a u VPA/LH induciranim TC za 93%. CYP17A1 mRNA smanjena je za više od 99%, a LHR, STAR, CYP11A1 i HSD3B1 mRNA su također niže. Razina sekrecije progesterona kod TC se smanjila samo u tretmanu VPA induciranom najvećom (luteinizirajućom) LH dozom. Pri višim koncentracijama (125-500 $\mu$ g/ml) VPA inhibira bazalnu sekreciju FSH- i IGF-stimuliranog estradiola u granuloznim stanicama bez utjecaja na sekreciju progesterona. VPA je preokrenula FSH-induciranu regulaciju CYP19A1 i HSD17B1 mRNA razina. Nasuprot tome, VPA inhibira i produkciju LH-ovisnog androgena i FSH/IGF-ovisnog estradiola. Autori zaključuju da su navedene promjene posljedica inhibitornih svojstava HDAC i da VPA ima izravno stimulativno djelovanje na proizvodnju androgena u TC (Glister i sur. 2012).

VPA spada u skupinu lijekova koji induciraju oštećenja funkcija proksimalnih tubula bubrega štakora poznata kao Fanconijev sindrom i zatajenje bubrega. To istraživanje osmišljeno je kako bi se procijenila uloga VPA u disfunkciji mitohondrija i nastanku oksidativnog stresa u ozljeđenim bubrezima. Životinje tretirane s VPA pokazale su biokemijske dokaze Fanconijeva

sindroma prema procjeni povišene razine gama-glutamil transferaze ( $\gamma$ -GT) u serumu, alkalne fosfataze (ALP), kreatinina (Cr) i urea nitrata u krvi zajedno s hipokalijemijom, hipofosfatemijom i smanjenjem mokraćne kiseline u serumu. VPA je uzrokovao povećanje reaktivnih kisikovih radikala (ROS) i lipidne peroksidacije (LPO) u bubregu. Kod životinja tretiranih s VPA spremnici GSH u bubrezima su iscrpljeni, a kapacitet tkivnih antioksidanasa smanjen. Zabilježeni su i tubulo-intersticijalni nefritis, nekroza tkiva i atrofija kod štakora tretiranih s VPA. Mitohondrijski parametri, uključujući sukcinat dehidrogenazu (SDA), matriks metaloproteinaze (MMP), glutation (GSH), adenzin trifosfat (ATP) i mitohondrijske pore (MPP) su smanjeni, a mitohondrijski ROS i LPO su povećani. Osim toga, pokazalo se da karnitin može ublažiti štetno djelovanje VPA na bubrege pa on može biti potencijalno sigurna i učinkovita terapijska mogućnost za smanjenje oštećenja bubrega inducirano tretmanom valproičnom kiselinom (Heidari i sur. 2018).

### 1.3. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres predstavlja neravnotežu između proizvodnje slobodnih radikala i sposobnosti organizma da neutralizira i umanju njihove štetne učinke uz pomoć antioksidanasa. Slobodni radikali kisika su molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u posljednjoj orbitali što ih čini visoko reaktivnim s drugim molekulama. Male količine ROS stalno nastaju u aerobnim organizmima kao odgovor na vanjske i unutarnje signale (Matés i sur. 1999).

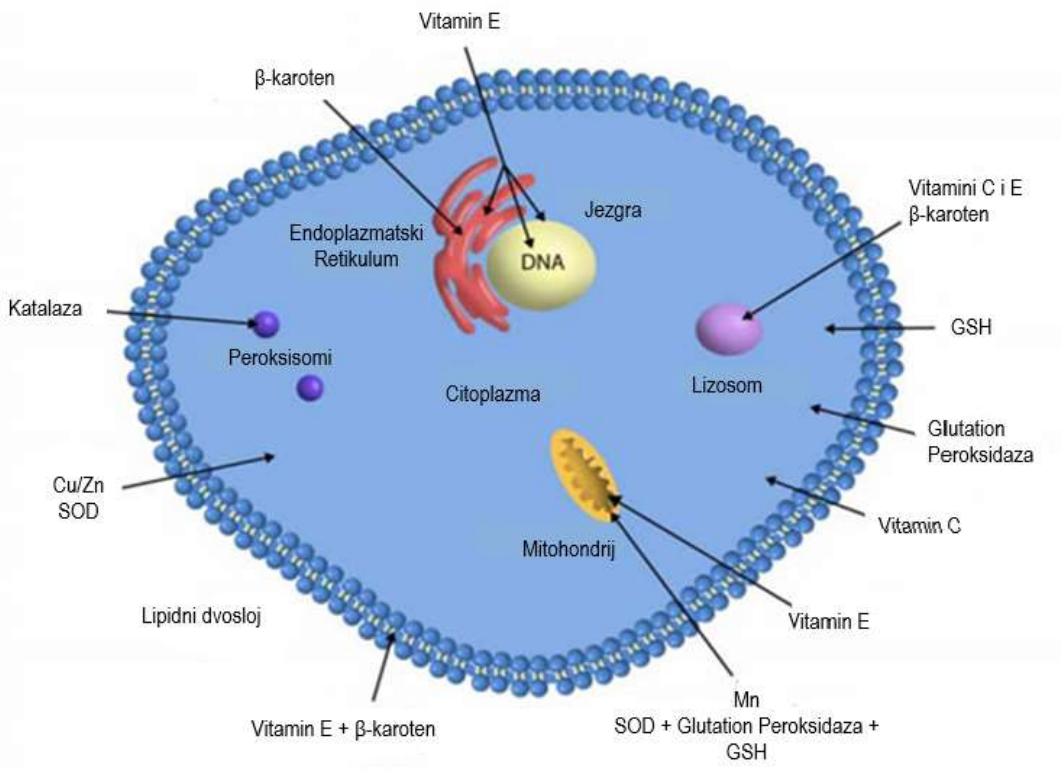
Nisu sve reaktivne kisikove vrste štetne za organizam. Neke od njih su korisne u ubijanju patogena i mikroba. Međutim, slobodni radikali mogu kemijski reagirati s drugim staničnim komponentama kao što su DNA, proteini, lipidi i uzeti njihov elektron kako bi se stabilizirali. To zauzvrat destabilizira stanične komponente koje potom uzimaju elektrone od drugih molekula te tako potiču veliki lanac reakcija slobodnih radikala (Sas i sur. 2007).

Slobodni radikali kisika su superoksid anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikal, organski hidroperoksid, alkoksi i peroksi radikali, hipoklorna kiselina i peroksinitrit. Svaka stanica koja koristi enzime i kisik za obavljanje funkcija izložena je reakcijama slobodnih radikala kisika koje imaju potencijal stvaranja ozbiljne štete u stanici. Antioksidansi su molekule prisutne u stanicama koje sprječavaju ove reakcije donirajući elektron slobodnim radikalima bez da postanu destabilizirani. Neravnoteža između oksidanasa i antioksidanasa je temelj oksidacijskog stresa. U stanicama postoje enzimi koji djeluju antioksidacijski. Ti enzimi kataliziraju reakcije kojima se

neutraliziraju slobodni radikali i reaktivne kisikove vrste, a to su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza i katalaza (**Slika 4**).

Reaktivne kisikove vrste (ROS) uključene su u rast stanica, diferencijaciju, progresiju i smrt. Niske koncentracije ROS-a mogu biti korisne ili čak neophodne u procesima kao što su unutarstanična signalizacija i obrana od mikroorganizama. Međutim, veće količine ROS-a imaju važnu ulogu u procesu starenja, kao i u razvoju mnogih bolesti kod čovjeka od kojih najčešće rak, ishemija te pojava grešaka u imunom odgovoru i endokrinim funkcijama (Matés i sur. 1999).

Lijekovi poput VPA mogu prodrijeti u lanac transporta elektrona vezujući se za biološke komponente (primjerice SOD) ili prihvaćanjem elektrona čime se sprječava prirodni protok elektrona kroz sustav te se povećava lokalizirano stvaranje superoksida (ROS). Za VPA se pokazalo da tvori anion u krvi. Ovaj anion eventualno može stvarati kovalentnu vezu s esencijalnim antioksidacijskim enzimima (primjerice SOD) zbog njihovog negativnog naboja, inhibirajući njihovu funkcionalnost i trajno sprječavajući detoksikaciju superoksida dok ne dođe do nove sinteze proteina. Također se pokazalo da VPA prekida prolaz elektrona kroz dišni lanac. Poznato je da proizvodi asortiman metabolita kao rezultat opsežnog metabolizma, oksidacijom s CYP450,  $\beta$ -oksidacijom u mitohondrijima i glukuronidacijom putem UDP-glukuronozil transferaza u jetri. Dio nastalih metabolita su kemijski reaktivni spojevi. CYP450 enzimi proizvode 4-enu VPA koja se podvrgava  $\beta$ -oksidaciji formirajući visoko reaktivnu (E)-2,4-dien VPA. Ovaj derivat može prihvatiti elektrone, postati reduciran te ih prenijeti na NADPH dopuštajući daljnje smetnje elektrona i uspostavljajući redoks ciklus umjesto GSH antioksidacijskog redoks ciklusa. Budući da je NADPH u ljudskim stanicama u izobilju postoji velik potencijal za formiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (Lloyd i sur. 2013).



**Slika 4** Antioksidacijski enzimi u stanici (*preuzeto: <https://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems.aspx>*)

### 1.3.1. Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza je enzim koji ima važnu ulogu u obrambenom mehanizmu stanica izloženih kisiku. SOD katalizira dismutaciju superoksidnog radikala ( $O_2^-$ ) u jednu molekulu kisika i vodikov peroksid. Sisavci posjeduju tri vrste SOD-a koji se razlikuju po metalnom ionu koji sadrže. Cu/Zn-SOD (SOD1) je oblik SOD-a kojeg nalazimo u citoplazmi, lizosomima i jezgrinim kompartmentima stanica sisavaca. Ljudski SOD1 je homodimer koji sadrži Zn i Cu podjedinice građene od 153 aminokiseline. U matriksu mitohondrija nalazi se Mn-SOD (SOD2). Za razliku od SOD1, SOD2 je heterodimer koji se sastoji od jedne Mn podjedinice s aktivnim središtem. Ovaj enzim najveću aktivnost postiže u stanicama bubrežnog korteksa.

Uz SOD1 i SOD2 postoji još i ekstracelularni (EC)-SOD (SOD) koju susrećemo u vanstaničnim tekućinama kao što su plazma i limfa. Građen je od Zn i Cu podjedinice te sadrži domenu s visokim afinitetom za heparin, što doprinosi njegovoj lokalizaciji u vanstaničnim

tekućinama (Miyamoto i sur. 2010). Cu/Zn SOD se smatra prvom linijom obrane, ali se pokazalo da je SOD2 neophodna za preživljavanje, ali SOD1 nije (Matés i sur. 1999).

Superoksid koji nije odmah uklonjen može reagirati s oksidiranim citokromom c ili citokrom oksidazom (Balaban i sur. 2005). SOD katalizira nastanak kisika iz superoksidnog radikala, a pri tome nastaje i  $H_2O_2$ . Novonastali  $H_2O_2$  se dalje pretvara u kisik i vodu uz enzime GPx i katalazu (Mao i sur. 1993).

### 1.3.2. Katalaza

Katalaza je jedan od prvih izoliranih enzima s molekulom željeza u aktivnom središtu. Građen je kao tetramer sa četiri identične podjedinice od kojih svaka sadrži jednu hem skupinu i NADPH u svome aktivnom središtu. Ovisno o koncentracijama  $H_2O_2$  katalaza ima dva enzimska djelovanja. Ako je razina  $H_2O_2$  visoka, kao posljedica formiranja  $H_2O_2$  djelovanjem SOD-a i/ili drugih procesa, hem skupina iz katalaze će katalizirati prijelaz  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i  $O_2$ . Suprotno tome, pri niskim koncentracijama  $H_2O_2$  i u prisutnosti pogodnog donora vodika (primjerice etanol, metanol, fenoli) katalaza djeluje peroksidativno, tako da ukloni  $H_2O_2$ , ali pri tome oksidira supstrat (Ścibior i Czczot 2006, Berg i sur. 2002).

### 1.3.3. Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaza (GPx) je glikoprotein koji sadrži jedan selen-cisteinski ostatak na aktivnom mjestu svake svoje podjedinice. Ovaj enzim katalizira redukciju vodikovog peroksida i lipidnih hidroperoksida do vode i alkohola. Da bi se ova reakcija odvila potreban je glutacion (GSH), tripeptid rasprostranjen u biljnom i životinjskom svijetu. GSH služi kao donor elektrona pri čemu se oksidira do glutacion disulfida (GSSG) (Miyamoto i sur. 2010). Za razgradnju jedne molekule vodikovog peroksida do glutacion disulfida i vode potrebne su dvije molekule glutaciona (GSH) (Lloyd i sur. 2013). Osim toga GSH ima i bitnu ulogu kao nukleofilni kosupstrat za enzim glutacion transferazu prilikom detoksifikacije ksenobiotika (Baille i Slatter 1991). GPx ima nekoliko izoenzima koji se razlikuju u strukturi, tj. u aminokiselinskom slijedu i podjedinicama, raspodjeli unutar organizma (jetra, bubrezi, eritrociti, plazma i druga tkiva), lokalizaciji enzima bilo u citoplazmi, probavnom sustavu ili vanstaničnoj tekućini i specifičnosti za supstrat (vodikov peroksid i lipidni hidroperoksidi) (Miyamoto i sur. 2010)



#### 1.3.4. *In vitro* istraživanja valproata do sada

Nekoliko *in vitro* istraživanja potvrđuje povezanost valproata s pojavom oksidacijskog stresa. Jedno od tih istraživanja bilo je na HEPG2 kulturi stanica, a njegov cilj bio je istražiti ulogu mitohondrijske oksidacijske fosforilacije u stanicama tretiranim s VPA. Ispitivan je učinak VPA na stanično disanje u različitim metaboličkim uvjetima kultiviranjem stanica u mediju uz dodatak glukoze ili u mediju bez glukoze koji sadrži galaktozu i piruvat. Rezultati tog istraživanja ukazuju na to da dolazi su disfunkcije mitohondrija tako da VPA inhibira stanično disanje. To dovodi do povećane stanične smrti čime se potvrđuje važna uloga VPA u pojavi hepatotoksičnosti i u disfunkciji mitohondrija. Osim toga, izloženost VPA povećava razinu reaktivnih kisikovih vrsta i smanjenje ekspresije SOD2 što upućuje na stanični oksidacijski stres (Komulainen i sur. 2015).

Drugo istraživanje provodilo se na svježe izoliranim hepatocitima štakora. Rezultati su pokazali da VPA inducira lizu membrane hepatocita i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta. Osim toga, cilj ove studije bio je istražiti ulogu GSH u oksidacijskom stresu posredovanom s VPA u izoliranim hepatocitima štakora. GSH je jedan od važnih staničnih antioksidanasa koji ima sposobnost izravno ili enzimatski konjugirati s reaktivnim kisikovim vrstama kao što je lipidni hidroperoksid ili vodikov peroksid. Kad su izolirani hepatociti inkubirani s VPA zapaženo je iscrpljivanje glutationa kao posljedica formiranja ROS-a. Pokazalo se da iscrpljivanje GSH hepatocita unaprijed potencirano VPA induciranim formiranjem ROS-a, curenjem lizosomalne membrane, gubitkom membranskog potencijala mitohondrija i gubitkom stanične održivosti. Stoga je potvrđeno da je citotoksični mehanizam VPA posredovan oksidacijskim stresom (Pourahmad i sur. 2012).

Još jedno *in vitro* istraživanje provedeno je na izoliranim mitohondrijima jetre štakora. Rezultati ove studije potvrđuju da VPA može inducirati stvaranje ROS-a putem oštećenja lanca transporta elektrona (ETC) u kompleksu II, nakon čega slijedi povećanje LPO bez GSH oksidacije. Osim toga VPA je također izazvao otvaranje MPT (mitochondrial permeability transition) pora, MMP kolaps, bubrenje mitohondrija i oslobađanje citokroma c u mitohondrije jetre štakora. VPA može inducirati oslobađanje citokroma c iz izoliranih mitohondrija *in vitro* što upućuje na to da VPA može direktno uzrokovati oštećenje mitohondrija u stanici kako bi se aktivirao unutarnji signalni put smrti. Ovaj proces može biti posredovan otvaranjem MPT pora zbog velikog bubrenja, ali detaljan mehanizam je još uvijek nejasan te su potrebna daljnja istraživanja.

## **2. Cilj rada**

Cilj ovog rada jest istražiti i usporediti razine antioksidacijskih enzima *in vitro* i *in vivo* u bubregu i jetri miševa (C57Bl6) i na staničnim kulturama CHO (ovarijske stanice), PK15 (bubrežne stanice) i HEPG2 (jetrene stanice) nakon tretmana antiepileptikom valproatom. U pokusu će se mjeriti razina malonilaldehida odnosno lipidna peroksidacija, koncentracija ukupnog glutationa i aktivnost antioksidacijskih enzima supeksid dismutaze i katalaze.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

**Tablica 1.** Popis najvažnijih korištenih kemikalija i njihovih proizvođača.

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Fosfatni pufer (PBS)</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Medij DMEM/F12</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>Medij EMEM</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>Medij RPMI</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>Serum govedeg fetusa (FBS)</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>Tripsin s EDTA</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>Tripansko modriilo</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>5-sulfosalicilna kiselina dihidrat</b>	Sigma- Aldrich, SAD
<b>Albumin iz govedeg seruma (BSA)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>Natrij-kalij tartarat</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O</b>	Lach-Ner, Češka
<b>Folin &amp; Ciocalteu's phenol reagent</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
<b>Natrij-dodecilsulfat (SDS)</b>	Merck, Njemačka
<b>Octena kiselina</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Tiobarbiturna kiselina (TBA)</b>	AppliChem GmbH, Njemačka
<b>Natrijev hidroksid (NaOH)</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Reducirani GSH (GSH)</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka
<b>Ellmanov reagens (DTNB)</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka
<b>NADPH</b>	AppliChem GmbH, SAD
<b>GSH reduktaza (GR)</b>	Biobasic Canada Inc., SAD
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O</b>	AppliChem GmbH, Njemačka
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Citokrom C</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>Ksantin</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>Ksantin oksidaza (50 jedinica/1,3 mL)</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>SOD (SOD) iz govedih eritrocita</b>	Sigma-Aldrich, SAD
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Kemika, Hrvatska

**Tablica 2.** Popis pripreme svih korištenih otopina.

Otopina	Priprema otopine
<b>Otopina D (Lowry)</b>	Pomiješati otopine u omjeru A:B:C=48:1:1 A: 2% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> u dH <sub>2</sub> O B: 1% (w/v) natrij-kalij tartarat u dH <sub>2</sub> O C: 0,5% (w/v) CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O u dH <sub>2</sub> O
<b>Otopina E (Lowry)</b>	Pomiješati Folin & Ciocalteu's phenol reagent i dH <sub>2</sub> O u omjeru 2:1
<b>8,1% SDS</b>	0,81 g SDS-a u 10 mL dH <sub>2</sub> O
<b>20% octena kiselina</b>	20 mL 99,5% octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH <sub>2</sub> O i podesi pH=3,5 te nadopuni dH <sub>2</sub> O do 100 mL
<b>0,8% TBA</b>	0,8 g TBA u 40 mL dH <sub>2</sub> O uz lagano zagrijavanje. Dodaje se 500 µL 5M NaOH te se nadopuni s dH <sub>2</sub> O do 100 mL. Priprema se svježe na dan pokusa.
<b>0,5 M pufer PBS</b>	17 mL 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2 H <sub>2</sub> O i dH <sub>2</sub> O do 17 mL) i 183 mL 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O (65,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12 H <sub>2</sub> O i dH <sub>2</sub> O do 183 mL)
<b>0,5 M EDTA</b>	37,2 g EDTA i dH <sub>2</sub> O do 200 mL
<b>0,5 M pufer PBS s 0,25 M EDTA</b>	200 mL 0,5 M pufer PBS i 200 mL 0,5 M EDTA
<b>0,035 M HCl</b>	7 mL 0,1 HCl u dH <sub>2</sub> O do 200 mL
<b>10 mM DTNB</b>	20 mg DTNB i 0,5M pufer PBS s 0,25 M EDTA do 5 mL
<b>0,8 mM NADPH</b>	6,67 mg NADPH i 0,5M pufer PBS s 0,25 M EDTA do 10 mL
<b>Mješavina GR</b>	20 µL GR (50 U/mL) u 9980 µL 0,8 mM NADPH
<b>50 mM PBS</b>	Pomiješati 17 mL (1,56 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O u 50 mL dH <sub>2</sub> O) i 183 mL (5,678 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> u 200 mL dH <sub>2</sub> O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
<b>50 mM PBS s 0,1 mM EDTA</b>	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
<b>Reakcijska otopina A (za SOD)</b>	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)
<b>Otopina B enzima ksantin oksidaze (aktivnost 0,8 U/mL)</b>	40 µL ksantin oksidaze i 960 µL dH <sub>2</sub> O

**Tablica 3.** Popis najvažnijih korištenih uređaja i njihovih proizvođača.

Uređaj	Proizvođač
<b>Ultrazvučni sonifikator Bandelin Sonoplus HD2070</b>	Bandelin, Njemačka
<b>Centrifuga Mikro 200R</b>	Hettich, Njemačka
<b>Spektrofotometar Libro S22</b>	Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo
<b>Spektrofotometar UV-160</b>	Shimadzu, SAD
<b>Čitač mikrotitarske pločice Model 550</b>	Biorad, SAD
<b>Invertni svjetlosni mikroskop</b>	Zeiss Axiovert 25

**Tablica 4.** Popis ostalog korištenog materijala i njihovih proizvođača.

Materijal	Proizvođač
<b>Plastične tube volumena 15 mL (tzv. „falkonice“)</b>	TPP, Švicarska
<b>Mikrotitarske plastične pločice s 96 bunarića</b>	Sarstedt, Njemačka

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Pokusne životinje

Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada rađen je na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kao pokusne životinje korišteni su miševi soja C57Bl6 u dobi od tri mjeseca. U kavezu je bilo smješteno po šest životinja, a životinje su imale neograničen pristup hrani i vodi. Hranjene su komercijalno dostupnom hranom koja je životinjama bila dostupna ad libitum. Životinje su držane u uvjetima 12 sati svjetla i 12 sati tame pri sobnoj temperaturi od 22°C i vlažnosti od 60%. Hrana kojom su miševi hranjeni je standardna hrana za miševe i štakore 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik 12 mm), a sadrži pšenicu, kukuruz, soju, riblji ekstrakt, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sojino ulje, kvasac i ljuske lješnjaka.

Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja, NN 102/2017) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

### 3.2.2. Izlaganje miševa valproatu

Pokus je proveden na odraslim C57Bl6 miševima oba spola. Tijekom 15 dana pokusnog tretmana, svakodnevno se oralno gastričkom kanilom apliciralo istraživane kemikalije. Životinje su bile raspoređene u tretmanske grupe (N=6 životinja po skupini)

1. Skupina – kontrola (0,2 ml fiziološke otopine po životinji)
2. Skupina – tretirana terapijskom dozom valproata (400 mg/kg tjelesne težine životinje)

Nakon pokusa životinjama smo izolirali i homogenizirali bubreg i jetru te priredili u obliku homogenata tkiva ultrazvučnom sonikacijom.

### 3.2.3. Stanična kultura

Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada koji se odnosi na uzgajane stanične linije napravljen je na Zavodu za animalnu fiziologiju na Prirodoslovno matematičkom fakultetu, Zagreb. U istraživanjima su korištene stanične linije CHO (engl. *Chinese Hamster Ovary*), PK-15 (engl. *Porcine Kidney-15*) i HEPG2 (engl. *Liver Hepatocellular Carcinoma*). Stanice su uzgajane u uvjetima in vitro, CHO u hranjivom mediju DMEM/F12 s dodatkom 10% seruma goveđeg fetusa (engl. *Foetal Bovine Serum*, FBS), PK-15 u hranjivom mediju RPMI s dodatkom 10% FBS-a i HEPG2 u hranjivom mediju EMEM s dodatkom 10% FBS-a. Stanice su rasle u sterilnim staklenim Petrijevim zdjelicama promjera 100 mm te održavane u kulturi redovitim presađivanjem nakon odvajanja od podloge pomoću otopine 0,05% tripsina s dodatkom 0,02% EDTA. Nakon odvajanja od podloge stanice su brojane u 0,03%-tnoj otopini tripanskog modrila koje mrtve stanice boji u plavo. Za brojanje živih stanica korištena je Bürker-Türkova komorica te invertni svjetlosni mikroskop. Za ovaj pokus nasadeno je  $1 \cdot 10^5$  stanica na pločice za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Stanice su rasle u inkubatoru pri 37°C i 5% CO. Popis proizvođača navedenih kemikalija nalazi se u tablici 1.

### 3.2.4. Tretman stanica

Zbog povezanosti razine valproata i oksidativnog stresa stanice su tretirane različitim koncentracijama valproata. Stanice su tretirane 24h nakon presađivanja. Pokus smo proveli na kulturama stanica CHO (ovarij), PK15 (bubreg) i HEPG2 (jetra). Stanice su tretirane jedan dan

istraživanim kemikalijama u različitim koncentracijama. Kulture stanica su bile raspoređene u tretmanske skupina (N=6/skupini).

1. Skupina – kontrola, nije tretirana
2. Skupina – tretirana s valproatom u koncentracijama od 100 mM, 70 mM, 50mM, 20mM i 10mM

Nakon tretmana uzorci centrifugiranih stanica su se homogenizirali ultrazvučnom sonikacijom.

U homogenatima stanica iz kulture i homogenatima tkiva iz *in vivo* pokusa usporedili smo učinak valproata na povećanu proizvodnju kisikovih radikala i lipidnu peroksidaciju (mjerenjem koncentracije malondialdehida MDA), te aktivira li sustav antioksidacijske obrane (mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze SOD, katalaze CAT i koncentracije ukupnog reduciranog glutationa GSH).

### 3.2.5. Određivanje proteina metodom po Lowryju

Količina proteina u tkivima određena je metodom po Lowryju (1951). Ova metoda kombinira biuretsku reakciju te oksidaciju aromatskih bočnih ogranaka. Biuretska reakcija temelji se na redukciji bakra u reakciji s peptidnom vezom u lužnatim uvjetima. Mehanizam reakcije u kojoj dolazi do oksidacije aromatskih bočnih ogranaka je nepoznat, ali pri tome se reducira Folin reagens.

Metodom po Lowryju određeni su proteini u stanicama jetre, bubrega i ovarija. Korišteni su originalni uzorci, bez razrjeđivanja. U epruvete je dodano po 100  $\mu$ L originalnog uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 2) i inkubirano je 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodano je 200  $\mu$ L otopine E (Tablica 2) nakon čega se snažno vorteksira i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi. Količina proteina određena je na spektrofotometru mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard upotrijebljen je albumin goveđeg seruma (eng. *Bovine serum albumin*, BSA) u koncentracijama od 2 mg/mL prema manjim koncentracijama. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentracije BSA određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracije proteina u uzorcima. Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL. Popis proizvođača navedenih kemikalija nalazi se u tablici 1.

### 3.2.6. Mjerenje lipidne peroksidacije

Količina lipidne peroksidacije određivana je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. 2008. U metodi se mjeri koncentracija malonildialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Temelji se na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom i pri čemu se stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.

U eppendorfericu je dodano 100  $\mu\text{L}$  8,1%-tni SDS, 750  $\mu\text{L}$  20%-tne octene kiseline (pH=3,5), 750  $\mu\text{L}$  0,8%-tne TBA (pripremljeni kao što je prikazano u Tablici 2) i 100  $\mu\text{L}$  homogenog uzorka. Otopina je zatim stavljena u vodenu kupelj na 100 °C na 60 minuta. Nakon toga je naglo ohlađena na ledu i zatim centrifugirana 15 min na 5000 rpm pri 4–6 °C. Supernatant je odvojen i izmjerena je apsorbancija pri 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izražena je kao nmol MDA po mg proteina. Popis proizvođača navedenih kemikalija nalazi se u tablici 1.

### 3.2.7. Količina ukupnog glutationa (GSH)

Koncentracija ukupnog glutationa u jetri, bubregu i ovarijima miševa određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) koja se može fotometrijski očitati na 412 nm. Osim TNB, stvara se i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanak TNB proporcionalna je reciklirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Koncentracija ukupnog GSH mjeri se u mikrotitarskoj pločici. U jednu jažicu dodaje se 20  $\mu\text{L}$  uzorka, 40  $\mu\text{L}$  0,035 M HCl i 40  $\mu\text{L}$  10 mM DTNB te se mjeri apsorbancija na valnoj duljini od 415 nm. Zatim se dodaje 100  $\mu\text{L}$  otopina GR i NADPH i mjeri se apsorbancija tijekom 5 min. Priprema navedenih otopina prikazana je u Tablici 2. Kao slijepa proba korišten je PBS u reakcijskoj smjesi. Za standard korištene su koncentracije reduciranog GSH (5-100  $\mu\text{M}$ ). Nacrtni su pravci za sve standarde kao promjena apsorbancije u vremenu. Očitani su nagibi pravaca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema formuli (nagib pravca<sub>uzorak</sub> –



nagib pravca<sub>slijepa proba</sub>)/nagib pravca<sub>standard</sub>. Koncentracija ukupnog GSH prikazuje se kao  $\mu\text{g}$  GSH po mg proteina. Popis proizvođača navedenih kemikalija nalazi se u tablici 1.

### 3.2.8. Mjerenje enzimske aktivnosti SOD

Aktivnost SOD određena je prema metodi po Flohé i sur. (1971). Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

U ovoj metodi korištene su dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 2) te je apsorbancija u spektrofotometru mjerena na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze. U eppendorfericu je stavljeno 1,45 mL otopine A, 25  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O i 20-30  $\mu\text{L}$  XOD (0,8 U/mL) (Tablica 2). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja reakcijska smjesa prelivena je u kivetu i mjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost XOD mora biti oko 0,025 U/min. Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, analizirani su uzorci. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH<sub>2</sub>O dodano je 25  $\mu\text{L}$  uzorka te odgovarajući volumen XOD i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Enzimska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti XOD te izražena kao  $\%_{\text{inhibicije}} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{slijepa proba}}) * 100$ . Popis proizvođača navedenih kemikalija nalazi se u tablici 1.

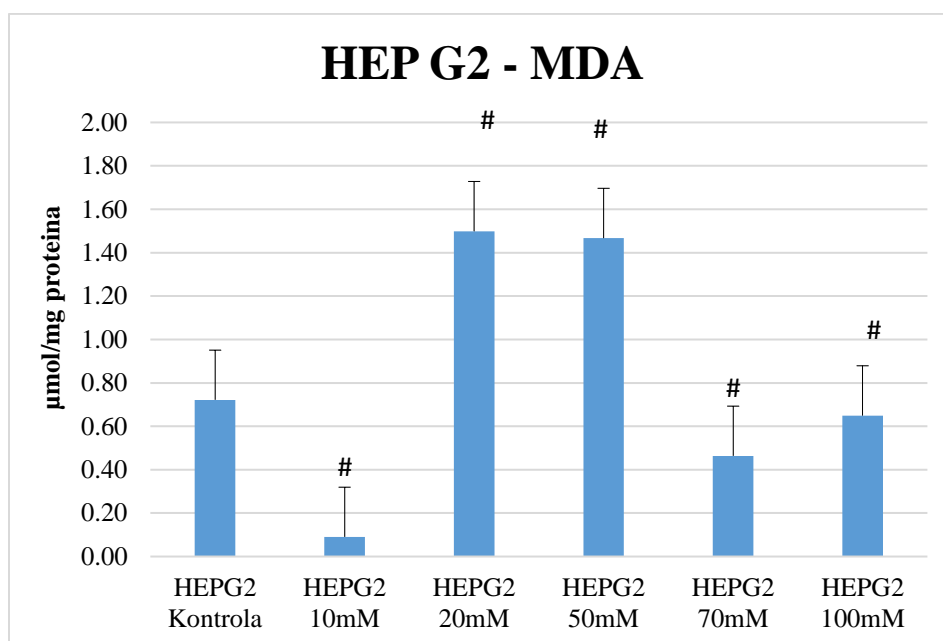
### 3.2.9. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je Studentov t-test, kojim su utvrđene razlike pojedine skupine s obzirom na tretman valproatom u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu. Analiza je provedena upotrebom programskog paketa Statistica 8 (Tulsa, USA). Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ . Rezultati analize stanica prikazani su kao srednja vrijednost od najmanje pet replika  $\pm$  SD nakon što je utvrđeno da nema statistički bitnih razlika između pojedinih replika. Dobivene p-vrijednosti navedene su ispod grafova ili u tablicama. Rezultati koji se statistički razlikuju na grafovima i u tablicama označeni su s #.

## 4. REZULTATI

### 4.1. HEPG2 stanice MDA

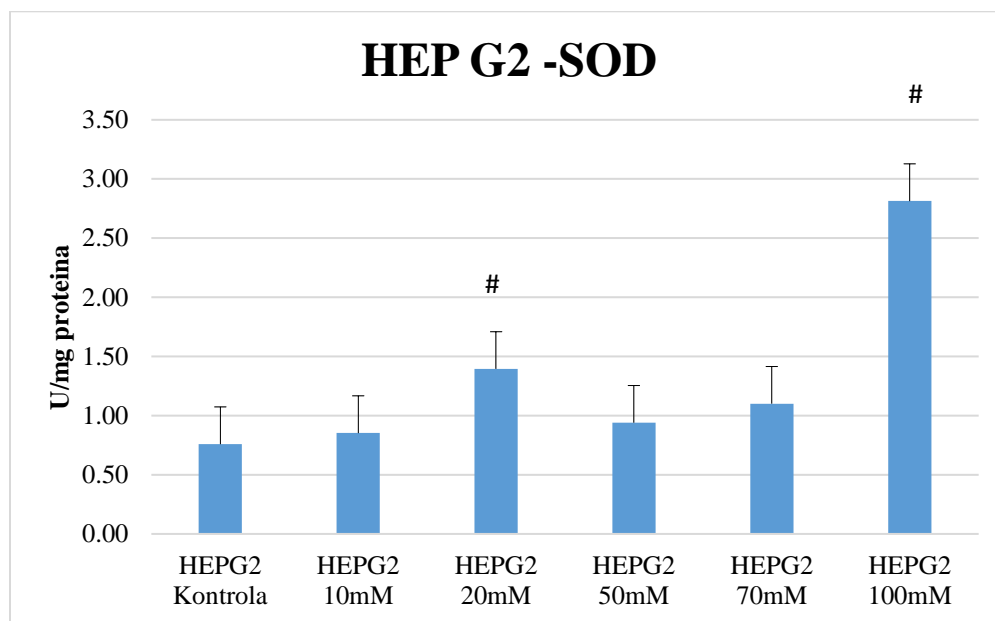
Stanice HEPG2 miševa tretirane različitim koncentracijama valproata (Slika 5) tijekom 24 sata pokazuju statistički značajnu promjenu ukupne koncentracije malonilaldehida (MDA) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica. Pri tretmanu stanica u koncentracijama valproata 10mM, 70mM i 100mM zabilježen je statistički značajan pad ukupnog MDA u odnosu na kontrolu, dok je pri tretmanu stanica u koncentracijama valproata 20mM i 50mM zabilježen statistički značajan porast ukupnog MDA u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.



**Slika 5** Utjecaj valproata na količinu peroksidacije dobivena mjerenjem koncentracije malonilaldehida (MDA) u stanicama HEPG2 miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

#### 4.2. HEPG2 stanice SOD

Stanice HEPG2 miševa tretirane koncentracijama valproata 20mM i 100mM (Slika 6) tijekom 24 sata pokazuju statistički značajan porast aktivnosti sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica. Pri tretmanu stanica u koncentracijama valproata 10mM, 50mM i 70mM nije zabilježena statistički značajna promjena aktivnosti antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem superoksid dismutaze (SOD) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.



**Slika 6** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u HEPG2 stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

#### 4.3. HEPG2 stanice CAT

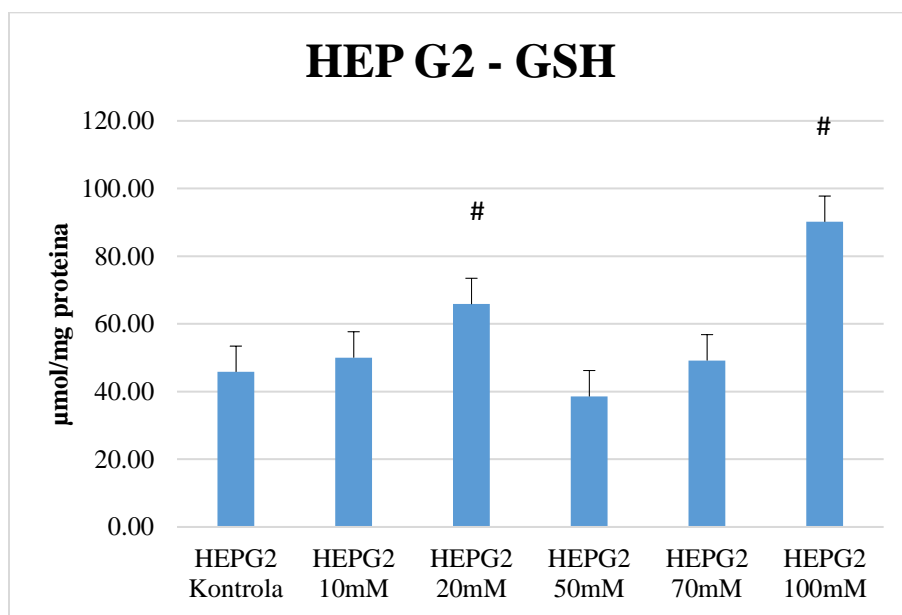
Na stanicama HEPG2 miševa koje su tretirane valproatom u koncentracijama 10mM, 20mM, 50mM, 70mM i 100mM mjerenje aktivnosti katalaze (CAT) nije uspjelo.

#### 4.4. HEPG2 stanice GSH

Ovisno o koncentraciji valproata kojom su stanice HEPG2 miševa tretirane, stanice pokazuju statistički značajan porast razine reduciranog oblika glutaciona (GSH) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.

Takav porast razine GSH zabilježen je u tretmanu stanica valproatom u koncentracijama 20mM i 100mM (Slika 8).

Pri koncentracijama valproata 10mM, 50mM i 70mM stanice ne pokazuju statistički značajnu promjenu razine reduciranog oblika glutaciona (GSH) u HEPG2 stanicama miševa u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.

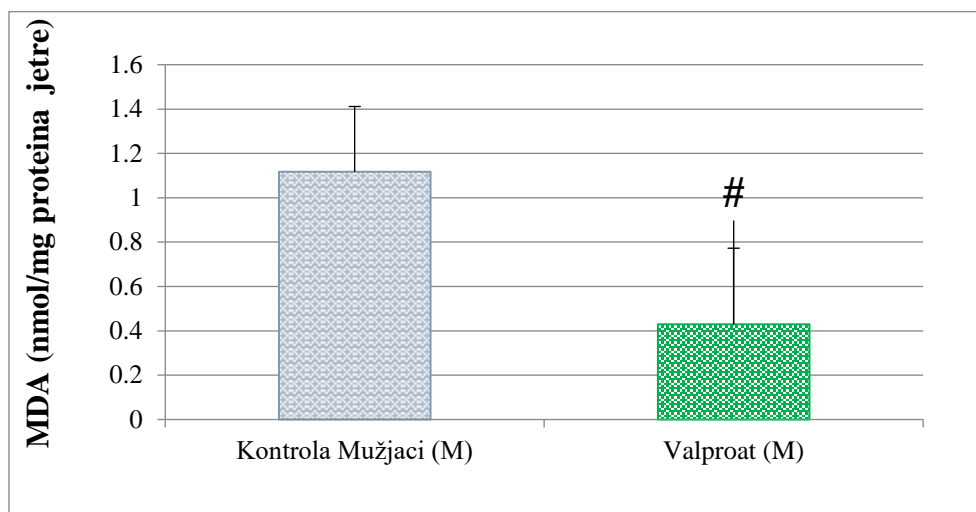


**Slika 8** Utjecaj valproata na razinu reduciranog oblika glutaciona (GSH) u HEPG2 stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

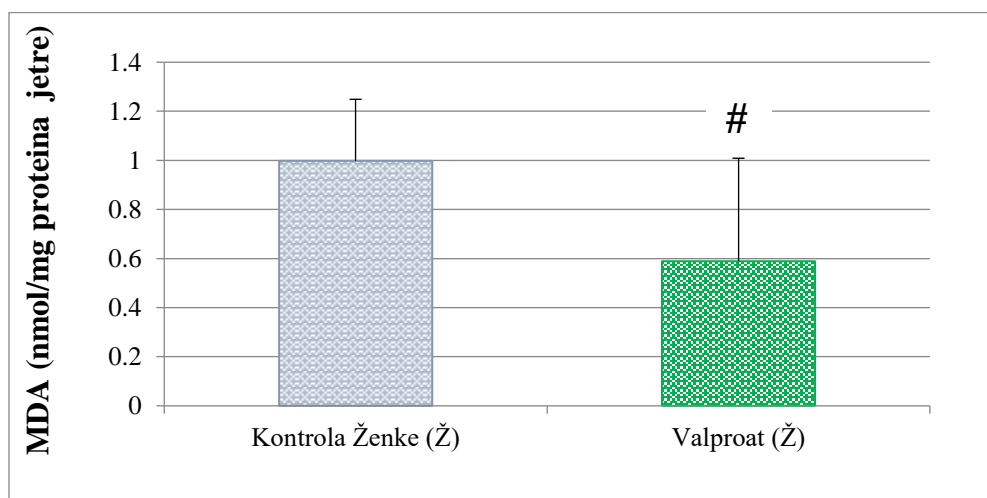
#### 4.5. Jetra MDA

Mužjaci miševa tretirani valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 9) tijekom 15 dana pokazuju statistički značajan pad ukupnog MDA u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.

Ženke miševa tretirane valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 10) tijekom 15 dana pokazuju statistički značajan pad ukupnog MDA u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



**Slika 9** Utjecaj valproata na količinu peroksidacije dobivena mjerenjem koncentracije malonil-aldehida (MDA) u jetri mužjaka miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

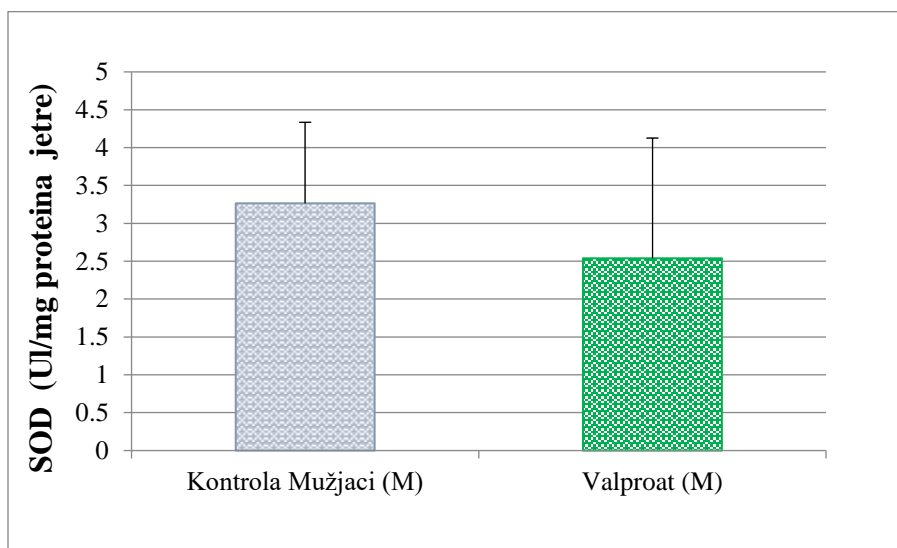


**Slika 10** Utjecaj valproata na količinu peroksidacije dobivena mjerenjem koncentracije malonil-aldehida (MDA) u jetri ženki miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

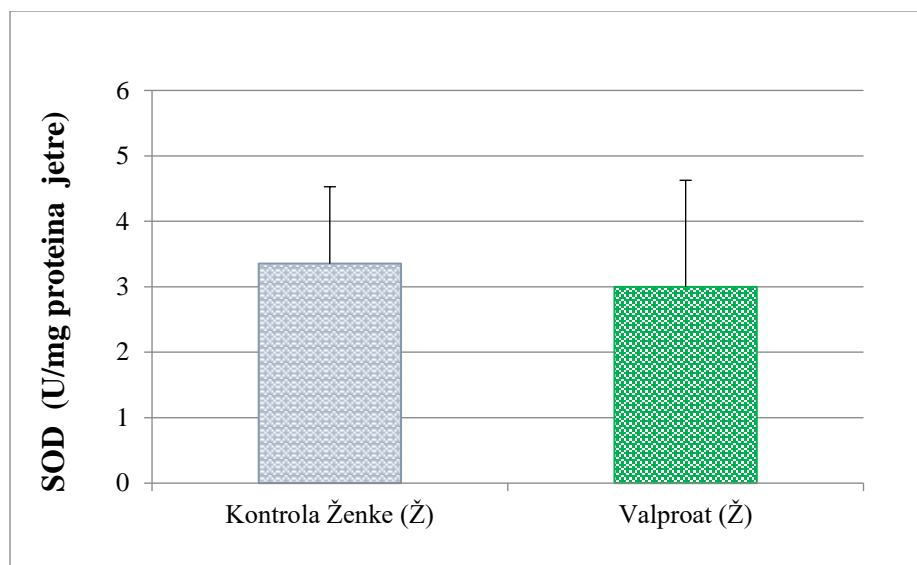
#### 4.6. Jetra SOD

Mužjaci miševa tretirani valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 11) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.

Ženke miševa tretirane valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 12) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



**Slika 11** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u jetri mužjaka miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

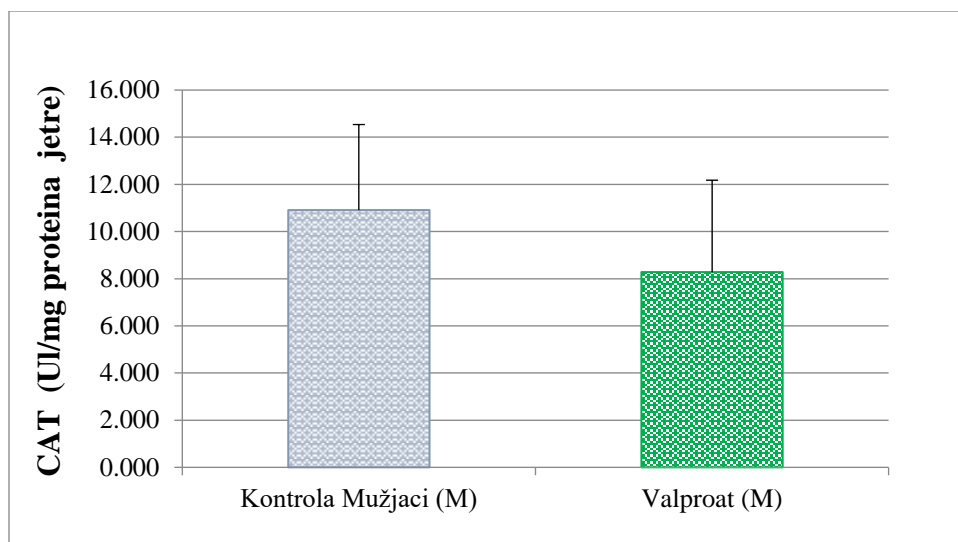


**Slika 12** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u jetri ženki miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

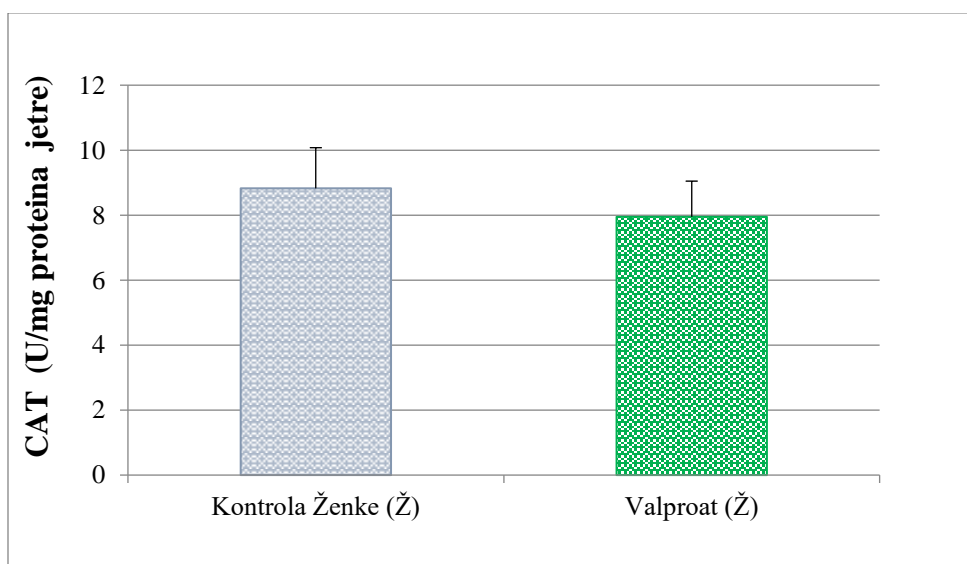
#### 4.7. Jetra CAT

Mušjaci miševa tretirani valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 13) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti katalaze (CAT) u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.

Ženke miševa tretirane valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 14) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti katalaze (CAT) u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



**Slika 13** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti katalaze (CAT) u jetri mužjaka miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa



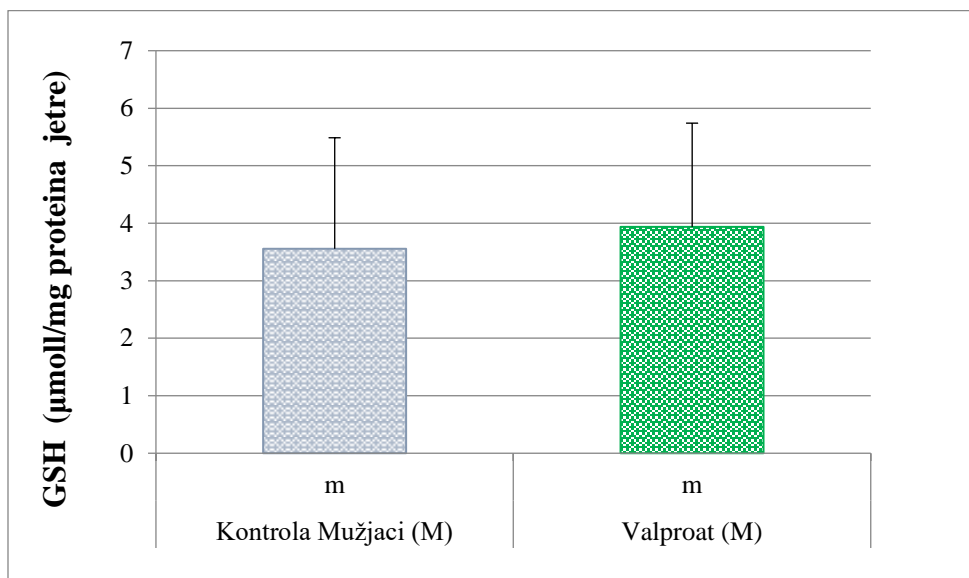
**Slika 14** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti katalaze (CAT) u jetri ženki miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

#### 4.8. Jetra GSH

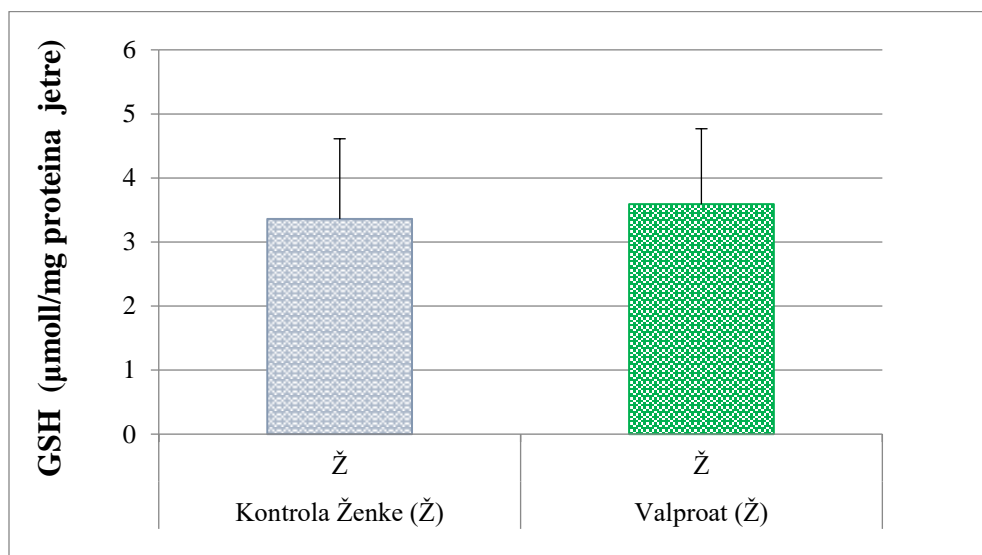
Mušjaci miševa tretirani valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 15) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu razine reduciranog oblika glutaciona (GSH) u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



Ženke miševa tretirane valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 16) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu razine reduciranog oblika glutationa (GSH) u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



**Slika 15** Utjecaj valproata na razinu reduciranog oblika glutationa (GSH) u jetri mužjaka miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

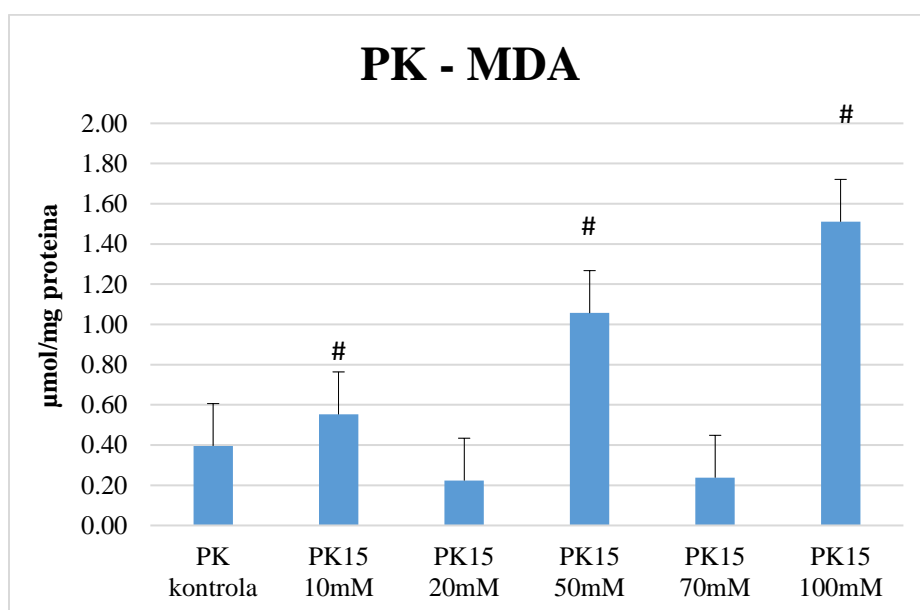


**Slika 16** Utjecaj valproata na razinu reduciranog oblika glutationa (GSH) u jetri ženki miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

#### 4.9. PK stanice MDA

Stanice PK miševa tretirane različitim koncentracijama valproata (Slika 17) tijekom 24 sata pokazuju statistički značajnu promjenu ukupne koncentracije malonilaldehida (MDA) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.

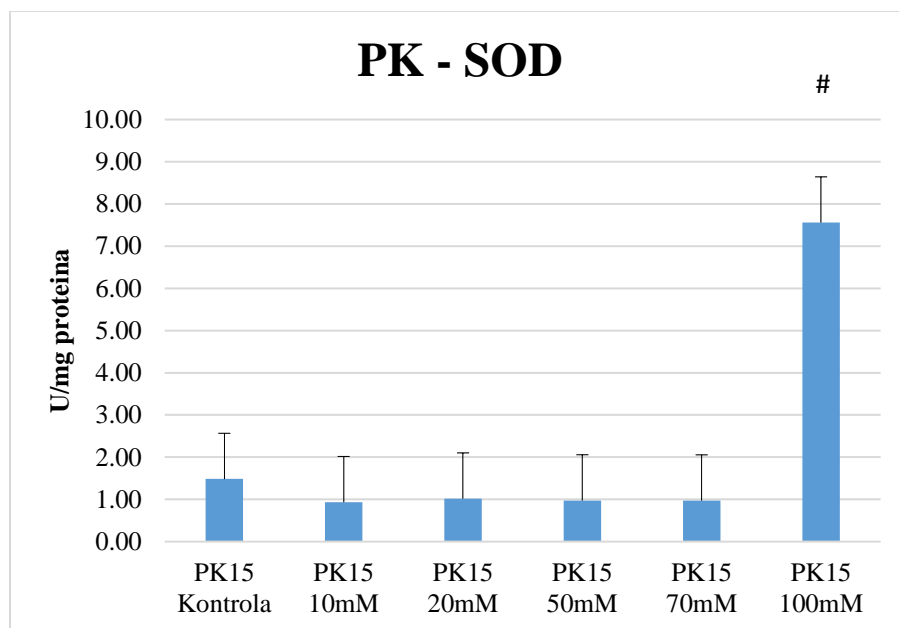
Pri tretmanu stanica u koncentraciji valproata 10mM, 50mM i 100mM zabilježen je statistički značajan porast ukupnog MDA u odnosu na kontrolu, dok pri tretmanu stanica u koncentracijama valproata 20mM i 70mM nije zabilježena statistički značajna promjena ukupnog MDA u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.



**Slika 17** Utjecaj valproata na količinu peroksidacije dobivena mjerenjem koncentracije malonilaldehida (MDA) u stanicama PK miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

#### 4.10. PK stanice SOD

Stanice PK miševa tretirane koncentracijama valproata 10mM, 20mM, 50mM i 70mM (Slika 18) tijekom 24 sata ne pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica. Pri tretmanu stanica u koncentraciji valproata 100mM zabilježen je statistički značajan porast aktivnosti antioksidacijske obrane dobivene mjerenjem superoksid dismutaze (SOD) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.

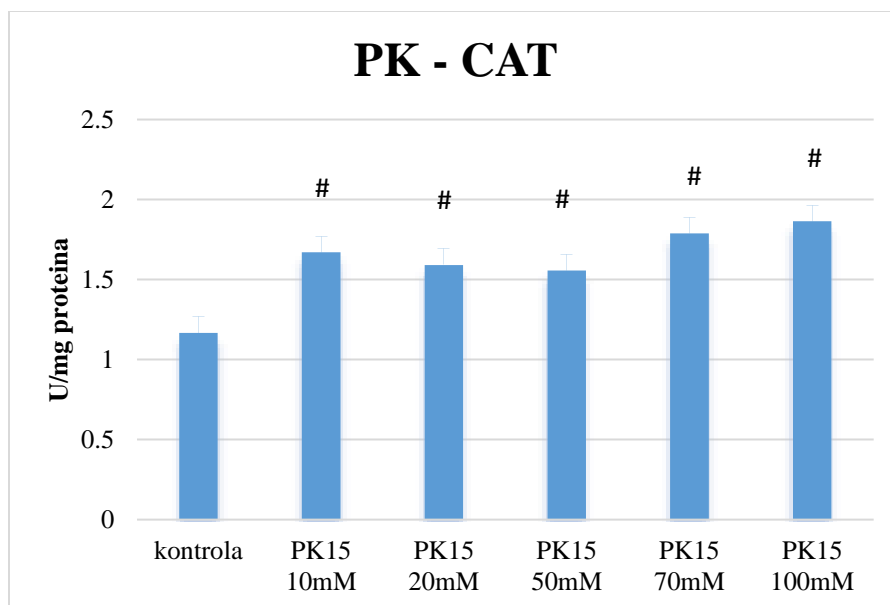


**Slika 18** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u PK stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

#### 4.11. PK stanice CAT

Stanice PK miševa tretirane u različitim koncentracijama valproata (Slika 19) tijekom 24 sata pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti katalaze (CAT) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.

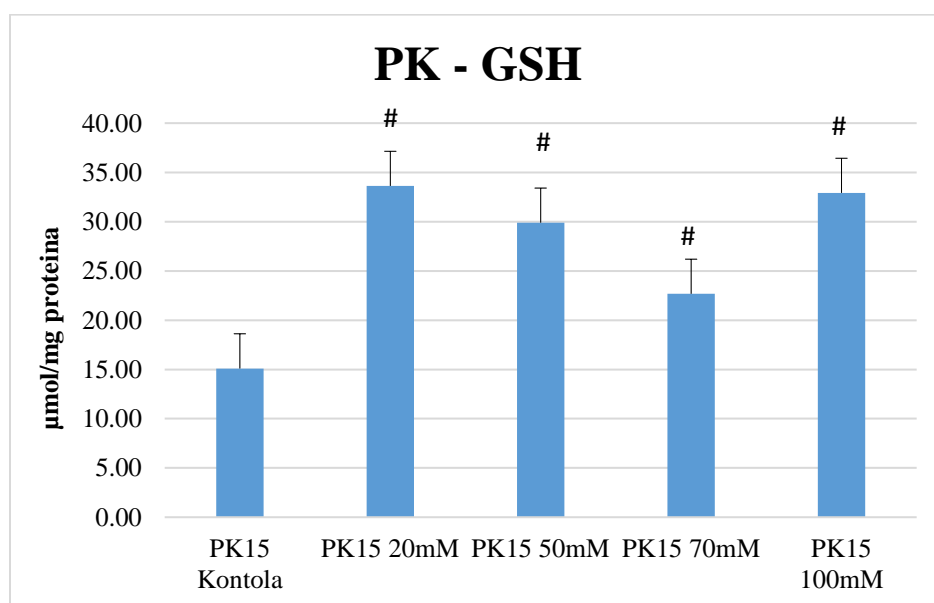
Pri tretmanu stanica u koncentracijama valproata 10mM, 20mM, 50mM, 70mM i 100mM zabilježen je statistički značajan porast aktivnosti antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem katalaze (CAT) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.



**Slika 19** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti katalaze (CAT) u PK stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

#### 4.12. PK stanice GSH

Stanice PK miševa tretirane su valproatom u koncentracijama 10mM, 20mM, 50mM, 70mM i 100mM te pri svakoj od primijenjenih koncentracija pokazuju statistički značajan porast razine reduciranog oblika glutationa (GSH) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.

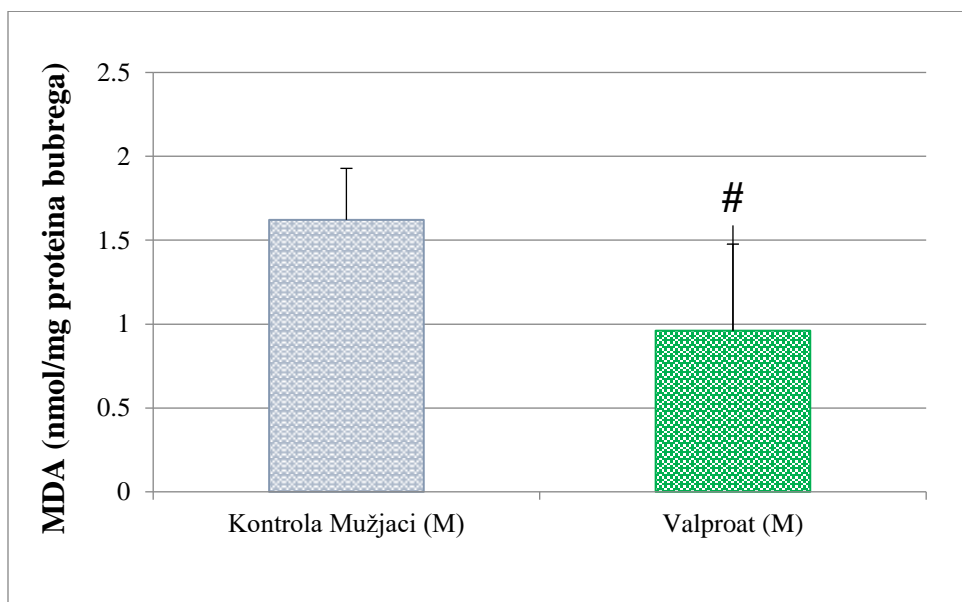


**Slika 20** Utjecaj valproata na razinu GSH u PK stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

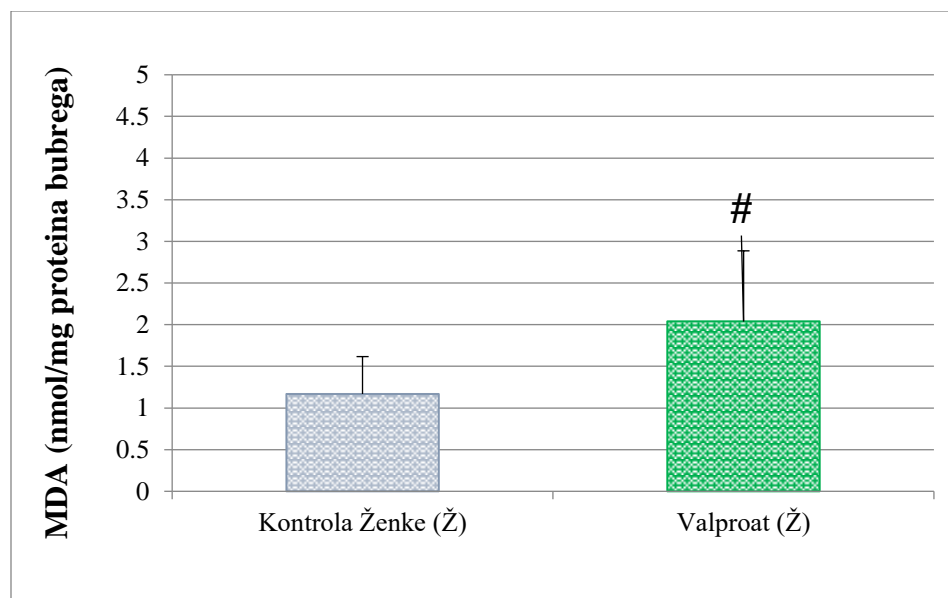
#### 4.13. BUBREG MDA

Mušjaci miševa tretirani valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 21) tijekom 15 dana pokazuju statistički značajan pad ukupnog MDA u bubregu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.

Ženke miševa tretirane valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 22) tijekom 15 dana pokazuju statistički značajan porast ukupnog MDA u buregu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



**Slika 21** Utjecaj valproata na količinu peroksidacije dobivena mjerenjem koncentracije malonil-aldehida (MDA) u bubregu mužjaka miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

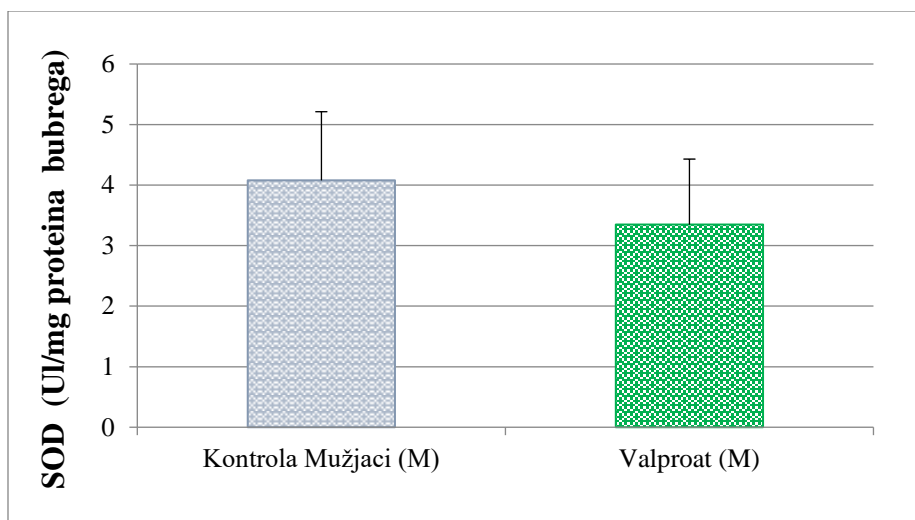


**Slika 22** Utjecaj valproata na količinu peroksidacije dobivena mjerenjem koncentracije malonilaldehida (MDA) u bubregu ženki miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

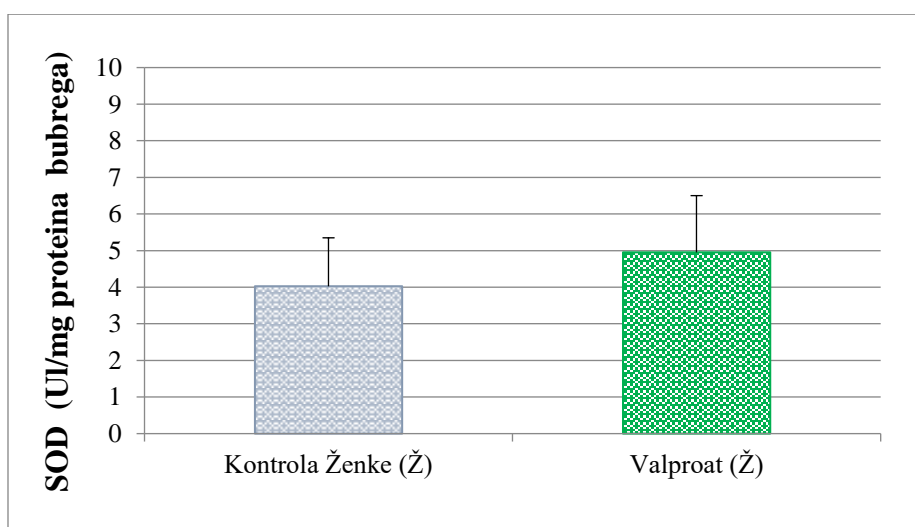
#### 4.14. BUBREG SOD

Mušjaci miševa tretirani valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 23) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u bubregu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.

Ženke miševa tretirane valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 24) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u bubregu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



**Slika 23** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u bubregu mužjaka miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

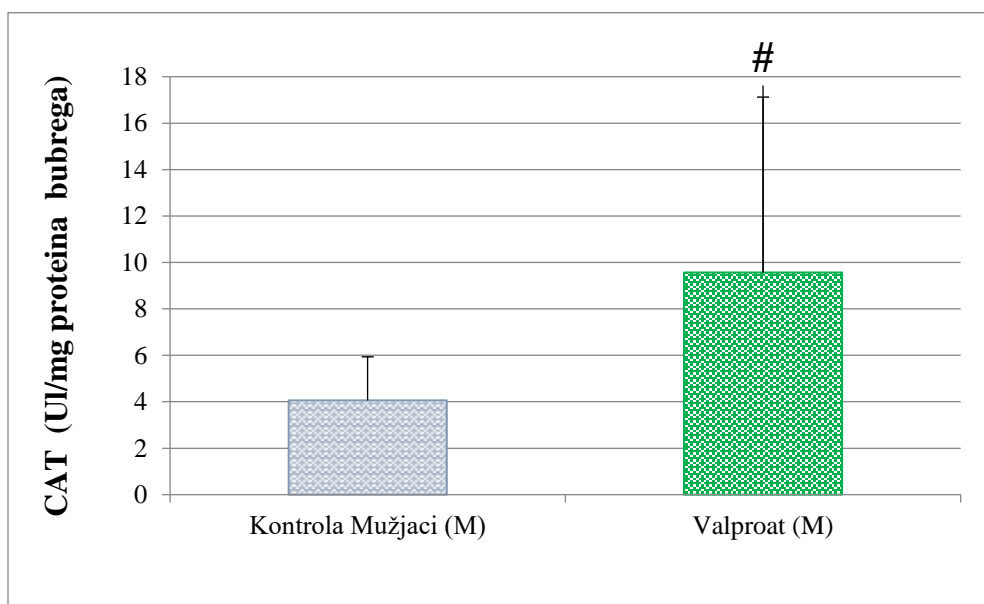


**Slika 24** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u bubregu ženki miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

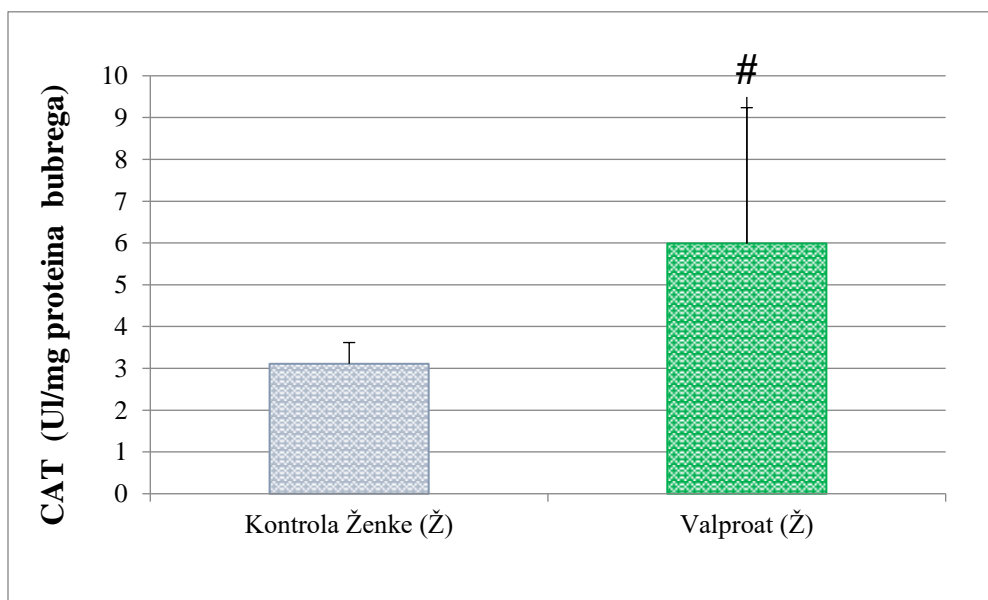
#### 4.15. BUBREG CAT

Mušjaci miševa tretirani valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 25) tijekom 15 dana pokazuju statistički značajan porast aktivnosti katalaze (CAT) u bubregu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa. Ženke miševa tretirane valproatom u terapijskoj

dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 26) tijekom 15 dana pokazuju statistički značajan porast aktivnosti katalaze (CAT) u bubregu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



**Slika 25** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti katalaze (CAT) u bubregu mužjaka miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

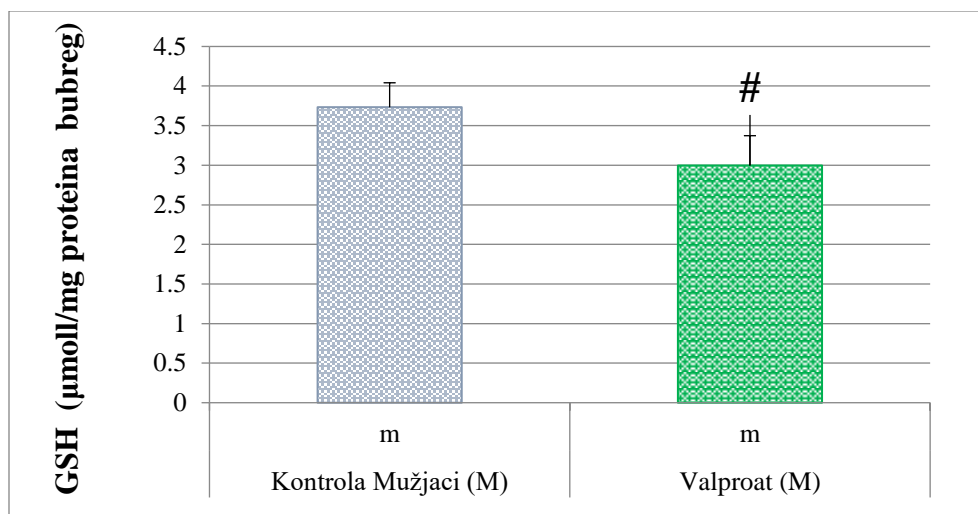


**Slika 26** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti katalaze (CAT) u bubregu ženki miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

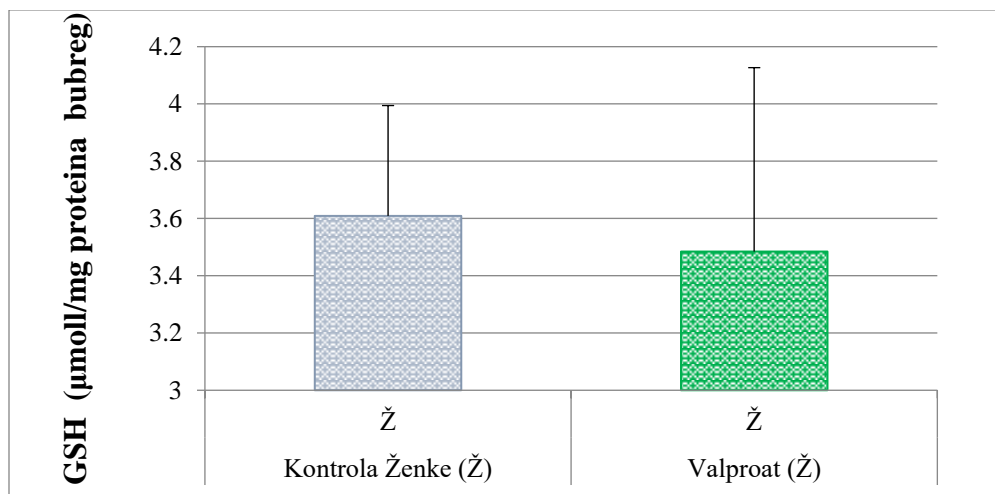


#### 4.16. BUBREG GSH

Mušjaci miševa tretirani valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 27) tijekom 15 dana pokazuju statistički značajan pad razine reduciranog oblika glutaciona (GSH) u bubregu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa. Ženke miševa tretirane valproatom u terapijskoj dozi 400 mg/kg tjelesne težine životinje (Slika 28) tijekom 15 dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu razine reduciranog oblika glutaciona (GSH) u bubregu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.



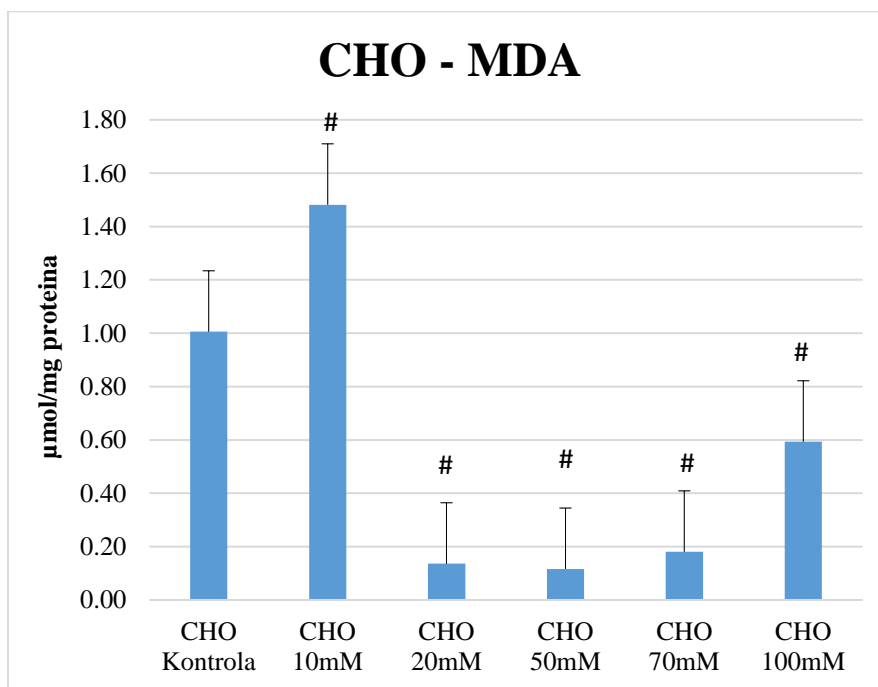
**Slika 27** Utjecaj valproata na razinu GSH u bubregu mužjaka miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa



**Slika 28** Utjecaj valproata na razinu GSH u bubregu ženki miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa

#### 4.17. CHO stanice MDA

Stanice CHO miševa tretirane koncentracijama valproata 10mM, 20mM, 50mM, 70mM i 100mM (Slika 29) tijekom 24 sata pokazuju statistički značajnu promjenu ukupne koncentracije malonil aldehida (MDA) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica. Pri tretmanu stanica u koncentraciji valproata 10mM zabilježen je statistički značajan porast ukupnog MDA u odnosu na kontrolu, dok je pri tretmanu stanica u koncentracijama valproata 20mM, 50mM, 70mM i 100mM zabilježen statistički značajan pad ukupnog MDA u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.

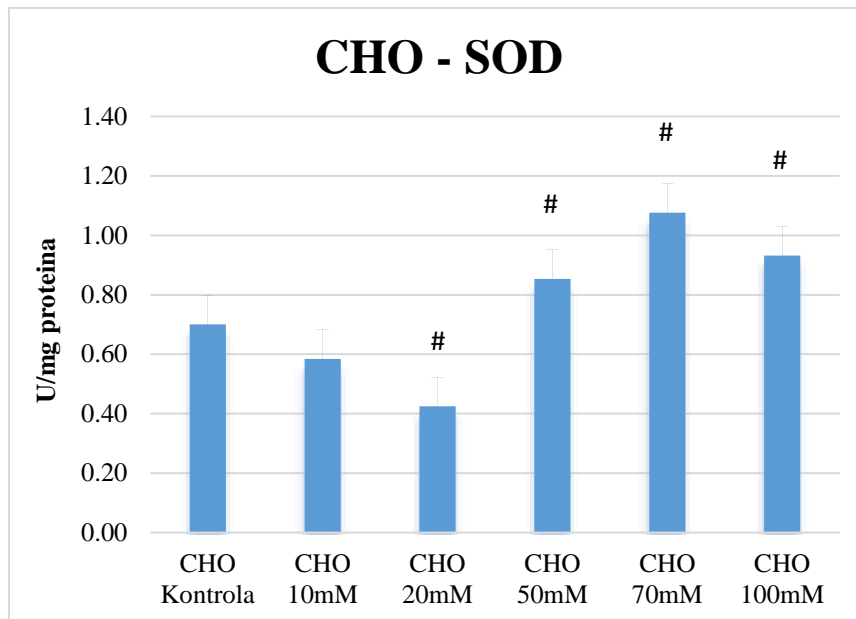


**Slika 29** Utjecaj valproata na količinu peroksidacije dobivena mjerenjem koncentracije malonil-aldehida (MDA) u CHO stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

#### 4.18. CHO stanice SOD

Stanice CHO miševa tretirane koncentracijama valproata 20mM, 50mM, 70mM i 100mM (Slika 30) tijekom 24 sata pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica i to značajan porast aktivnosti SOD pri koncentracijama valproata 50mM, 70mM i 100mM, a značajan pad aktivnosti SOD pri koncentraciji valproata 20mM. Pri

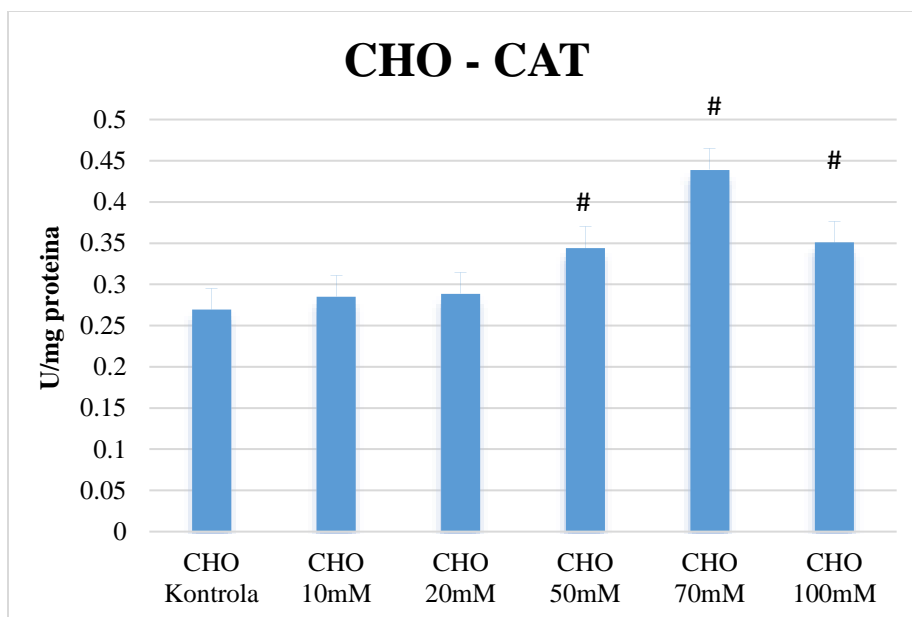
tretmanu stanica u koncentracijama valproata 10mM nije zabilježena statistički značajna promjena aktivnosti antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem superoksid dismutaze (SOD) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.



**Slika 30** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u CHO stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

#### 4.19. CHO stanice CAT

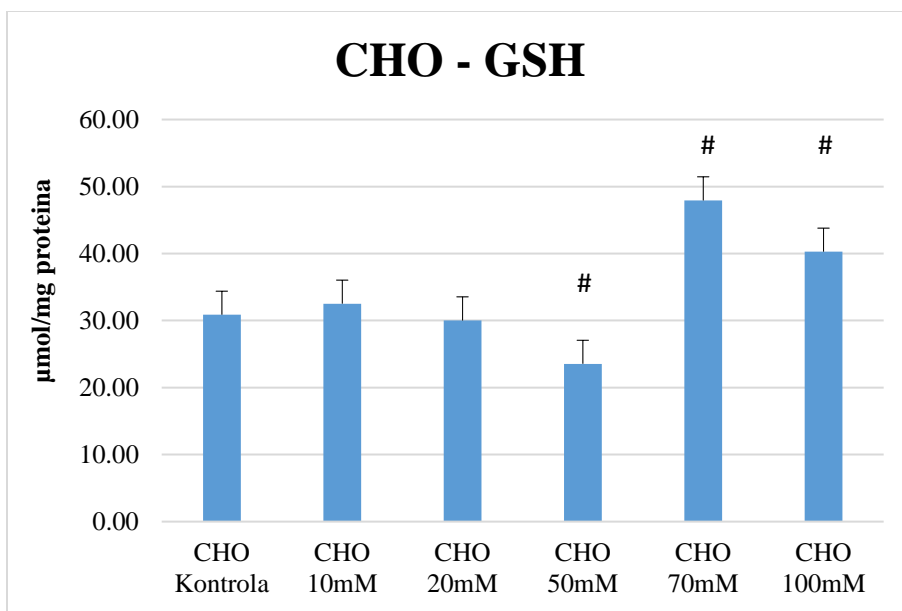
Stanice CHO miševa pri tretmanu stanica u koncentracijama valproata 50mM, 70mM i 100mM pokazuju statistički značajan porast aktivnosti antioksidacijske obrane dobivene mjerenjem katalaze (CAT) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica. Pri koncentracijama valproata 10mM i 20mM CHO stanice miševa ne pokazuju statistički značajnu promjenu aktivnosti antioksidacijske obrane dobivene mjerenjem katalaze (CAT) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.



**Slika 31** Utjecaj valproata na aktivnost sustava antioksidacijske obrane dobivena mjerenjem aktivnosti katalaze (CAT) u CHO stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

#### 4.20. CHO stanice GSH

Stanice CHO miševa tretirane koncentracijama valproata (Slika 32) 10mM i 20mM ne pokazuju statistički značajne promjene razine reduciranog oblika glutationa (GSH) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica. Pri koncentracijama valproata 50mM stanice pokazuju statistički značajan pad razine GSH u odnosu na kontrolnu skupinu stanica, a pri koncentracijama valproata 70mM i 100mM stanice pokazuju statistički značajan porast razine GSH u odnosu na kontrolnu skupinu stanica.



**Slika 32** Utjecaj valproata na razinu reduciranog oblika glutationa (GSH) u CHO stanicama miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica

## 5. RASPRAVA

Rezultati ukazuju da u jetri mužjaka i ženki valproat uzrokuje smanjenu koncentraciju MDA odnosno manju lipidnu peroksidaciju u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine.

Slično je zabilježeno i u staničnom modelu, pri čemu jetrene stanice HEPG2 reagiraju sa smanjenom lipidnom peroksidacijom nakon 24 satnog tretmana s koncentracijama od 10, 70 i 100 mM valproata u staničnoj kulturi. Suprotno tome pri tretmanu s koncentracijama 20 i 50 mM valproata u staničnoj kulturi reagiraju povećanom lipidnom peroksidacijom.

Aktivnost izmjerenih parametara antioksidativne obrane (aktivnost superoksid dismutaze, katalaze i glutaciona) nije bila promijenjena u jetri niti kod jednog spola u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. Aktivnost SOD-a i u staničnom modelu jetrenih stanica HEPG2 uglavnom nije bila promijenjena u većini apliciranih koncentracija, osim pri najvećoj apliciranoj dozi od 100 mM valproata (kroz 24 sata) u kulturi, a iznimno blagi porast aktivnosti zabilježen je u HEPG2 stanica tretiranih s 20 mM valproata. Sličan trend je zabilježen i u koncentraciji GSH gdje je najveći porast razine glutaciona zabilježen u tretmanu stanica dozama od 20 i 100 mM valproata.

Generalno, trend promjene glavnih antioksidacijskih sustava obrane (SOD, CAT i GSH), ne možemo sa sigurnošću reći da je *in vivo* model jetrenih stanica odgovarajući model za promjene *in vivo*.

Slično našem istraživanju, Seçkin i sur. (1999) su proučavali promjene razine glutaciona i lipid peroksida kao i aktivnosti superoksid dismutaze, glutation peroksidaze, katalaze i glutation-S-transferaze u štakorima nakon akutnog i kroničnog liječenja natrij valproatom. Razine glutaciona su se smanjile tek nakon akutnog liječenja natrij valproatom. Ni akutno ni kronično liječenje nije utjecalo na lipidnu peroksidaciju, ali značajno je induciralo aktivnost glutation-S-transferaze. S druge strane, nije bilo promjena u aktivnosti glutation peroksidaze i superoksid dismutaze, osim lagane indukcije aktivnosti katalaze nakon akutne primjene natrij valproata.

Nisu svi eksperimenti uzrokovali smanjenje oksidativnog stresa. Natarajan i sur. (2006) su kroz svoju studiju promatrali oksidacijski stres u peroksisomima i mikrosomima jetre s mikrovaskularnom steatozom koristeći životinjski model bolesti. Štakori su i. p. tretirani injekcijom natrij valproata (700 mg/kg životinje) kako bi se izazvala mikrovezikularna steatoza što je potvrđeno histološki. Oksidacijski stres bio je vidljiv u jetri u steatozi, popraćen

strukturnim i funkcionalnim promjenama u mitohondrijima jetre. Vidljive su i promjene u sastavu lipida, sa smanjenim fosfatidil kolinom i etanolaminom i povećanim lizofosfatidil kolinom i etanolaminom. Također je vidljivo i povećanje triglicerida. Pored toga, u peroksisomima i mikrosomima je zabilježeno povećanje peroksidacije. Ovakvi rezultati upućuju na to da je, osim poremećaja u beta-oksidaciji u mitohondrijima, oksidacijski stres vidljiv u peroksisomima i mikrosomima jetre tijekom mikrovezikularne steatoze.

Nadalje, Tong i sur. (2005) su svojim istraživanjem došli do zaključka da je jedna doza valproične kiseline (VPA), koja je široko korišten antiepileptični lijek, povezana s oksidacijskim stresom kod štakora koji se manifestira kao povećanje razine 15-F(2t)-izoprostana. Da bi utvrdili postoji li vremenska povezanost između oksidacijskog stresa izazvanog tretmanom s VPA i hepatotoksičnosti, odrasle mužjake Sprague-Dawley štakore tretirali su i. p. s VPA (500 mg/kg životinje) ili 0,9% fiziološke otopine jednom dnevno 2, 4, 7, 10 ili 14 dana. Oksidacijski stres procijenjen je određivanjem razine 15-F(2t)-IsoP, lipid hidroperoksida i reaktivne tiobarbiturne kiseline (TBAR) u plazmi i jetri. 15-F(2t)-IsoP u plazmi i jetri su nakon dva dana VPA tretmana bili povišeni i dosegli plato u odnosu na kontrolu. Razine LPO u jetri nisu se povećale do sedmog dana tretmana. Razine TBAR u jetri i plazmi nisu se povećale do 14. dana. Toksičnost jetre bila je procijenjena na osnovu razine alfa-glutation S-transferaze (alfa-GST) u serumu i histologijom. Razine alfa-GST u serumu značajno su povišene do 4. dana, što odgovara hepatotoksičnosti kao što pokazuje povećana učestalost upale capsule jetre, nekroza i steatoza kroz cijelu studiju. Razine beta-oksidiranih metabolita VPA u jetri smanjene su do 14. dana, dok razine 4-ene-VPA i (E)-2,4-diene-VPA nisu povišene tijekom studije. Sveukupno, ovakvi rezultati ukazuju na to da VPA tretman dovodi do oksidacijskog stresa, mjereno razinom 15-F(2t)-IsoP, što prethodi početku nekroze, steatoze i povećanjem razine alfa-GST u serumu.

Glavne razlike u ovim eksperimentima su nešto veće primjenjivane doze valproata nego u našem pokusu. Postoje i pokusi u kojima je zabilježen i neutralan učinak valproata na lipidnu peroksidaciju. Bykov i sur. (2004) su proučavali aktivaciju lipidne peroksidacije kao mogući mehanizam uključen u oštećenja inducirana valproatom kao i mogućnost slabljenja L-karnitina. Mjerene su razina malonilaldehida (MDA), koncentracija lipid peroksida i aktivnost antioksidanata, aktivnost katalaze, slobodne S-S grupe sadržane u plazmi i homogenati jetre mužjaka albino štakora tretiranih s valproatom i kombinacijom valproata i L-karnitina 8 dana.

Zabilježene su beznačajne razlike u formiranju MDA i aktivnosti katalaze u plazmi i jetri kontrole i skupini koja je tretirana valproatom, međutim aktivnost antioksidanata u plazmi i razina S-S grupa je smanjena u štakora tretiranih valproatom. L-karnitin djelovanje značajno je smanjilo koncentraciju lipid peroksida u jetri i povećalo aktivnost antioksidanata u plazmi i S-S grupe. Rezultati upućuju da lipidna peroksidacija može biti uključena u dodatni mehanizam oštećenja jetre štakora uzrokovanog valproatom. Navedene razlike u odgovoru jetre i njene antioksidacijske obrane mogle bi se pripisati uvjetima eksperimenata (trajanje izloženosti i primjenjivana doza), kao i razlikama u korištenom soju ili vrsti životinja. To samo govori do koje mjere je teško odabrati ispravni model istraživanja koji će u potpunosti prikazati oksidacijski stres zabilježen u pacijenata.

Grosso i sur. (2011), napravili su istraživanje na tri grupe pacijenata. U skupini 1 (N = 34) bili su pacijenti s epileptičnom encefalopatijom. U skupini 2 (N = 31) bili su oni koji su pogođeni idiopatskom epilepsijom te su pritom bili tretirani monoterapijom sa valproičnom kiselinom (VPA). Skupinu 3 (N = 22) predstavljaju zdrave kontrole. Svi pacijenti i zdrava djeca podvrgnuti su vađenju krvi radi procjene redoks statusa mjerenjem razine F2-izoprostana (F2-iso), naprednih produkata oksidacijskih proteina (AOPP), ne-protein vezujućeg željeza (NPBI), tiolea (-SH grupe) i ukupnog hidroperoksida (TH). U usporedbi s kontrolama, pacijenti iz skupine 1 imali su značajno više razine F2-iso, AOPP i TH u plazmi. Nasuprot tome, nije bilo neke bitne razlike u koncentracijama NPBI u plazmi između skupine 1 i kontrole. Nadalje, nema statističke razlike u razinama proteina oksidacijskog stresa u plazmi između bolesnika iz skupine 2 i normalnih ispitanika. Ovo istraživanje pokazalo je da pacijenti s epileptičnom encefalopatijom imaju povećane razine markera oksidacijskog stresa. Nasuprot tome, normalni redoksni status zabilježen je u bolesnika s idiopatskom sindromom epilepsije pod dugotrajnom monoterapijom VPA.

Yiş i sur. (2009), proveli su istraživanje o utjecaju valproata na lipidnu peroksidaciju eritrocita i na razinu antioksidacijskih enzima u bolesnika s novodijagnosticiranom idiopatskom epilepsijom prije liječenja i kod bolesnika s idiopatskom epilepsijom već liječenih valproičnom kiselinom. U studiju je uključeno 24 bolesnika s novodijagnosticiranom idiopatskom epilepsijom, 24 bolesnika liječena valproičnom kiselinom za idiopatsku epilepsiju i 21 zdravo dijete. Malondialdehid kao pokazatelj lipidne peroksidacije i antioksidacijski enzimi koji uključuju superoksid dismutazu i glutation peroksidazu bili su mjereni u eritrocitima. Razine malondialdehida su bile značajno niže, a aktivnost superoksid dismutaze je neznatno viša u



bolesnika s novodijagnosticiranom epilepsijom. Razine glutation peroksidaze nisu se razlikovale među skupinama. Tijekom liječenja s valproičnom kiselinom, lipidna peroksidacija se povećala, ali nije postigla patološku vrijednost. Postojala je pozitivna korelacija između aktivnosti superoksid dismutaze i trajanja tretmana valproičnom kiselinom. U zaključku, oksidans-antioksidans status je smanjen kod bolesnika s primarnom idiopatskom epilepsijom i sustavi se aktiviraju kako bi se smanjila peroksidacija lipida.

U bubregu mužjaka valproat apliciran uzrokuje smanjenje lipidne peroksidacije. Suprotno tome u bubregu ženke valproat uzrokuje značajnu lipidnu peroksidaciju. U PK15 stanicama bubrega u kulturi značajna lipidna peroksidacija zabilježena je pri dozama valproata od 10, 50 i 100 mM tijekom 24 sata izloženosti.

Kod oba spola valproat ne mijenja aktivnost SOD-a, ali jako povećava aktivnost bubrežne katalaze u oba spola. Koncentracija glutationa bila je smanjena samo u bubregu mužjaka, ali ne i ženki. Generalno bi se moglo zaključiti da se u bubregu kao jedinstveni put obrane najviše aktivira katalaza, a takva aktivacija u mužjaka uspješno umanjuje oksidativni stres dok u ženki aktiviranje samo tog puta obrane nije dovoljno da umanjuje oksidativnu peroksidaciju lipida u stanicama bubrega. Usporedimo li literaturne podatke s našim rezultatima nalazimo relativno slične navode. El-Shenawy i Hamza (2016), proveli su pokus u kojem su na bubrežnom tkivu štakora istraživali mogućnost smanjenja štetnih posljedica natrij valproata ako se aplicira zajedno s L-cisteinom. Biokemijskim metodama odredili su markere oksidacijskog stresa poput tiobarbiturne kiseline i aktivnost antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza kao i ukupan antioksidativni kapacitet. Razine kreatinina i mokraćne kiseline u serumu također su određene za procjenu funkcije bubrega. Zaključak istraživanja je pokazao da istovremena primjena L-cisteina s natrij valporatom ima blagotvorni učinak na bubreg i poboljšani su svi gore navedeni parametri. Gezinci-Oktayoglu i sur. (2016), napravili su istraživanje s ciljem ispitivanja učinka vitamina U (S – metilmetionin) na oksidacijski stres, upalu i fibrozu kod štakora s bubrežnim oštećenjima uzrokovanih s VPA. Podaci pokazuju da je VPA promotor upale, oksidacijskog stresa i fibroze koji rezultira oštećenjem bubrega. U ovom istraživanju, ženski Sprague Dawley štakori nasumično su podijeljeni u četiri skupine: skupina I sastojala se od ne tretiranih životinja, skupina II tretirana je vitaminom U (spojem poznatim pod nazivom S-metilmetionin, 50 mg/kg/dan, pomoću gastričke kanile), skupini

III dat je VPA (500 mg/kg/dan, intraperitonealno), a IV skupina je tretirana sa VPA + vit U. Životinje skupine IV su tretirane s vitaminom U jedan sat prije tretmana s VPA svaki dan i tako 15 dana. Sljedeći rezultati su dobiveni u skupini IV: (i) smanjenje histopatoloških promjene bubrega odnosno zaštitni učinak vitamina U i povećanje aktivnosti Na (+) / K (+) – ATPaze; (ii) antioksidacijska svojstva vitamina U pokazala su se smanjenjem razine malondialdehida (MDA) i smanjenjem aktivnost ksantin oksidaze i povećanjem aktivnosti katalaze, superoksid dismutaze i razine glutaciona; (iii) protuupalna svojstva vitamin U je pokazao smanjenjem faktora nekroze tumora- $\alpha$ , interleukina-1 $\beta$ , razine monocitnih hemoatraktanta proteina-1 i aktivnost adenozin deaminaze; (iv) anti-fibrotički učinak vitamina U pokazao je smanjenjem transformirajućeg rasta faktor- $\beta$ , kolagen-1 i aktivnost arginaze. Zajedno, ovi podaci pokazuju da je VPA promotor upale, oksidacijskog stresa i fibroze koji rezultira oštećenjem bubrega. Vitamin U se može predložiti kao potencijalni kandidat sprečavanje oštećenja bubrega nastalih tijekom terapijske uporabe VPA.

Chaudhary i sur. (2015), napravili su in vitro istraživanje na bubrežnom tkivu štakora sa svrhom procjene potencijala nefrotoksičnosti VPA i zaštitnom učinku kvercetina (QR) protiv VPA inducirane nefrotoksičnosti. Indeksi oksidacijskog stresa kao što su lipidna peroksidacija (LPO) i protein karbonil (PC) bili su mjereni. Razine oba markera bile su znatno više nego kod kontrole. Također, došlo je i do značajnog povećanja razine reduciranog glutaciona (GSH) i neproteinskih tiola (NP-SH). Tretman s VPA uzrokovao je promjenu u aktivnosti enzima koji sudjeluju u metabolizmu glutaciona kao što su glutation-S-transferaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza. Prethodna aplikacija s QR može preokrenuti VPA inducirane učinke na bubrežnom tkivu štakora. Na temelju reno-zaštitnog i antioksidacijskog djelovanja QR, Chaudhary i sur. predlažu da se ovaj flavonoid može smatrati kao potencijalno sigurnim i djelotvornim pristupom u smanjenju štetnih učinaka VPA-inducirane nefrotoksičnosti.

Rezultati našeg pokusa na staničnom modelu ovarija (CHO) pokazuju smanjenje lipidne peroksidacije pri tretmanu valproatom u koncentracijama 20, 50, 70 i 100 mM, dok je pri 10 mM koncentraciji valproata zabilježen porast lipidne peroksidacije. Aktivnost antioksidacijskih enzima, superoksid dismutaze i katalaze, porasla je pri apliciranim koncentracijama valproata 50, 70 i 100 mM. Razina glutaciona u ovim stanicama pri apliciranoj koncentraciji valproata 50 mM u padu je u odnosu na kontrolnu skupinu, a pri koncentracijama valproata 70 i 100 mM u porastu.

U PK15 stanicama bubrega u kulturi aktivnost SOD-a je uglavnom nepromijenjena osim u najvećoj apliciranoj dozi od 100 mM tijekom 24 sata izlaganja kulture djelovanju valproata i to povećanje aktivnosti. U PK15 stanicama bubrega u kulturi aktivnost katalaze, slično kao i u *in vivo* istraživanju povećana je u svim apliciranim dozama (10-100 mM) valproata. I koncentracija glutationa u PK15 stanicama bubrega povećana je u svim apliciranim dozama (10-100 Mm) valproata.

Mogli bismo zaključiti da stanični model bubrega u kulturi, s obzirom na trend promjene antioksidacijskih parametara, uglavnom slijedi slične promjene kao i u *in vivo* modelima te se zaključno može reći da je PK stanični model oksidacijskog stresa uzrokovanog valproatom dobra zamjena za *in vivo* mišji model, iako je stanična linija PK15 porijeklom iz bubrega svinje, ali je promjena glavnih antioksidacijskih parametara slična. Kiang i sur. (2010), proveli su istraživanje o tome pridonose li metaboliti VPA *in situ* toksičnosti VPA u hepatocitima štakora. Sveukupno, toksičnost VPA u kulturi hepatocita štakora neovisna je o *in situ* stvaranju oksidativnih metabolita ovisnih o citokromu P450, uključujući i 4-en-VPA. Međutim, podaci dobiveni iz strukturnih analoga VPA upućuju na to da biotransformacija VPA ima ulogu u toksičnosti VPA kod hepatocita štakora. Nadalje, Komulainen i sur. (2015), ispitali su utjecaj VPA na mitohondrijsku aktivnost *in vitro* u HEPG2 stanicama. Rizik od VPA-inducirane hepatotoksičnosti je povećana u bolesnika s mitohondrijskim bolestima i osobito u bolesnika s MUG1 mutacijama. Stanice su inkubirane u mediju s glukozom i u mediju obogaćenom glukozom i piruvatom koji inducira mitohondrijsku respiraciju. Koncentracije VPA u tretmanima su bile od 0-2,0 mM u trajanju od 27-72h. Na oba medija VPA je uzrokovala pad stope potrošnje kisika i membranski potencijal mitohondrija. Izloženost VPA također je uzrokovala smanjenje koncentracije ATP-a u HEPG2 stanicama inkubiranim u galaktozi, sugerirajući disfunkciju u mitohondrijskoj ATP produkciji. Osim toga, izloženost VPA tijekom 72 sata dovodi do povećanja razine reaktivnih kisikovih radikala (ROS) u mitohondriju, ali i smanjenja razine proteina superoksid dismutaze SOD2, sugerirajući stvaranje oksidacijskog stresa uzrokovanog eliminacijom nastalog mitohondrijskog ROS-a i mogući mehanizam vezan uz toksičnost VPA. Rezultati pokazuju da VPA inhibira mitohondrijsko disanje i dovodi do disfunkcije mitohondrija, oksidacijskog stresa i povećane stanične smrti što upućuje na bitnu ulogu u hepatotoksičnosti izazvanu s VPA. Tong i sur. (2005) su ispitali učinak VPA i ulogu GSH u oksidacijskom stresu, membranskom potencijalu mitohondrija i toksičnosti u svježe izoliranim hepatocitima štakora. Hepatociti su izolirani iz Sprague-Dawley štakora, a ukupna

razina glutationa (GSH) smanjena je prethodnim liječenjem pomoću kombinacije L-butionin sulfoksimina i dietilmaletata prije obrade VPA. Izlaganje hepatocita štakora valproičnoj kiselini rezultiralo je vremensko i doza ovisnom povećanju 15-F(2t)-IsoP i DFC fluorescenciji, i ove razine su i dalje povišene u hepatocitima u kojima je reduciran GSH. U kontrolnoj skupini hepatocita, VPA nije imala utjecaj na vijabilnost stanica; međutim, značajna citotoksičnost zabilježena je u hepatocitima osiromašenim glutationom tretiranih s VPA. Takvi nalazi ukazuju na to da akutno liječenje svježe izoliranih hepatocita štakora s VPA rezultira oksidacijskim stresom, koji se javlja u odsutnosti citotoksičnosti te da glutation pruža zaštitu hepatocita pri oštećenju mitohondrija uzrokovanom tretmanom s VPA.

## 6. ZAKLJUČAK

1. U jetri mužjaka i ženki valproat uzrokuje smanjenu koncentraciju MDA odnosno manju lipidnu peroksidaciju u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. Slično je zabilježeno i u staničnom modelu, pri čemu jetrene stanice HEPG2, reagiraju sa smanjenom koncentracijom lipidne peroksidacije nakon 24 satnog tretmana s koncentracijama od 10, 70 i 100 mM valproata u staničnoj kulturi.
2. Aktivnost izmjerenih parametara antioksidacijske obrane (aktivnost SOD-a, katalaze i glutaciona) nije bila promijenjena u jetri niti kod jednog spola u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. Aktivnost SOD-a i u staničnom modelu jetrenih stanica HEPG2 uglavnom nije bila promijenjena u većini apliciranih koncentracija, osim pri najvećoj apliciranoj dozi od 100 mM valproata (kroz 24 sata) u kulturi, a iznimno, blagi porast aktivnosti zabilježen je u HEPG2 stanica tretiranih sa 20 mM valproata. Sličan trend je zabilježen i u koncentraciji GSH gdje je najveći porast razine glutaciona zabilježen u dozama od 20 i 100 mM valproata.
3. Generalno, trend promjene glavnih antioksidacijskih sustava obrane (SOD, katalaza, GSH) ne možemo sa sigurnošću reći da je *in vivo* model jetrenih stanica odgovarajući model za promjene *in vivo*.
4. U bubregu mužjaka valproat apliciran uzrokuje smanjenje lipidne peroksidacije. Suprotno tome u bubregu ženke valproat uzrokuje značajnu lipidnu peroksidaciju.
5. U PK15 stanicama bubrega u kulturi značajna lipidna peroksidacija zabilježena je pri dozama valproata od 10, 50 i 100 mM valproata tijekom 24 satne izloženosti.
6. U oba spola valproat ne mijenja aktivnost SOD-a, ali jako povećava aktivnost bubrežne katalaze. Koncentracija glutaciona bila je smanjena samo u bubregu mužjaka, ali ne i ženki. Generalno bi se moglo zaključiti da se u bubregu kao jedinstveni put obrane najviše aktivira katalaza, a takva aktivacija u mužjaka uspješno umanjuje oksidacijski stres dok u ženki aktiviranje samo tog puta obrane nije dovoljno da umanjí oksidacijsku peroksidaciju lipida u stanicama bubrega.
7. U PK15 stanicama bubrega u kulturi aktivnost SOD-a je uglavnom nepromijenjena osim u najvećoj apliciranoj dozi od 100 mM tijekom 24 satne izloženosti kulture djelovanju valproata. U PK15 stanicama bubrega u kulturi aktivnost katalaze, slično kao i u *in vivo* istraživanju povećana

je u svim apliciranim dozama (10-100 mM) valproata. I koncentracija glutationa u PK15 stanicama bubrega povećana je u svim apliciranim dozama (10-100 mM) valproata.

8. Stanični model bubrega u kulturi, s obzirom na trend promjene antioksidacijskih parametara uglavnom slijedi slične promjene kao i u *in vivo* te se zaključno može reći da je PK stanični model oksidacijskog stresa uzrokovanog valproatom dobra zamjena za *in vivo* mišji model, iako je stanična linija PK15 porijeklom iz bubrega svinje, ali je promjena glavnih antioksidacijskih parametara slična.

9. Stanični model stanica ovarija (CHO) pokazuje smanjenje lipidne peroksidacije pri tretmanu valproatom u koncentracijama 20, 50, 70 i 100 mM, a pri 10 mM koncentraciji valproata porast lipidne peroksidacije. Aktivnost antioksidacijskih enzima, superoksid dismutaze i katalaze, porasla je pri apliciranim koncentracijama valproata 50, 70 i 100 mM. Razina glutationa u ovim stanicama pri apliciranoj koncentraciji valproata 50 mM u padu je u odnosu na kontrolnu skupinu, a pri koncentracijama valproata 70 i 100 mM u porastu.

## 7. LITERATURA

- Baille TA, Slatter JG (1991) Glutathione: A Vehicle for the Transport of Chemically Reactive Metabolites *in vivo*. *Accounts of Chemical Research* **24**: 264-270.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*. **120**: 483-495.
- Belcastro V, D' Egidio C, Striano P, Verrotti A (2013) Metabolic and endocrine effects of valproic acid chronic treatment. *Epilepsy Research*.
- Bellringer ME, Rahman K, Coleman R (1988) Sodium valproate inhibits the movement of secretory vesicles in rat hepatocytes. *Biochem. J*. **249**: 513-519.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York.
- Bykov IL, Mal'tsev AN, Gurinovich VA, Nefedov LI (2004) Biochemical basis of valproic acid toxicity: role of oxidative stress and effects of L-carnitine. *Biomed. Khim.* **50(4)**: 384-389.
- Chang HH, Gean PW, Chou CH, Yang YK, Tsai HC, Lu RB, Chen PS (2010) C825T polymorphism of the GNB3 gene on valproate-related metabolic abnormalities in bipolar disorder patients. *J. Clin. Psychopharmacol.* **30**: 512-517.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M (2010) Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *J. Biomed. Biotechnol.* VOL2010.
- Chaudhary S, Ganjoo P, Raiusddin S, Parvez S (2015) Nephroprotective activities of quercetin with potential relevance to oxidative stress induced by valproic acid. *Protoplasma*. **252(1)**: 209-217.
- Đikić D, Jutrić D, Dominko K (2017) The Dual Nature of the Antiepileptic Drug Valproic Acid, with Possible Beneficial Effects in Alzheimer's Disease. *SEEMEDJ*, VOL1, NO1.
- El-Shenawy NS, Hamza RZ (2016) Nephrotoxicity of sodium valproate and protective role of L-cysteine in rats at biochemical and histological levels. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **27(5)**: 497-504.
- Gezginci-Oktayoglu S, Turkyilmaz IB, Ercin M, Yanardag R, Bolkent S (2016) Vitamin U has a protective effect on valproic acid-induced renal damage due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-fibrotic properties. *Protoplasma*. **253(1)**: 127-135.

- Glister C, Satchell L, Michael AE, Bicknell AB, Knight PG (2012) The anti-epileptic drug valproic acid (VPA) inhibits steroidogenesis in bovine theca and granulosa cells in vitro. *PLoS One*. **7**: e49553.
- Grosso S, Longini M, Rodriguez A, Proietti F, Piccini B, Balestri P, Buonocore G (2011) Oxidative stress in children affected by epileptic encephalopathies. *J. Neurol. Sci.* **300(1-2)**: 103-106.
- Gustavsen MW, von Krogh K, Taubøll E, Zimmer KE, Dahl E, Olsaker I, Ropstad E, Verhaegen S (2009) Differential effects of antiepileptic drugs on steroidogenesis in a human *in vitro* cell model. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **189**: 14-21.
- Hamed SA, Rageh TA, Mohamad AO, Ei Nour S (2018) Renal dysfunctions/injury in adult epilepsy patients treated with carbamazepine or valproate. *Expert Review of Clinical Pharmacology*.
- Heidari R, Jafari F, Khodaei F, Yeganeh BS, Niknahad H (2018) Mechanism of valproic acid-induced Fanconi syndrome involves mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rat kidney. *Nephrology* **23**: 351-361.
- Herzog AG (2008) Disorders of reproduction in patients with epilepsy: antiepileptic drug related mechanisms. *Seizure* **17**: 111-119.
- Hu X, Wang J, Dong W, Fang Q, Hu L, Liu C (2011) A meta-analysis of polycystic ovary syndrome in women taking valproate for epilepsy. *Epilepsy Res.* **97**: 73-82.
- Inada H, Chihara K, Yamashita A, Miyawaki I, Fukuda C, Tateishi Y, Kunimatsu T, Kimura J, Funabashi H, Miyano T (2012) Evaluation of ovarian toxicity of sodium valproate (VPA) using cultured rat ovarian follicles. *J. Toxicol. Sci.* **37**: 587-594.
- Jafarian I, Eskandari MR, Mashayekhi V, Ahadpour M, Hosseini MJ (2013) Toxicity of valproic acid in isolated rat liver mitochondria. *Toxicol. Mech. Methods* **23**: 617-623.
- Ji Q, Shi X, Lin R, Mao Y, Zhai X, Lin Q, Zhang J (2010) Participation of lipid transport and fatty acid metabolism in valproate sodium-induced hepatotoxicity in HEPG2 cells. *Toxicol. In Vitro* **24**: 1086-1091.



- Kiang TK, Teng XW, Karagiozov S, Surendradoss J, Chang TK, Abbott FS (2010) Role of oxidative metabolism in the effect of valproic acid on markers of cell viability, necrosis, and oxidative stress in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Sci.* **118(2)**: 501-509.
- Kiang TK, Teng XW, Surendradoss J, Karagiozov S, Abbott FS, Chang TK (2011) Glutathione depletion by valproic acid in sandwich cultured rat hepatocytes: Role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **252**: 318-324.
- Knights MJ, Finlay E (2014) The effects of sodium valproate on the renal function of children with epilepsy. *Pediatr. Nephrol.* **29**: 1131-1138.
- Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, Bolszak M, Pietilä M, Koivunen P, Hakkola J, Poulton J, Morten KJ, Uusimaa J (2015) Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HEPG2 *in vitro* cell model. *Toxicology* **331**: 47-56.
- Lee MH, Hong I, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, Kim HL, Yoon BI, Chung H, Kong G, Lee MO (2007) Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of valproic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **220**: 45-59.
- Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, Landay AL, Coombs RW, Richman DD, Mellors JW, Coffin JM, Bosch RJ, Margolis DM (2005) Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* **366**: 549-555.
- Lloyd KA (2013) Mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, VOL6.
- Mao GM, Thomas PD, Lopaschuk GD, Poznansky MJ (1993) Superoxide Dismutase (SOD)-Catalase Conjugates. *J. Biol. Chem.* **5**: 416-420.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999) Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin. Biochem.* **8**: 595-603.
- Minucci S, Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 38-51.

- Miyamoto S, Arai H, Terao J (2010) Enzymatic Antioxidant Defenses. U: Aldini G., Yeum K. J., Niki E., Russell R. M. (ur.) Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Applications. Ames, Blackwell Publishing.
- Natarajan SK, Eapen CE, Pullimood AB, Balasubramanian KA (2006) Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21(8)**: 1240-1249.
- Perucca E (2002) Pharmacological and therapeutic properties of Valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs.* **16 (10)**: 695-714.
- Petersen I, Collings SL, McCrea RL, Nazareth I, Osborn DP, Cowen PJ, Sammon CJ (2017) Antiepileptic drugs prescribed in pregnancy and prevalence of major congenital malformations: comparative prevalence studies. *Clin. Epidemiol.* **9**: 95-103.
- Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, Shaki F, Shahraki J, Fard JK (2012) A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicol. In Vitro* **26**: 545-551.
- Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L (2007) Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol. Sci.* **257**: 221-239.
- Ścibior D, Czeczot H (2006) Catalase: structure, properties, functions. *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej* **60**: 170-180.
- Seçkin S, Başaran-Küçükgergin C, Uysal M (1999) Effect of acute and chronic administration of sodium valproate on lipid peroxidation and antioxidant system in rat liver. *Pharmacol. Toxicol.* **85(6)**: 294-298.
- Stewart JD, Horvath R, Baruffini E, Ferrero I, Bulst S, Watkins PB, Fontana RJ, Day CP, Chinnery PF (2010) Polymerase  $\gamma$  gene POLG determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology.* **52**: 1791-1796.
- Taubøll E, Gregoraszcuk EL, Kołodziej A, Kajta M, Ropstad E (2003) Valproate inhibits the conversion of testosterone to estradiol and acts as an apoptotic agent in growing porcine ovarian follicular cells. *Epilepsia* **44**: 1014-1021.

- Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS (2005) Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol. Sci.* **86(2)**: 427-435.
- Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS (2005) Valproic acid II: effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicol. Sci.* **86(2)**: 436-443.
- Yiş U, Seçkin E, Kurul SH, Kuralay F, Dirik E (2009) Effects of epilepsy and valproic acid on oxidant status in children with idiopathic epilepsy. *Epilepsy Res.* **84(2-3)**: 232-237.
- Verrotti A, Mencaroni E, Cofini M, Castagnino M, Leo A, Russo E, Belcastro V (2016) Valproic acid metabolism and its consequences on sexual functions. *Curr. Drug Metab.* **17**: 573-581.
- Viswanathan LG, Satishchandra P, Bhimani BC, Reddy JY, Rama Murthy BS, Subbakrishna DK, Sinha S (2016) Polycystic ovary syndrome in patients on antiepileptic drugs. *Ann. Indian Acad. Neurol.* **19**: 339-343.
- Zhao M, Zhang T, Li G, Qiu F, Sun Y, Zhao L (2017) Associations of CYP2C9 and CYP2A6 Polymorphisms with concentrations of VPA and its hepatotoxic metabolites and VPA-induced hepatotoxicity. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*
- European Medicines Agency. Valproate 2017. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Valproate/human\\_referral\\_000187.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Valproate/human_referral_000187.jsp) (datum posljednjeg pristupa 31. 05. 2018)
- <https://www.news-medical.net/health/Valproic-Acid-Uses.aspx> (datum posljednjeg pristupa 31. 05. 2018)
- <https://www.news-medical.net/health/What-is-Oxidative-Stress.aspx> (datum posljednjeg pristupa 04. 06. 2018)
- <https://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems.aspx> (datum posljednjeg pristupa 04. 06. 2018)

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 26. svibnja 1993. godine u Mostaru gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Maturirala sam 2012. godine u Gimnaziji fra Grge Martić u Mostaru te upisala integrirani studij biologije i zemljopisa na Fakultetu prirodoslovno matematičkih i odgojnih znanosti, Sveučilišta u Mostaru. Tijekom druge godine studija u sklopu CEEPUS mobilnosti provodim zimski semestar na Geografskom odsjeku Sveučilišta u Grazu. Preddiplomski studij biologije i geografije završavam 2015. godine. 29. listopada iste godine obranivši završni rad pod nazivom „Razvoj invazivnih biljnih vrsta na području mostarske kotline“ stekla sam zvanje prvostupnice biologije i geografije. Iste godine u listopadu upisujem diplomski studij biologije i geografije na FPMOZ-u, Sveučilišta u Mostaru te ljetni semestar četvrte godine provodim na Geografskom odsjeku Sveučilišta u Pragu. Dvije godine sam sudjelovala na manifestaciji „Dani otvorenih vrata FPMOZ-a“. Po završetku četvrte godine na integriranom studiju biologije i geografije u Mostaru, upisujem se na diplomski studij eksperimentalne biologije na Biološkom odsjeku PMF-a, Sveučilište u Zagrebu. Jednu godinu sam sudjelovala na manifestaciji „Noć biologije“.