

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dragan Jurić

**Učinak valproata na sustav
antioksidacijske obrane u mozgu miša
C57Bl6**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

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

Najviše zahvaljujem prof. dr.sc Domagoju Đikiću na pruženoj prilici, savjetima, strpljenju, prenesenom znanju te novim idejama i pristupima u problematici mog diplomskog rada.

Zahvaljujem roditeljima, bratu, sestri, šogor i nećaku što su uvijek podržavali moje odluke, bili puni razumijevanja i strpljenja tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak valproata na sustav antioksidacijske obrane u mozgu miša C57Bl6

Dragan Jurić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Cilj rada bio je odrediti utjecaj valporata na antioksidacijsku obranu u mozgu miša. Dodatni cilj bio je istražiti da li primjena polifenola naringenina zajedno sa valproatom utječe na redoks ravnotežu te može li sinergistička aplikacija naringenina i valproata umanjiti potencijalne negativne učinke. Pokusima je izmjerena lipidna peroksidacija, koncentracija ukupnog glutaciona te aktivnost antioksidativnog enzima superoksid dismutaze u prefrontalnom i centralnom korteksu i malom mozgu. Rezultati su pokazali da, tretman valproatom, naringeninom i njihovim kombinacijama uzrokuje povećanu lipidnu peroksidaciju i kod mužjaka i kod ženki u sve tri mjerene regije mozga. Protektivni učinak polifenolne molekule naringenina nije pokazan. Sukladno povećanoj lipidnoj peroksidaciji raste i aktivnost superoksid dismutaze u svim regijama mozga. Izrazito snižena koncentracija reduciranog glutaciona u mozgu nastala je vjerojatno zbog povećanog superoksidnog radikala i oksidacijske ravnoteže u stanici te je glutation prešao iz reduciranog u oksidirani oblik.

(60 stranica, 24 slike, 22 tablica, 59 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: valporat, naringenin, oksidativni stres, lipidna peroksidacija, glutation, superoksid dismutaza

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

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

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

izv. prof. dr. sc. Davor Zanella

Rad prihvaćen: 31.10.2018

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Effects of valproate on the antioxidative defence system in the brain of C57Bl6 mouse

Dragan Jurić
Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

Aim of this study was to determine effects of antioxidative defense in mouse brain (C57Bl6). An additional aim was to investigate whether the use of polyphenylene naringenine together with valproate affects the redox balance and whether the synergistic application of naringenine and valproate can reduce the potential negative effects. In this experiment lipid peroxidation, concentration of total glutathione and antioxidant activity of superoxide dismutase was measured in the prefrontal and central cortex and small brain. Results showed that the treatment with valproate and naringenine and their combinations caused increased lipid peroxidation in both males and females in all three measured brain regions. The protective effect of polyphenolic naringenine molecule has not been demonstrated. In accordance with increased lipid peroxidation, activity of superoxide dismutase in the brain has also increased. Reduced concentration of reduced glutathione in the brain was probably due to the increased superoxide radical and oxidation equilibrium in the cell and glutathione ranged from reduced to his oxidized form.

(60 pages, 24 figures, 22 tables, 59 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: valporate, naringenin, oxidative stress, lipid peroxidation, glutathione, superoxide dismutase

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

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

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

izv. prof. dr. sc. Davor Zanella

Thesis accepted: 31.10.2018

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Valproat i valproična kiselina	1
1.2 Upotreba valproata u medicini	3
1.3 Fiziološki učinak valproata na živčani sustav	5
1.4 Štetni učinci valproata na živčani sustav	7
1.5 Oksidacijski stres	9
1.6 Naringenin	11
2. CILJ RADA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Pokusne životinje	14
3.2. Izlaganje miševa	14
3.3. Biokemijske analize osnovnih antioksidacijskih parametara u mozgu	15
3.4. Kemikalije	15
3.5. Određivanje proteina metodom po Lowryju	18
3.6 Koncentracija ukupnog glutationa (GSH)	18
3.7 Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	19
3.8 Mjerenje lipidne peroksidacije	20
3.9 Statistička obrada podataka	20
4. REZULTATI	21
4.1 Mjerenje koncentracije malondialdehida (MDA)	21
4.1.1 Mjerenje MDA u frontalnom korteksu mozga	21
4.1.2 Mjerenje MDA u centralnom korteksu mozga	24
4.1.3 Mjerenje MDA u malom mozgu	27
4.2 Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	30
4.2.1 Mjerenje SOD u frontalnom korteksu mozga	30

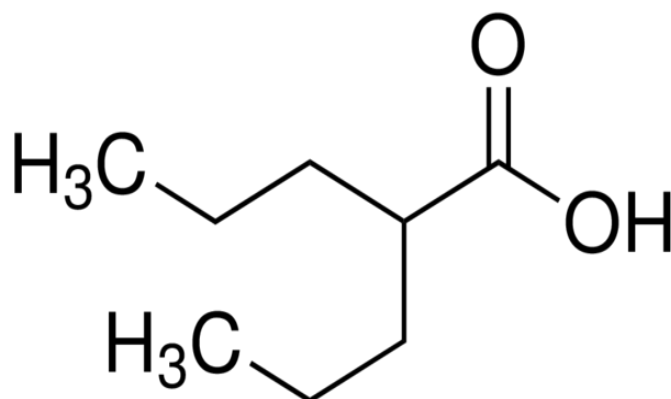
4.2.2 Mjerenje SOD u centralnom korteksu mozga	33
4.2.3 Mjerenje SOD u malom mozgu	36
4.3 Mjerenje koncentracije glutaciona (GSH).....	39
4.3.1 Mjerenje GSH u frontalnom korteksu mozga	39
4.3.2 Mjerenje GSH u centralnom korteksu mozga	42
4.3.3 Mjerenje GSH u malom mozgu	45
5.RASPRAVA.....	48
6. ZAKLJUČCI.....	53
7. LITERATURA	54

1.UVOD

1.1 Valproat i valproična kiselina

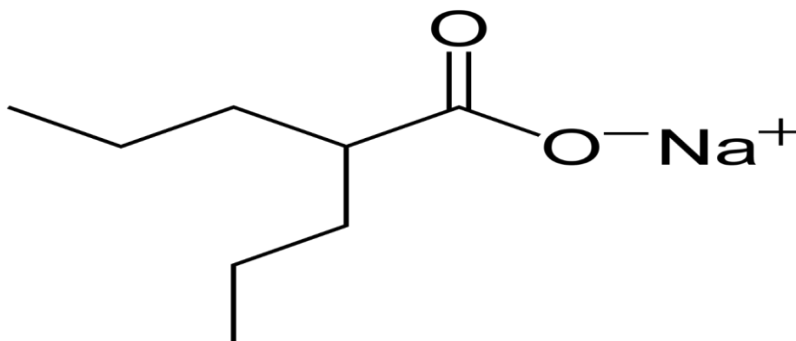
Valproična kiselina (slika 1) (VPA, 2-propilvalerična kiselina) je kratkolančana masna kiselina koja je pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju. Sintetizirao ju je 1882. godine Burton, te je prvotno služila kao metabolički inertno organsko otapalo (Burton, 1882.). Francuski znanstvenici Eymard i Meunier (Meunier i sur., 1963), ispitivali su na štakorima, učinak antiepileptičkih lijekova koji su slabo topljivi u vodi. Uočili su da oni lijekovi koju su bili otopljeni u valproičnoj kiselini imaju snažna antiepileptička svojstva. Ta spoznaja ih je navela na pomnije proučavanje antiepileptičkog učinka valproata. Valproat je prvi put upotrebljen protiv epileptičnih napada 1967. godine u Francuskoj pod nazivom „Depakine“, svega nekoliko godina nakon otkrića antiepileptičkog učinka na štakorima. Danas, on pripada grupi najčešće propisanih lijekova protiv epilepsije u svijetu, te se osim za tu svrhu propisuje i za liječenje drugih bolesti tipa bipolarnog poremećaj i migrena. Najčešće se primjenjuje u dva oblika, soli natrij-valproat (slika 2) i valproična kiselina ili zajedničkoj kombinaciji dvaju oblika nazvanom divalproat. Lijek se obično uzima oralnim putem te terapijske koncentracije variraju između 50 i 150 mg /L u serumu (European Medicines Agency, 2017). Koncentracije iznad 200 mg/L dovode do negativnih posljedica na organizam kao hiper ili hipotermije, hipotenzije a kod većih koncentracija do kome pa čak i smrti. 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 (Perucca, 2002). Samo slobodni VPA je fiziološki aktivan i može se pomoću transportera ili difuzijom prevesti u jetru i mozak. Poluvrijeme eliminacije iz tijela pacijenata je između 6-16 sati s time da je kod djece mlađe od 18 mjeseci ono i duže (Perucca, 2002). Svega 5% ukupnog valporata izluči se ne promijenjen iz tijela preko bubrega. Ostatak se izlučuje kao konjugirana glukuronska kiselina ili kao neki

produkt beta oksidacije. Osim pozitivnih strana u vidu sprječavanja napadaja epilepsije u današnje vrijeme sve se više istražuju i negativne strane primjene valproata. Iako sami mehanizmi nastanka negativnih posljedica do danas nisu poznati oni se očitavaju kao dobitak mase, ateroskleroza, ne-alkoholična steatoza jetre i policistični ovariski sindrom (Đikić i sur., 2017).



Slika 1. Strukturna formula valproične kiseline

(preuzeto: <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02190286&country=223>)



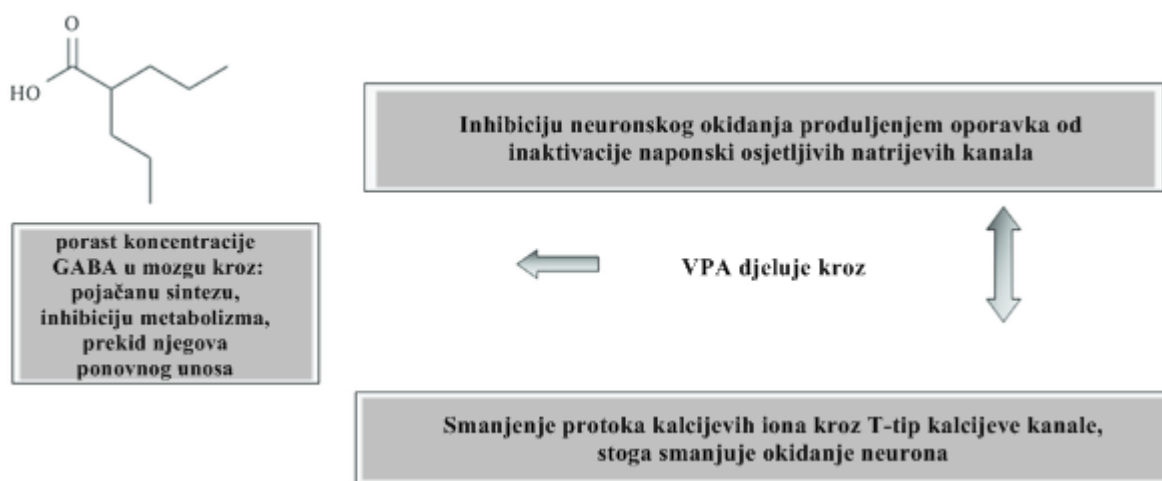
Slika 2. Strukturna formula natrij-valproata

(preuzeto: https://sr.wikipedia.org/wiki/Natrijum_valproat)

1.2 Upotreba valproata u medicini

Prošlo je osam desetljeća od otkrića valproata prije nego je Eymard uočio njegovu moguću aplikaciju u medicini. Danas je to najčešće propisani lijek na svijetu za tretiranje epileptičnih napadaja. Osim u liječenju epilepsije koristi se i za liječenje bipolarnog poremećaja, sprječavanje migrena (Depakene, 2014), kliničke depresije, anksioznosti i PTSP-a. U novije vrijeme otkrivena je sposobnost valproata za inhibiciju histon deacetilaze (HDAC). HDAC inhibitori pa tako i valproat sprječavaju proliferaciju te potiču diferencijaciju u različitim modelima raka pa se danas valproat ispituje kao mogući lijek protiv istog. Pokazalo se da je valproat učinkovitiji od litija u liječenju bipolarnog poremećaja (Keck i McElroy, 2002). Također je pokazao bolju djelotvornost prilikom liječenja shizofrenije u odnosu na litij. Iako je proveden velik broj istraživanja točan mehanizam djelovanja valproata još je nepoznat. U ljudskom mozgu, povećava koncentraciju neurotransmitera gama amino maslačne kiseline (GABA) putem nekoliko mehanizama i to na način da inhibira 4 aminobutirat aminotransferazu (ABAT) ili sprječava degradaciju samog neurotransmitera (slika 3) (Tolou-Ghamari i Palizban, 2015). Nadalje, valproat može direktno djelovati i mijenjati svojstva natrijevih kanala ovisnih o naponu i utjecati na stvaranje akcijskog potencijala te blokirati razvoj napadaja epilepsije. On modulira dopaminski i serotoninski prijenos (Löscher, 1999), što bi moglo predstavljati način liječenja ostalih psihičkih bolesti tipa depresije, bipolarnog poremećaja itd. Zbog širokog spektra djelovanja protiv generalnih ili žarišnih napadaja koristi se sam u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim lijekovima. Valproat je odobren od strane FDA (Food and drug administration USA) kao samostalna ili pomoćna terapija pri liječenju epilepsije. U Europi je odobren i za liječenje tonus-kroničnih napadaja i mikloničnih grand mal. Upotreba valproata na ljudima oboljelima od bipolarnog poremećaja počela je 1967. godine. Klinička istraživanja pokazala su da ublažuje manične faze bipolarnog poremećaja čak i kod onih pacijenata koji su bili otporni na druge lijekove ovog tipa (McElroy i sur., 1993; Keck i McElroy, 1994) Kod pacijenata koji su u akutnoj

maničnoj fazi bipolarnog poremećaja valproat pokazuje efikasnost kratkog tretmana s većim dozama, dok prilikom dužih tretmana nije bilo nikakvog daljnjeg napretka (McElroy i sur., 1993; Perucca, 2002). Valproat se pokazao kao izuzetno djelotvoran i u profilaktičkom liječenju migrena. Prema nekim istraživanjima smanjuje njen broj, dužinu, trajanje i intenzivnost u 50 do 70% tretiranih pacijenata (Ghose i Niven, 1998; Mathew, 2001; Mitsikostas i Polychronidis, 1997; Sato i sur., 2001; Silberstein, 2002). Prilikom ovih tretmana doza je bila između 200-1500 mg po danu (Mathew, 2001). Prvotno valproat nije pokazivao nikakav učinak pri liječenju Parkinsonove bolesti. No, nedavna in vitro istraživanja primjene istog na modelima koji imitiraju Parkinsonovu bolest pokazuju pozitivne efekte. Tretmani sprječavaju apoptozu induciranu rotenonom (induciranje neurodegenerativnost slično kao kod Parkinsonove), štite neurone od toksina 1-metil-fenilpiridinina (MPP+) stimulirajući glija stanice na otpuštanje trofičke supstance, te su u kulturi stanica pokazali da štite neurone i na način da sprečavaju mikroglija induciranu degeneraciju promovirajući apoptozu mikroglija (Pan i sur., 2005; Chen i sur., 2006; Chen i sur., 2007; Monti i sur., 2007). Također je provedeno istraživanje o učinku VPA na miševima koji su bili ovisni o metametaminima. Uočeno je da tretmani smanjuju ovisnost induciranu ovom drogom. Naknadno su testirani i miševi ovisni o kokainu ali tu nije pronađena nikakva korelacije smanjenja ovisnosti i tretmana s VPA (Armeanu i sur., 2007)

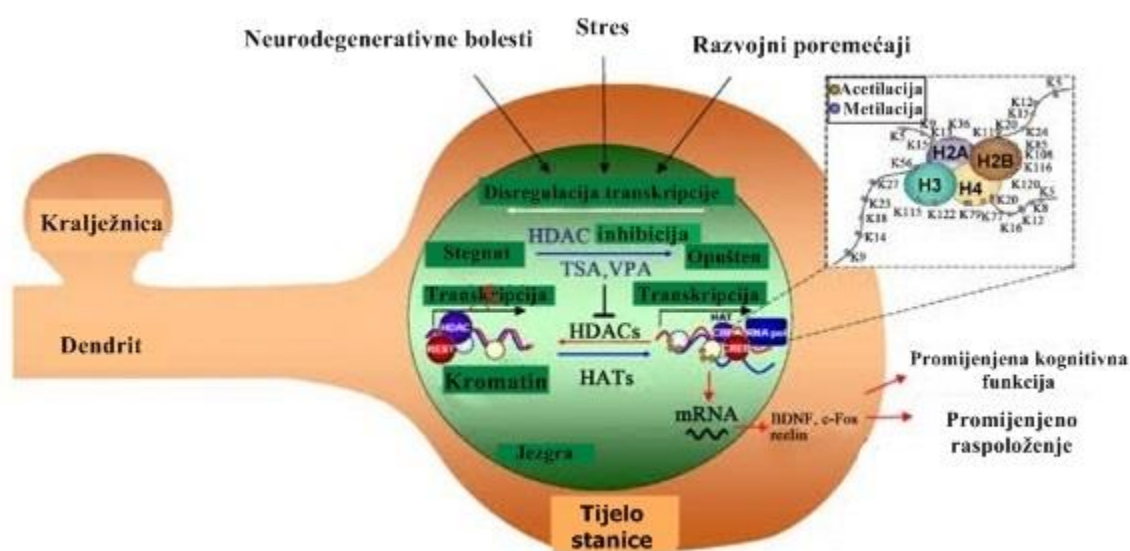


Slika 3. Mehanizam djelovanja valproata (Tolou-Ghamari Z i sur., 2015)

1.3 Fiziološki učinak valproata na živčani sustav

γ -amino maslačna kiselina (GABA) je neuroinhibitor sisavaca. Ona utječe na sinapatičke puteve preko dvije vrste receptora, ionotropnih i metabotropnih. Od ionotropnih receptora povezanih s kloridnim kanalima najznačajniji su receptori GABA_C i GABA_A. Receptori GABA_B spadaju u metabotropne i oni djeluju putem sekundarnih intraneuralnih glasnika. Povećana koncentracija γ -amino maslačne kiseline jedan je od načina djelovanja valproata. To podupire i činjenica da inhibicija γ -amino maslačnih signalnih puteva uzrokuje napadaje dok povećane količine iste sprječavaju napadaje. Akutna administracija valproata povećava koncentraciju GABA u mozgu štakora i cerebro-spinalnoj tekućini ljudi (Perucca, 2002; Johannessen i Johannessen, 2003). Također su uočene lokalne promjene u količini GABA neurotransmitera uzrokovane valproatom u substantia nigri (Perucca, 2002). Također, GABA pojačava inhibiciju GABA neurona u cerebralnom korteksu (Perucca, 2002; Johannessen i Johannessen, 2003). Pretpostavlja se da valproat in vivo utječe na razine GABA kroz inhibiciju enzima i to na način da inhibira 4-aminobutirat aminotransferazu. Valproat može utjecati na stvaranje GABA i na sprječavanje njezine razgradnje pomoću GABA transaminaze. In vitro, visoke koncentracije valproata koje se ne daju pacijentima, uzrokuju inhibiciju GABA transaminaze, enzima koji pretvara GABA u sukcinat semialdehid (SSA). Također, in vitro je uočena jača inhibicija na SSA nego GABA transaminazu (Gurvich i Klein, 2002). Akumulacija SSA dovodi do povećane koncentracije GABA zbog pretvaranja SSA nazad u GABA ili zato što SSA inhibira GABA transaminazu. Nadalje, valproat također može utjecati na povećanje produkcije GABA preko glutamat dekarboksilaze (GAD), koja pretvara glutamat u GABA. Osim na koncentraciju GABA, valproat (slika 4) djeluje i kao inhibitor histonske deacetilaze (HDAC). Histonska deacetilaza veže se na kosupresorske komplekse transkripcijskih faktora te sprječava transkripciju smanjenjem acetilacije terminalnih amino repova histona. Tretiranjem stanica s inhibitorima HDAC kao što je valproat može povratiti transkripciju do otprilike 2% gena od kojih su mnogi važni za normalan stanični ciklus (Van Lint i sur., 2006). Valproat također može djelovati na

HDAC induciranjem razgradnje HDAC ovisne o proteosomu. Preko inhibicije HDAC, valproat može indirektno regulirati metilaciju CpG otoka. Demetilacija tih otoka mogla bi reaktivirati utišane gene čiji su proizvodi smanjeni kod osoba koje boluju od shizofrenije ili bipolarnog poremećaja. Osobe koje boluju od ovih poremećaja imaju na primjer smanjenu ekspresiju proteina relina, a pokazano je da valproat kod štakora može ponovno aktivirati hipermetilirane relinske promotore (Tremolizzo i sur., 2002). Ukoliko je to moguće i kod ljudi ovo bi mogao biti jedan od načina kako valproat utječe na te poremećaje.



Slika 4. Mehanizam djelovanja valproata (VPA) kao inhibitora histon deacetilaze (HDAC) (Abel i Zukin, 2008)

1.4 Štetni učinci valproata na živčani sustav

Iako se valproat pokazao kao učinkovit i svrsishodan lijek, do danas su zabilježene mnoge nuspojave na njegovu primjenu. Također određena skupina ljudi kao trudnice, dojilje i osobe s poremećajima ciklusa uree ne bi smjeli uzimati ovaj lijek. Većinom su štetni učinci okarakterizirani kao blažeg tipa. Najučestalije su gastrointestinalne nuspojave koje podrazumijevaju mučninu, povraćanje, lošu probavu itd., te se pojavljuju u 25% pacijenata. Općenito ove posljedice se pojavljuju na početku tretmana i prolazne su. One se mogu i minimizirati tako da se lijek uzima s obrokom (Bruni i Wilder, 1979) ili smanjenjem doze. Učestali problem također predstavlja i značajan porast tjelesne mase te su provedene studije koje su pokazale da je porast mase u prvih 10 tjedana tretmana iznosio 6kg (Biton i sur., 2001; Chengappa i sur., 2002) Dobitak mase povezan je s metaboličkim promjenama poput smanjenja beta oksidacije masnih kiselina (Breum i sur. 1992), povećane koncentracije inzulina (Demir i Aysun, 2000) i leptina (Vining, 1987). Također je uočeno da su žene više pogođene dobitkom težine od muškaraca. Dugoročna monoterapija valproatom može izazvati povećanje koncentracija kalcija u serumu i resorpciju u kosti što može uzrokovati smanjenu gustoću kosti (Sato i sur., 2001). Teže nuspojave u vidu zatajenja jetre, gušterače i pojava hiperamonične encefalopatije puno su rjeđe. Također, ukoliko dođe do predoziranja s valproatom može doći do prestanka disanja, zatajenja srca, kome i smrti.

Nuspojave na centralnom živčanom sustavu (CNS) rjeđe su prilikom aplikacije valproata nego drugih antiepileptičkih lijekova (AED) (Davis i sur., 1994). Valproat ima minimalan utjecaj na kognitivne funkcije (Thompson i Trimble, 1982), te se zbog toga preferira kao antiepileptički lijek kod starijih ljudi. Posturalni tremor je najučestalija neurološka nuspojava valproata. Neka istraživanja potvrđuju pojavu tremora kod 6% pacijenata dok druga navode pojavu tremora i do 45% pacijenata. Ova razlika u postotku pacijenata koji osjećaju tremor može nastati zbog doze, pošto je ova pojava usko vezana uz povećanje doze valproata. Ostali štetni učinci na CNS uključuju glavobolje, nistagmus, vrtoglavicu, diplopiju i zamagljeni vid (Genton i Gelisse, 2002;

Battino i sur., 2000), koji se pojavljuju rjeđe od tremora. Pojava reverzibilne demencije također je uočena. Iako je ova pojava jako rijetka valja ju istaknuti jer ubrzo nestaje sa smanjivanjem doze ili prestankom tretiranja valproatom (Guerrini i sur., 1998). Također su rijetko zabilježeni i slučajevi encefalopatije. U Njemačkoj je 2006 godine opisano 19 novih slučajeva encefalopatije za koje se smatra da su uzrokovane valporatom (Gerstner i sur., 2006). Pretpostavka je takva da dugotrajno uzimanje valproata može uzrokovati hiperamoniū koja onda može uzrokovati encefalopatiju. U novije vrijeme istražuje se utjecaj valproata na induciranje Parkinsonove bolesti. U provedenom istraživanju valproat je od ostalih testiranih AED lijekova pokazao najveću sposobnost induciranja simptoma Parkinsonove bolesti u testiranoj skupini. Simptomi su povezani s dozom te se pojavljuju pri dozi 750 ± 273.86 mg po danu ili više. Simptomi nestaju smanjenjem doze. Svi ispitanici u ovom istraživanju koristili su valproat duže od 3 godine (Jamora i sur., 2007).

1.5 Oksidacijski stres

Reaktivne kisikove čestice ili radikali (ROS) predstavljaju molekule kisika koje imaju jedan ne sparni elektron, izuzetno su reaktivne te uzrokuju promjene na deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA), ribonukleinskoj kiselini (RNA), proteinima i lipidima. ROS normalno nastaje pri aerobnom metabolizmu stanica ili prilikom aktivacije makrofaga u svrhu uklanjanja patogena. Predstavljaju važne medijatore staničnih ozljeda i smrti. Također su direktno ili indirektno uključeni u razne kliničke poremećaje kao što su ateroskleroza, plućna toksičnost, ishemijsko-reperfuzijska ozljeda i rak. Najznačajniji kisikovi radikali su superoksidni anion O_2^- , vodikov peroksid H_2O_2 te najreaktivniji hidroksilni radikal OH^- .

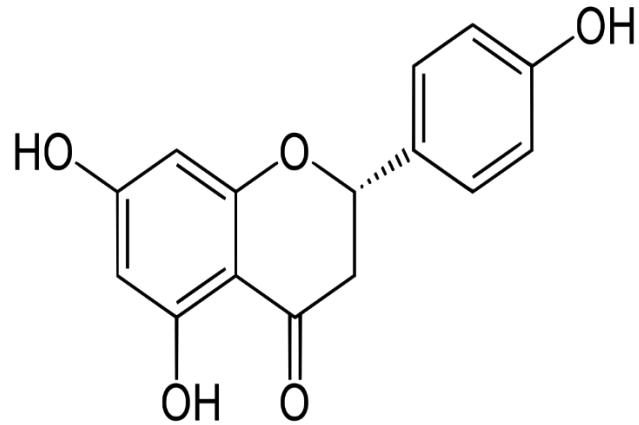
Oksidacijski stres nastaje usred neravnoteže između proizvodnje ROS-a i njihovog uklanjanja iz stanice. Iako je ROS nužan za normalnu funkciju stanice jer sudjeluje u prijenosu staničnih signalnih puteva, njegova prekomjerna proizvodnja negativno utječe na stanicu što rezultira njenom disfunkcijom. Akumulacija ROS-a kroz duže vrijeme utječe na stvaranje različitih kroničnih bolesti kao bolesti srca i krvnih žila, raka, neurodegenerativnih bolesti te na samo stanično starenje. Antioksidacijski sustav predstavlja stanični mehanizam neutralizacije ROS-a. Enzimi superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GSH-Px) najpoznatije su komponente ovog sustava (Zhang i sur., 2011) koje pretvaraju ROS u manje štetne molekule sprječavajući nastanak oksidacijskog stresa. SOD katalizira reakciju prijelaza superoksidnog aniona u vodikov peroksid ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), koji je esencijalan za uklanjanje patogena ali citotoksičan u visokim koncentracijama. CAT katalizira prijelaz H_2O_2 u vodu i kisik. Osnovna funkcija GSH-Px enzima je reducirati lipidnu hiperoksidazu u alkohol i pretvaranja H_2O_2 u vodu. Ako stanice putem ovih sustava ne uspijevaju održati redoks ravnotežu, dolazi do stvaranja kroničnog upalnog stanja. To može dovesti do oštećenja stanica i okolnog tkiva zbog aktivacije signalnih puteva, produkcija upalnih citokina promjene ekspresije gena i mnogih drugih staničnih modifikacija.

Živčani sustav posebice mozak izrazito je osjetljiv na oksidacijski stres zbog nekoliko razloga. U mozgu zbog velike potrebe za energijom dolazi do velike potrošnje kisika a samim time i velike količine popratnog ROS-a. Nadalje, neuronske membrane bogate su polinezasićenim masnim kiselinama koje su jako osjetljive na napade radikala. Također niske razine enzima katalaze i glutathion peroksidaze smanjuju mogućnost obrane stanice od nastalog ROS-a. Također se u malom i velikom mozgu nalaze veće količine željeza koji olakšava Fentonvu reakciju i povećava količine hidroksilnih radikala (Fernandes i sur., 2010)

Valproat kao i neki drugi antiepileptički lijekovi u stanici mogu izazvati oksidacijski stres. On može utjecati na prijenos elektrona u antioksidacijskom lancu tako da se ili direktno veže na neku biološku komponentu lanca kao recimo SOD ili da direktno preuzima elektron na sebe te na te načine povećava ukupnu količinu nastalog ROS-a. U krvi valproat se pretvara u anion koji se veže na SOD i inhibira njegovu funkciju (Wells i sur., 2010). Pri oksidaciji valproata u citoplazmi s citokromom P450 nastaje produkt 4-eneVPA koji onda dalje u mitohondriju beta oksidacijom prelazi u 2,4-diene VPA. 2,4-diene VPA se zatim konjugira u tiole pomoću GSH što smanjuje njegovu koncentraciju u mitohondriju i pridonosi stvaranju ROS. Znanstvenici Chaudhary i Parvez (Chaudhary i Parvez, 2012), proveli su istraživanje o utjecaju valproata na neurotoksičnost u mozgu mladih štakora in vitro (corteks i mali mozak). Istraživanje je pokazalo značajan porast razine markera oksidacijskog stresa lipidnog peroksida i kraboniliranih proteina. Također valproat je pokazao i utjecaj na ne-enzimske antioksidanse gdje se vidi značajna potrošnja GSH i ne proteinske tiolne aktivnosti ali se pritom ne vidi značajno povećanje ili smanjenje u ukupnoj koncentraciji tiola i protein tiola. Uočeno je i znatno smanjenje aktivnosti enzima glutathion S-tranferaze , glutathion reductaze i glutathion peroksidaze kao i drugih antioksidacijskih enzima kao superoksid dismutaze i katalaze u malom i velikom mozgu. Značajno povećanje također je zabilježeno u aktivnosti ksantin oksidaze. Sve ovo upućuje na to da VPA uzrokuje oksidacijski stres u mozgu interferiranjem sa enzimima antioksidacijskog sustava.

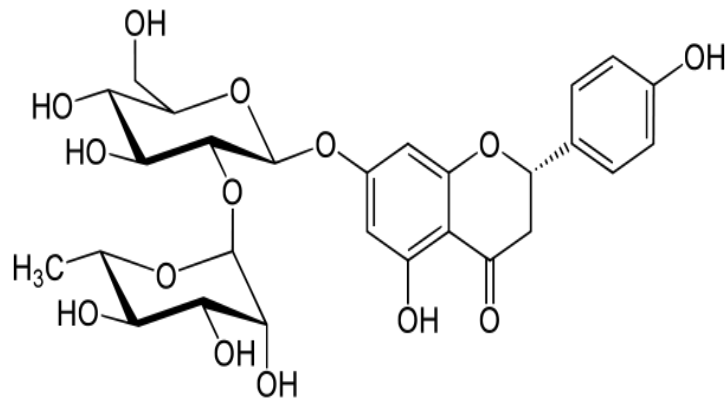
1.6 Naringenin

Naringenin (slika 5) je flavonoid prirodno najčešće prisutan u citrusima, poglavito u grejpu ali ga se također može naći u narančama i rajčici. U prirodi se nalazi u glikoliziranoj formi nazvanoj naringin (slika 6). U ljudskom crijevu naringin se metabolizira uz pomoć naringinaze i pretvara u naringenin. Posjeduje razne biološke aktivnosti pa tako djeluje protuupalno, anti-dijabetički, protu-tumorski i modulira imunološki sustav. Također djeluje kao antioksidans te utječe na promet masti i ugljikohidrata. Naringenin također ima mogućnost popravka DNA. Znanstvenici su izložili stanice do 80 mM naringenina po litri, tijekom 24 sata, i utvrdili da količina hidroksilnog oštećenja DNA smanjena je za 24 posto u tom vrlo kratkom vremenu (Venkateswara i sur., 2017). Nedostatak je njegova slaba apsorpcija u ljudskom tijelu. U najboljem slučaju svega 15% naringenina će se apsorbirati kroz gastrointestinalni trak. Tako na primjer ispijena puna časa soka od naranče kod ljudi će rezultirati koncentracijom naringenina od svega 0.5 mM po litri (Human Metabolome Database, 2016). Utvrđeno je da smanjuje oksidacijski stres kod štakora na način da smanjuje povišene koncentracije lipidnog peroksida i dušikovog oksida a povisuje razina glutationa. Nadalje, njegovom administracijom 4.5 mg/kg tjelesne težine u miša ublažava skopolaminom induciranu amneziju i predstavlja spoj koji sprječava stvaranje Alzheimerove bolesti (Shashank i Abhay, 2013). Osim toga, naringenin još pokazuje hepatoprotektivni učinak zbog svojeg antioksidacijskog svojstva i sposobnosti da smanji koncentraciju pro-upalnih citokina. Zaštitno djeluje i na kardiovaskularni sustav. Kod štakora tretiranih naringeninom došlo je do odgode pojave visokog sistoličkog tlaka povezanog sa starenjem i povećane proizvodnje dušikovog oksida te poboljšane endotelne funkcije. Naringenin je ujedno i spriječio pojavu oksidacijskog stresa u srcu štakora kojima su inducirali infarkt miokarda s izoprenalinom (Rajadurai i Prince, 2009). Daljnja istraživanja kako naringenina tako i ostalih spojeva iz porodice flavonoida omogućit će njihovu još veću primjenu u medicini i liječenju ljudi.



Slika 5. Shematski prikaz naringenina

(preuzeto sa : <https://en.wikipedia.org/wiki/Naringenin>)



Slika 6. Shematski prikaz naringina

(preuzeto sa : <https://en.wikipedia.org/wiki/Naringin>)

2. CILJ RADA

U ovom radu, na modelu miševa C57Bl6, tretiranih 15 dana sa valproatom u terapijskoj dozi (400 mg/kg tjelesne težine po životinji). Dodatno želimo istražiti da li primjena polifenola naringenina zajedno s valproatom pozitivno utječe na redoks ravnotežu, te može li se sinergističkom aplikacijom naringenina i valproata umanjiti povećana proizvodnja kisikovi radikala i lipidna peroksidacija (mjenjem koncentracije malondialdehida MDA), te aktivira li sustav antioksidativne obrane (mjenjem aktivnosti superoksid dismutaze SOD i koncentracije ukupnog reduciranog glutation GSH) potencijalne negativne učinke.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. 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 miševе 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 važećima 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. Izlaganje miševa

Pokus je proveden na odraslim C57Bl6 miševima. Tijekom 15 dana pokusnog tretmana, svakodnevno se oralno gastičkom 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)
3. Skupina – tretirana otopina polifenola naringenina u dozi od 25 mg/kg tjelesne težine životinje
4. Skupina – tretirat će se sa kombinacijom doza skupine 2+3

3.3. Biokemijske analize osnovnih antioksidacijskih parametara u mozgu

Korištene metode biokemijske analize napravljane su prema protokolima detaljno objavljenim u Dominko (Dominko, 2014). U daljnjim poglavljima opisani su najvažniji postupci i kemikalije:

3.4. Kemikalije

Tablica 1. Popis najvažnijih korištenih kemikalija i njihovih proizvođača.

Kemikalija	Proizvođač
Fosfatni pufer (PBS)	Kemika, Hrvatska
5-sulfosalicilna kiselina dihidrat	Sigma- Aldrich, SAD
Na₂CO₃	Sigma-Aldrich, SAD
Natrij-kalij tartarat	Sigma-Aldrich, SAD
CuSO₄x5H₂O	Lach-Ner, Češka
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
Natrij-dodecilsulfat (SDS)	Merck, Njemačka
Octena kiselina	Kemika, Hrvatska
Tiobarbiturna kiselina (TBA)	AppliChem GmbH, Njemačka
Natrijev hidroksid (NaOH)	Kemika, Hrvatska
Reducirani GSH (GSH)	Sigma-Aldrich, Njemačka
Ellmanov reagens (DTNB)	Sigma-Aldrich, Njemačka
NADPH	AppliChem GmbH, SAD
GSH reduktaza (GR)	Biobasic Canada Inc., SAD
Na₂HPO₄x2H₂O	AppliChem GmbH, Njemačka
Na₂HPO₄x12H₂O	Kemika, Hrvatska
Citokrom C	Sigma-Aldrich, SAD
Ksantin	Sigma-Aldrich, SAD
Ksantin oksidaza (50 jedinica/1,3 mL)	Sigma-Aldrich, SAD
SOD (SOD) iz govedih eritrocita	Sigma-Aldrich, SAD
NaH₂PO₄x2H₂O	Kemika, Hrvatska
Na₂HPO₄	Kemika, Hrvatska

Tablica 2. Popis pripreme svih korištenih otopina.

Otopina	Priprema otopine
Otopina D (Lowry)	Pomiješati otopine u omjeru A:B:C=48:1:1 A: 2% (w/v) Na ₂ CO ₃ u dH ₂ O B: 1% (w/v) natrij-kalij tartarat u dH ₂ O C: 0,5% (w/v) CuSO ₄ x5H ₂ O u dH ₂ O
Otopina E (Lowry)	Pomiješati Folin & Ciocalteu's phenol reagent i dH ₂ O u omjeru 2:1
8,1% SDS	0,81 g SDS-a u 10 mL dH ₂ O
20% octena kiselina	20 mL 99,5% octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH ₂ O i podesi pH=3,5 te nadopuni dH ₂ O do 100 mL
0,8% TBA	0,8 g TBA u 40 mL dH ₂ O uz lagano zagrijavanje. Dodaje se 500 µL 5M NaOH te se nadopuni s dH ₂ O do 100 mL. Priprema se svježe na dan pokusa.
0,5 M pufer PBS	17 mL 1 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (3 g Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O i dH ₂ O do 17 mL) i 183 mL 1 M Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O (65,5 g Na ₂ HPO ₄ x12 H ₂ O i dH ₂ O do 183 mL)
0,5 M EDTA	37,2 g EDTA i dH ₂ O do 200 mL
0,5 M pufer PBS s 0,25 M EDTA	200 mL 0,5 M pufer PBS i 200 mL 0,5 M EDTA
0,035 M HCl	7 mL 0,1 HCl u dH ₂ O do 200 mL
10 mM DTNB	20 mg DTNB i 0,5M pufer PBS s 0,25 M EDTA do 5 mL
0,8 mM NADPH	6,67 mg NADPH i 0,5M pufer PBS s 0,25 M EDTA do 10 mL
Mješavina GR	20 µL GR (50 U/mL) u 9980 µL 0,8 mM NADPH
50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O u 50 mL dH ₂ O) i 183 mL (5,678 g Na ₂ HPO ₄ u 200 mL dH ₂ O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A (za SOD)	190 mL 0,05 mM citokroma c (29 mg citokroma c u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
Otopina B enzima ksantin oksidaze (aktivnost 0,8 U/mL)	40 µL ksantin oksidaze i 960 µL dH ₂ O

Tablica 3. Popis najvažnijih korištenih uređaja i njihovih proizvođača.

Uređaj	Proizvođač
Ultrazvučni sonifikator Bandelin Sonoplus HD2070	Bandelin, Njemačka
Centrifuga Mikro 200R	Hettich, Njemačka
Spektrofotometar Libro S22	Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo
Čitač mikrotitarske pločice Model 550	Biorad, SAD

Tablica 4. Popis ostalog korištenog materijala i njihovih proizvođača.

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

3.5. Određivanje proteina metodom po Lowryju

Količina proteina u tkivima određena je metodom po Lowryju (Lowry i sur., 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 miševima. Uzorci tkiva mozga razrijeđeni su 10 puta u PBS-u. U epruvete je dodano po 100 μ L razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 2) i inkubirano je 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodano je 200 μ L otopine E (Tablica 2) te se zatim vorteksira i inkubira 30 min u mraku 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 (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL). Nagib pravca je određen korištenjem standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA, te su koncentracije proteina u uzorcima izračunate preko nagiba. Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL, a izmjereni proteini poslužili su kao jedinični indeks za izražavanje aktivnosti enzima SOD i koncentracije ukupnog glutaciona. Popis proizvođača navedenih kemikalija nalazi se u tablici 1.

3.6 Koncentracija ukupnog glutaciona (GSH)

Koncentracija ukupnog glutaciona u mozgu miševa određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (Tietze, 1969). Metoda se zasniva 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 recilirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutaciona 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.

Za mjerenje koncentracije ukupnog GSH korištena je mikrotitarska pločica. U jednu jažicu dodaje se 20 μL uzorka, 40 μL 0,035 M HCl i 40 μL 10 mM DTNB te se zatim mjeri apsorbanacija na valnoj duljini od 415 nm. Nakon toga se dodaje 100 μL otopina GR i NADPH i mjeri se apsorbanacija tijekom 5 min. Priprema navedenih otopina prikazana je u Tablici 2. PBS u reakcijskoj smjesi korišten je kao slijepa proba, a kao standard korištene su koncentracije reduciranog GSH (5-100 μM). Nacrtani su pravci za sve standarde kao promjena apsorbanacije u vremenu. Očitani su nagibi pravaca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni prava korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema formuli $(\text{nagib pravca}_{\text{uzorak}} - \text{nagib pravca}_{\text{slijepa proba}}) / \text{nagib pravca}_{\text{standard}}$. Koncentracija ukupnog GSH prikazuje se kao μg GSH po mg proteina. Popis proizvođača navedenih kemikalija nalazi se u tablici 1.

3.7 Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Prema metodi po Flohé i Ötting (Flohé i Ötting, 1971) određena je aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima. Superoksid dismutaza je metaloenzim koji katalizira dismutaciju dviju molekula superoksidnih radikala (O_2^-) u vodikov peroksid i kisik. Metoda se temelji na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (XOD).

U ovoj metodi korištene su dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 2) te je apsorbanacija 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 μL dH_2O i na kraju 20-30 μL XOD (0,8 U/mL) (Tablica 2). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja reakcijska smjesa prelivena je u kivetu i mjerena je promjena apsorbanacije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost XOD mora biti oko 0,025 U/min. U ovom slučaju volumen XOD koji je odgovarao bio je između 30-40 μL . Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD ($\Delta A \approx 0,0025$,

s obzirom na volumen XOD), analizirani su uzorci. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH₂O dodano je 25 µL uzorka te odgovarajući volumen XOD i odmah nakon toga mjerena je apsorbanacija 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.

3.8 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 µL 8,1%-tni SDS, 750 µL 20%-tne octene kiseline (pH=3,5), 750 µL 0,8%-tne TBA (pripremljeni kao što je prikazano u Tablici 2) i 100 µL 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 apsorbanacija pri 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izražena je kao nmol MDA po mg proteina. Popis proizvođača navedenih kemikalija nalazi se u tablici 1.

3.9 Statistička obrada podataka

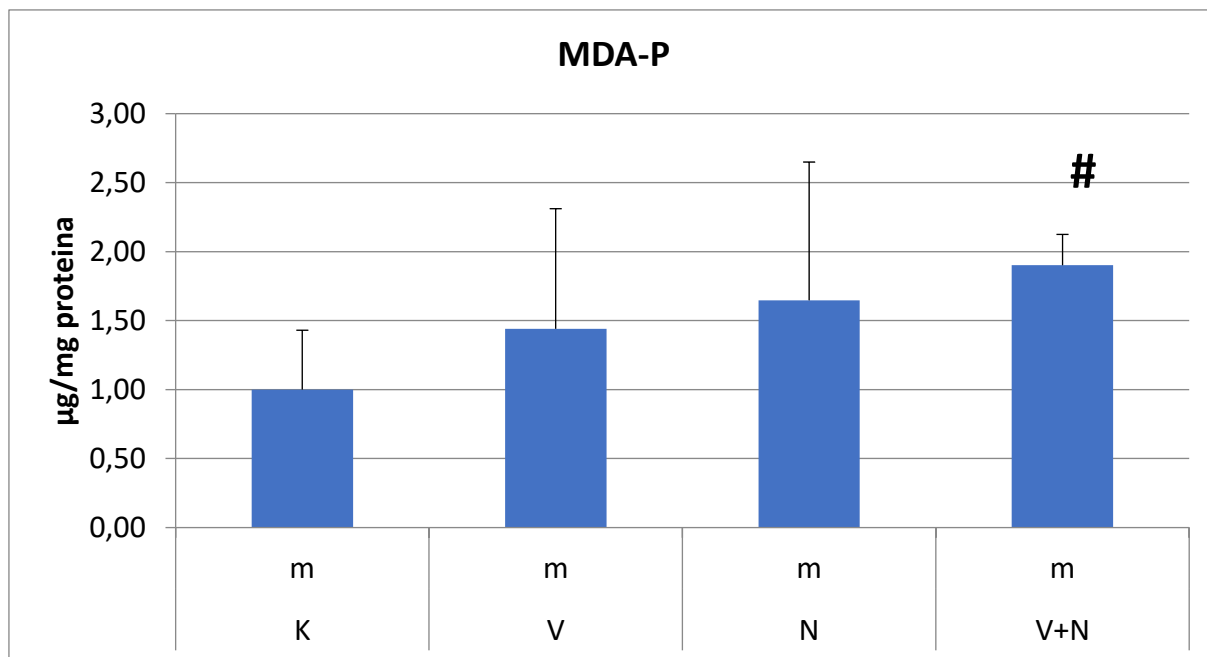
Za statističku obradu podataka korišten je Studentov t-test, a prikazane su razlike pojedine skupine s obzirom na tretman u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu. Analiza je provedena upotrebom programskog paketa Statistica 8 (Tulsa, USA). Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Dobivene p-vrijednosti navedene su u tablicama. Rezultati koji se statistički razlikuju na grafovima i u tablicama označeni su sa #.

4. REZULTATI

4.1 Mjerenje koncentracije malondialdehida (MDA)

4.1.1 Mjerenje MDA u frontalnom korteksu mozga

Muški miševi tretirani valproatom (slika 7) tijekom 15. dana ne pokazuju statistički značajnu promjenu ukupne koncentracije malondialdehida (MDA) u frontalnom kortkesa mozga u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom u dozi od 25 mg/kg tjelesne težine životinje ne pokazuju značajan statistički porast ukupnog MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom i valporatom pokazuju značajan statistički porast ukupnog MDA u odnosu na kontrolu.



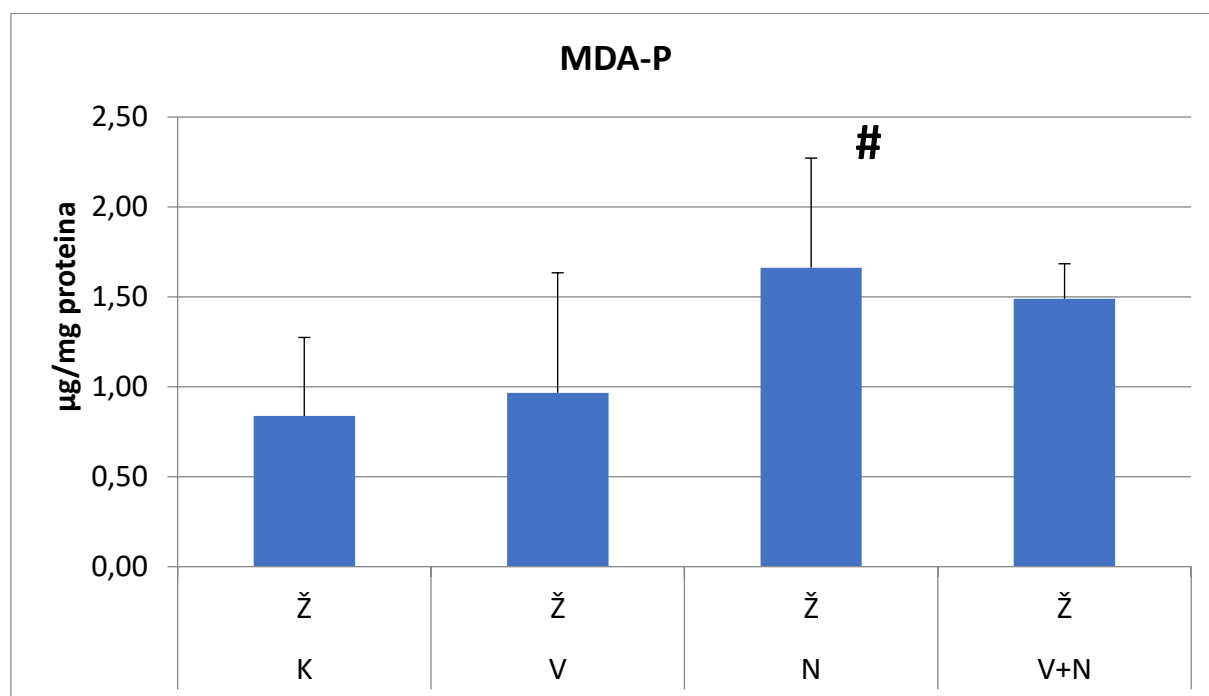
Slika 7. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu peroksidacije dobivene mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u frontalnom korteksu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 5. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 5. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za MDA u frontalnom korteksu muškog miša iz slike 7.

Frontalni korteks MDA	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,192209
naringenin	0,057958
valporat + naringenin	0,005561

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ženski miševi tretirani valproatom 15. dana (slika 8) ne pokazuju statistički značajnu promjenu ukupne koncentracije MDA u frontlanom korteksu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju značajan porast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom i valporatom ne pokazuju statistički značajnu porast MDA u odnosu na kontrolu.



Slika 8. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu peroksidacije dobivene mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u frontalnom korteksu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 6. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

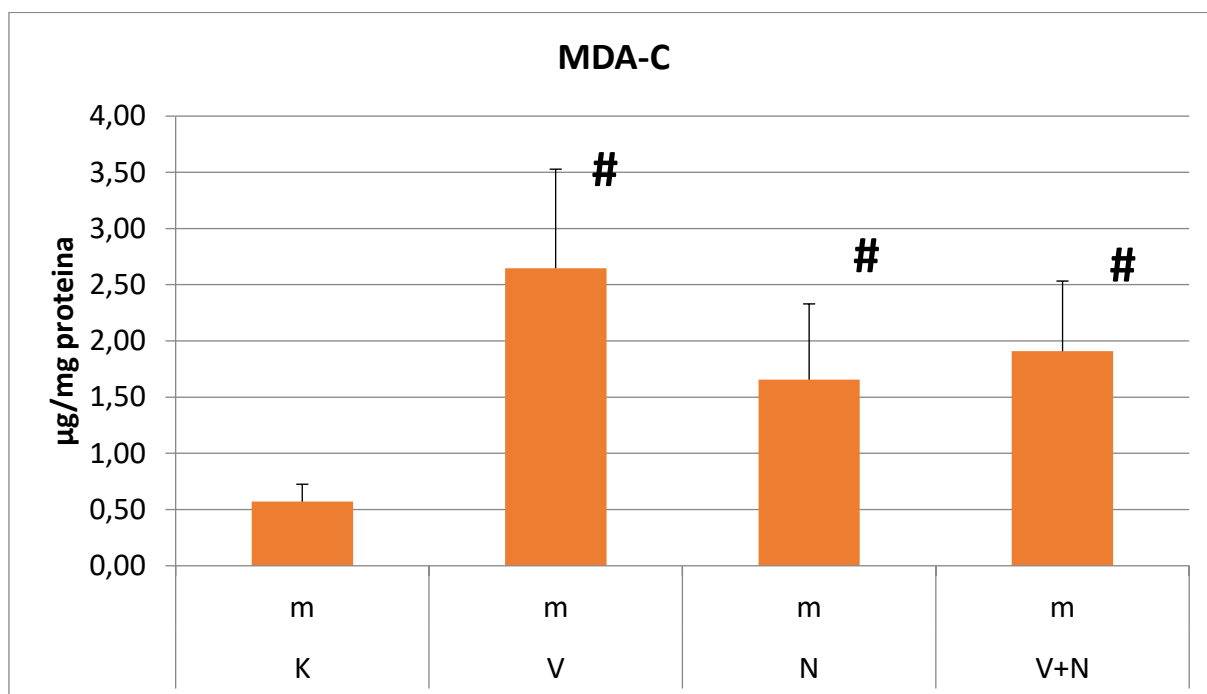
Tablica 6. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za MDA u frontalnom korteksu ženskog miša iz slike 8.

Frontalni korteks MDA	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,698774
naringenin	0,016841
valporat + naringenin	0,055886

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.1.2 Mjerenje MDA u centralnom korteksu mozga

U centralnom korteksu mozga miševa tretiranih valporatom (slika 9) došlo je do statistički značajnog rasta ukupne količine MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju rast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i valporatom i naringeninom pokazuju značajan rast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu.



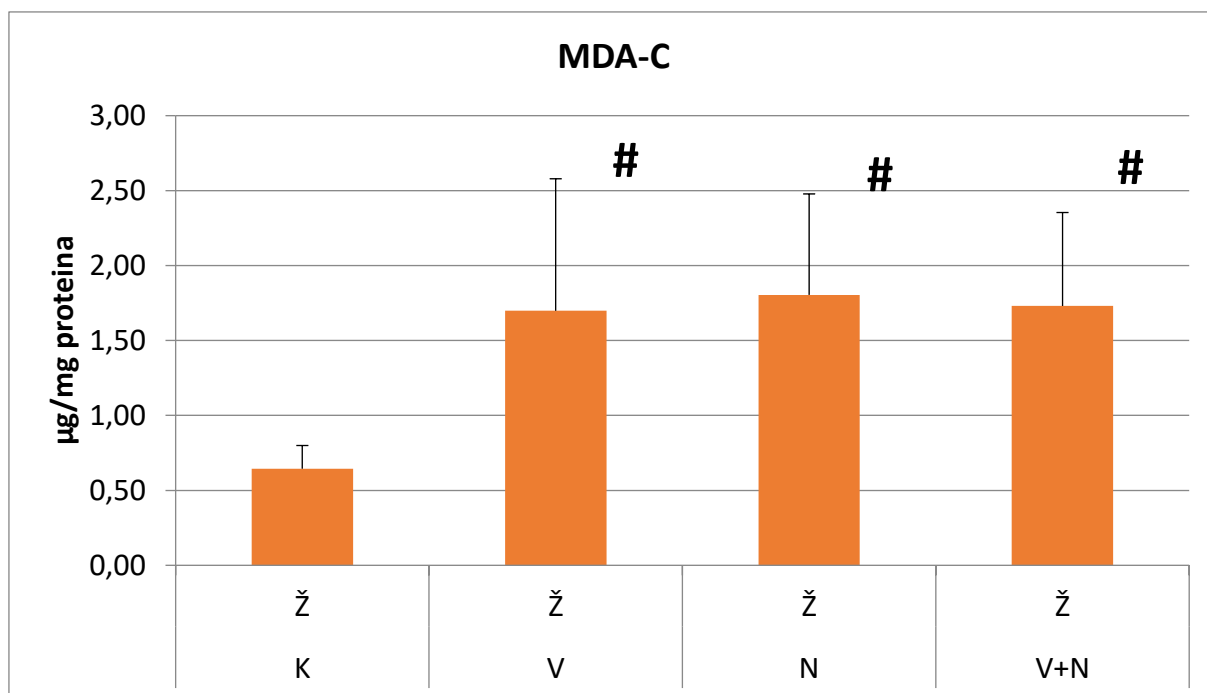
Slika 9. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu peroksidacije dobivene mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u centralnom korteksu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 7. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 7. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za MDA u centralnom korteksu muškog miša iz slike 9.

Centralni korteks MDA	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,000000
naringenin	0,000871
valporat + naringenin	0,000023

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

U centralnom korteksu mozga ženskih miševa tretiranih valporatom (slika 10) došlo je do značajnog porasta ukupne količine MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju rast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i valporatom i naringeninom pokazuju značajan rast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu.



Slika 10. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu peroksidacije dobivene mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u centralnom korteksu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 8. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

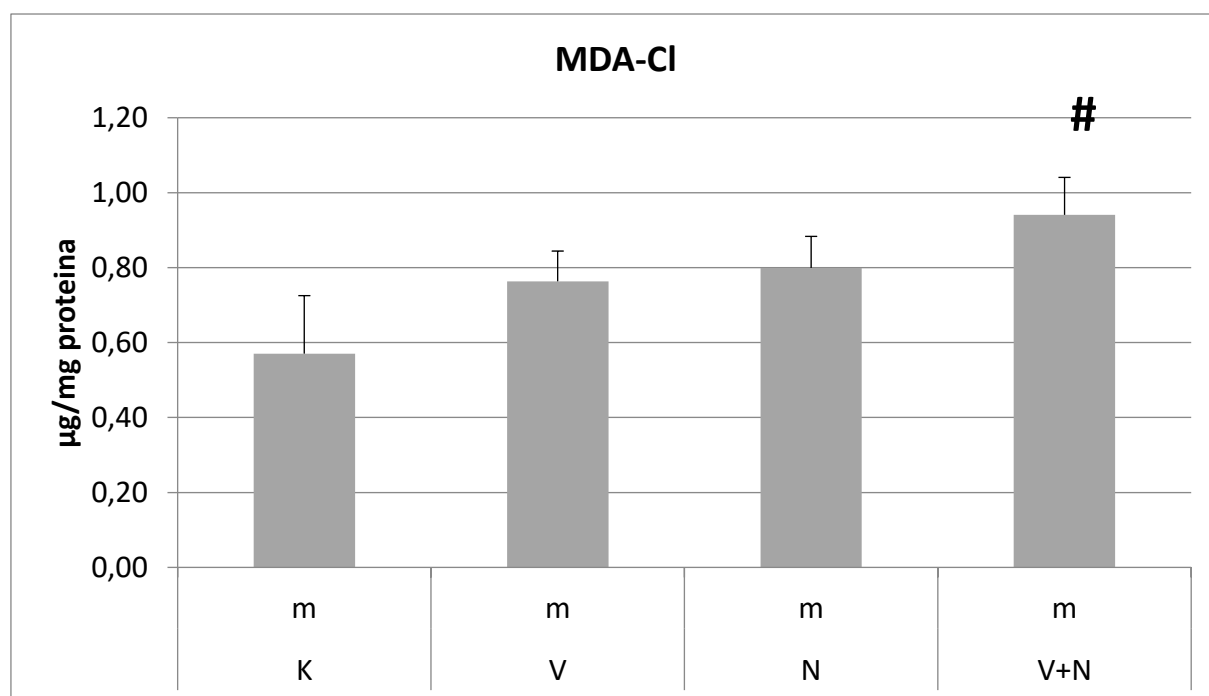
Tablica 8. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za MDA u centralnom korteksu ženskog miša iz slike 10.

Centralni korteks MDA	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,001181
naringenin	0,000418
valporat + naringenin	0,000867

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.1.3 Mjerenje MDA u malom mozgu

U malom mozgu muških miševa tretiranih valporatom (slika 11) nije došlo je do značajnog porasta ukupne količine MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom također ne pokazuju statistički važan rast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i valporatom i naringeninom pokazuju značajan rast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu.



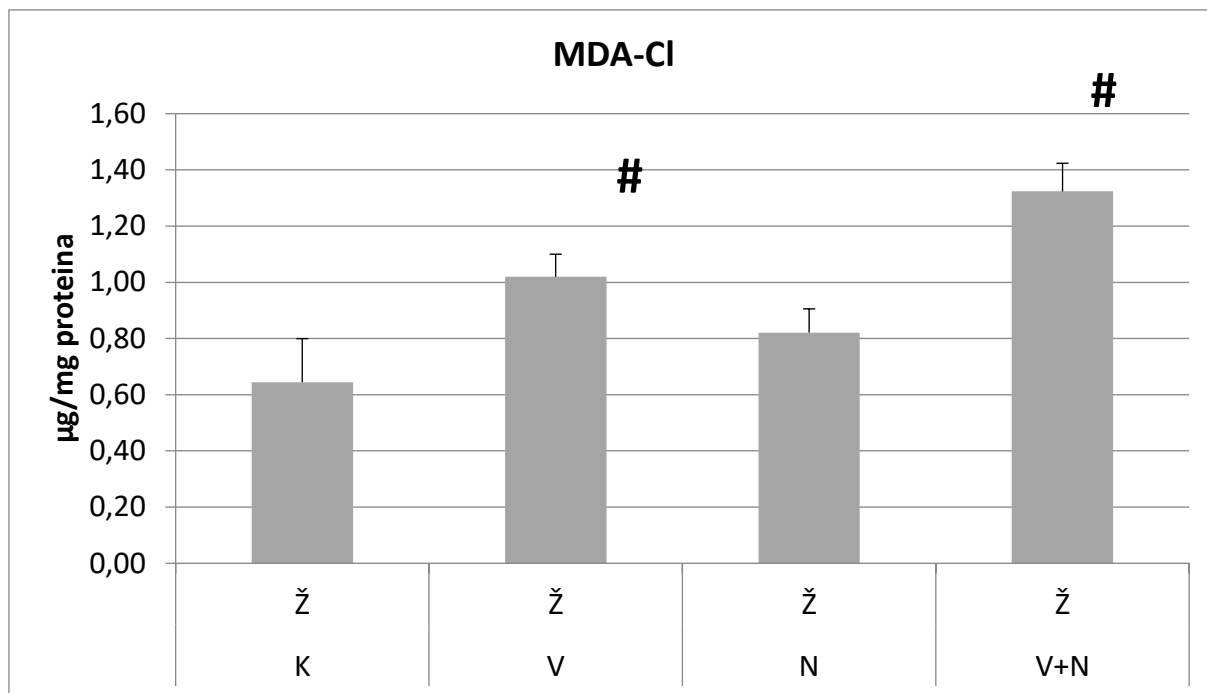
Slika 11. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu peroksidacije dobivene mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u malom mozgu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 9. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 9. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za MDA u malom mozgu muškog miša iz slike 11.

Mali mozak MDA	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,248848
naringenin	0,173514
valporat + naringenin	0,020292

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

U malom mozgu ženskih miševa tretiranih valporatom (slika 12) došlo je do značajnog porasta ukupne količine MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom ne pokazuju rast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i valporatom i naringeninom pokazuju značajan rast ukupne koncentracije MDA u odnosu na kontrolu.



Slika 12. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu peroksidacije dobivene mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u malom mozgu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 10. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 10. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za MDA u malom mozgu ženskog miša iz slike 12.

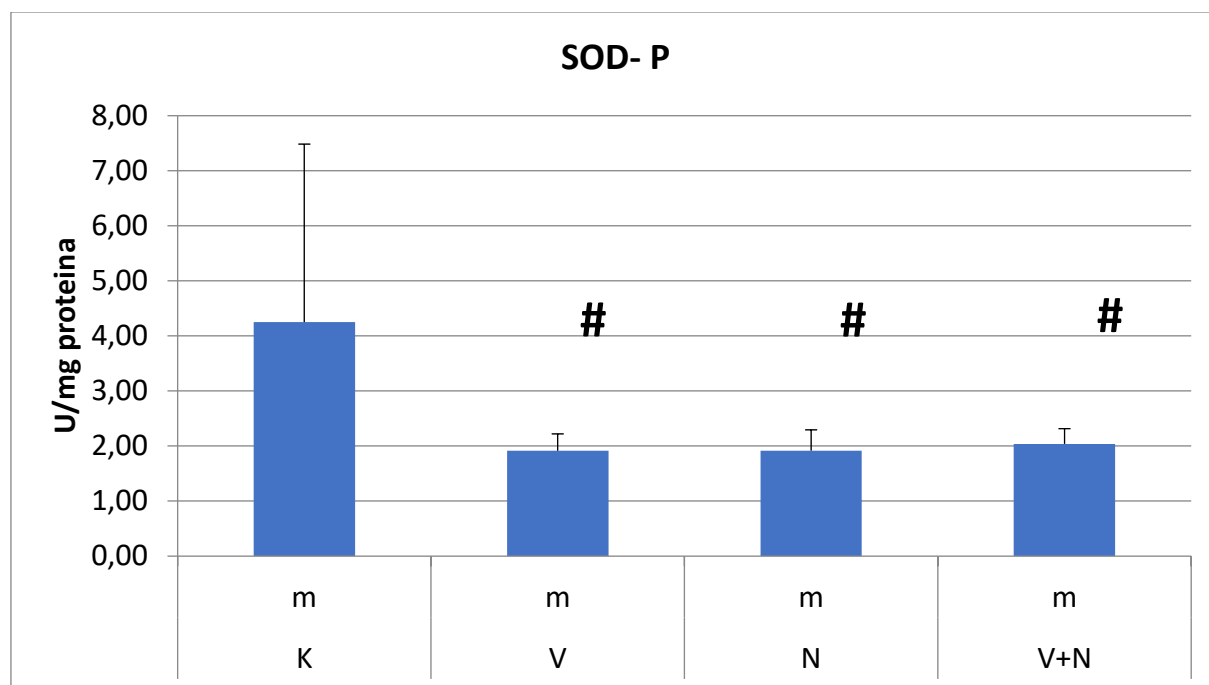
Mali mozak MDA	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,028351
naringenin	0,173514
valporat + naringenin	0,000171

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.2 Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

4.2.1 Mjerenje SOD u frontalnom korteksu mozga

Muški miševi tretirani valporatom (slika 13) tijekom 15. dana pokazuju značajano statističko smanjenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u frontalnom korteksu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju također smanjenje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i s naringeninom i valporatom pokazuju značajano smanjenje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu.



Slika 13. Utjecaj valproata i naringenina na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u frontalnom korteksu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. P vrijednosti prikazane su u tablici 11. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine.

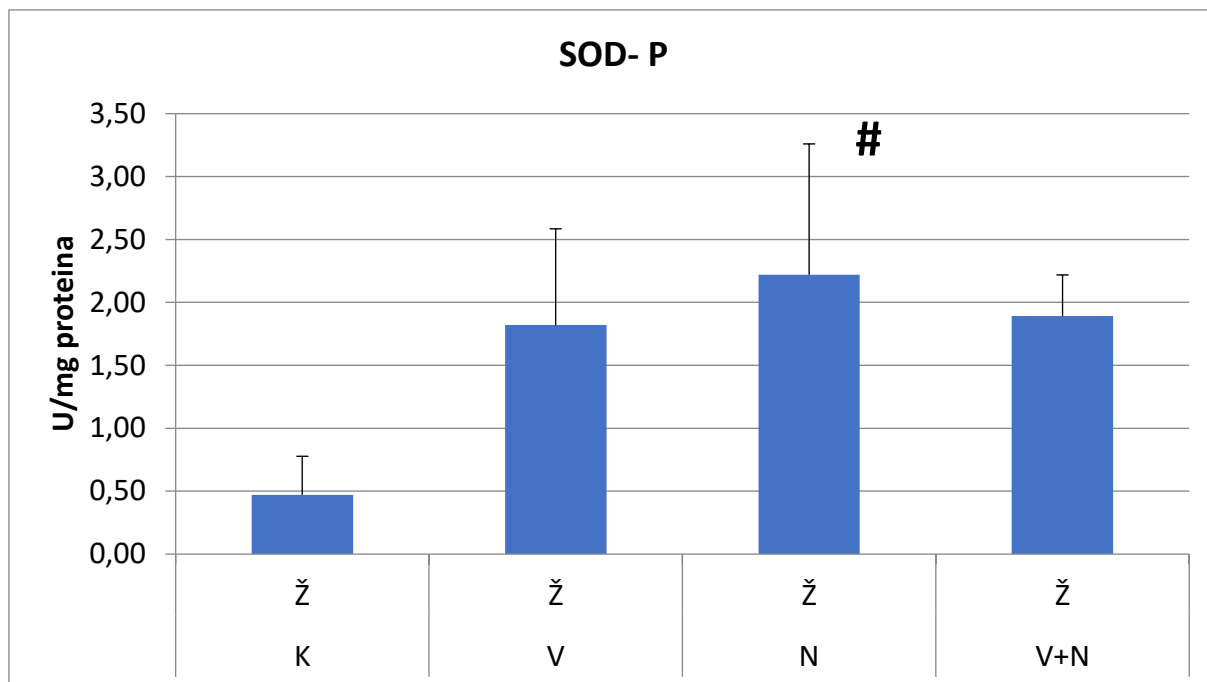
(K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 11. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za SOD u frontalnom korteksu muškog miša iz slike 13.

Frontalni korteks SOD	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,002259
naringenin	0,002268
valporat + naringenin	0,001909

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ženski miševi tretirani valporatom (slika 14) tijekom 15. dana ne pokazuju značajan statistički porast aktivnosti SOD u centralnom korteksu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju porast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i s naringeninom i valporatom ne pokazuju porast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu.



Slika 14. Utjecaj valproata i naringenina na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u frontalnom korteksu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 12. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

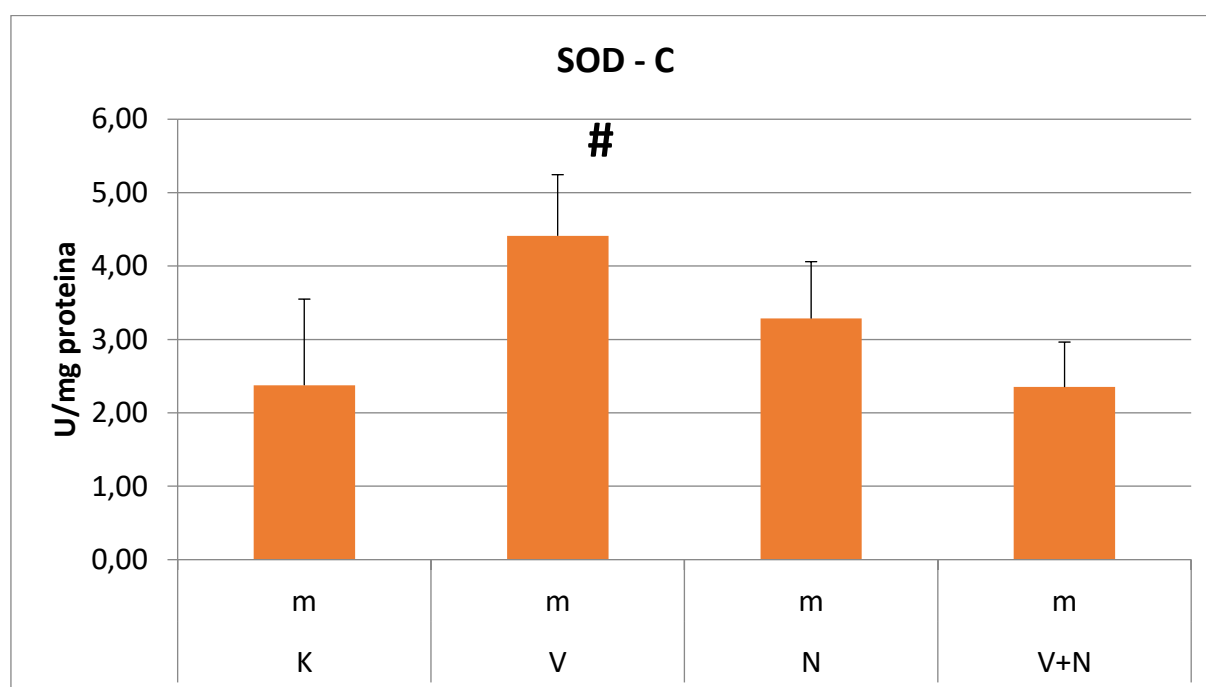
Tablica 12. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za SOD u frontalnom korteksu ženskog miša iz slike 14.

Frontalni korteks SOD	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,067875
naringenin	0,019362
valporat + naringenin	0,054976

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.2.2 Mjerenje SOD u centralnom korteksu mozga

Muški miševi tretirani valporatom (slika 15) pokazuju značajan statistički porast aktivnosti SOD u centralnom korteksu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom ne pokazuju statistički važan porast ukupne aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i s naringeninom i valporatom također ne pokazuju statistički važan porast SOD u odnosu na kontrolu.



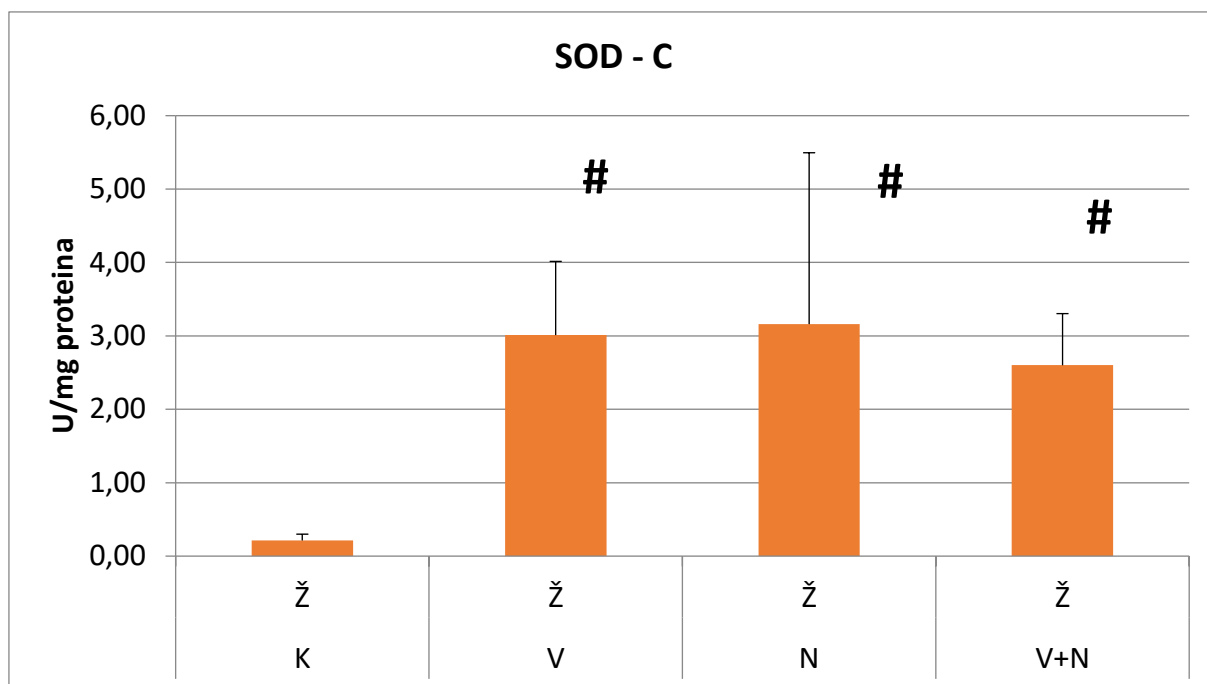
Slika 15. Utjecaj valproata i naringenina na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u centralnom korteksu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 13. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 13. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za SOD u centralnom korteksu muškog miša iz slike 15.

Centralni korteks SOD	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,001620
naringenin	0,140954
valporat + naringenin	0,965066

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ženski miševi tretirani valporatom (slika 16) pokazuju značajan statistički poras taktivnosti SOD u centralnom korteksu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju porast SOD u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i s naringeninom i valporatom također pokazuju značajan rast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu.



Slika 16. Utjecaj valproata i naringenina na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u centralnom korteksu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 14. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

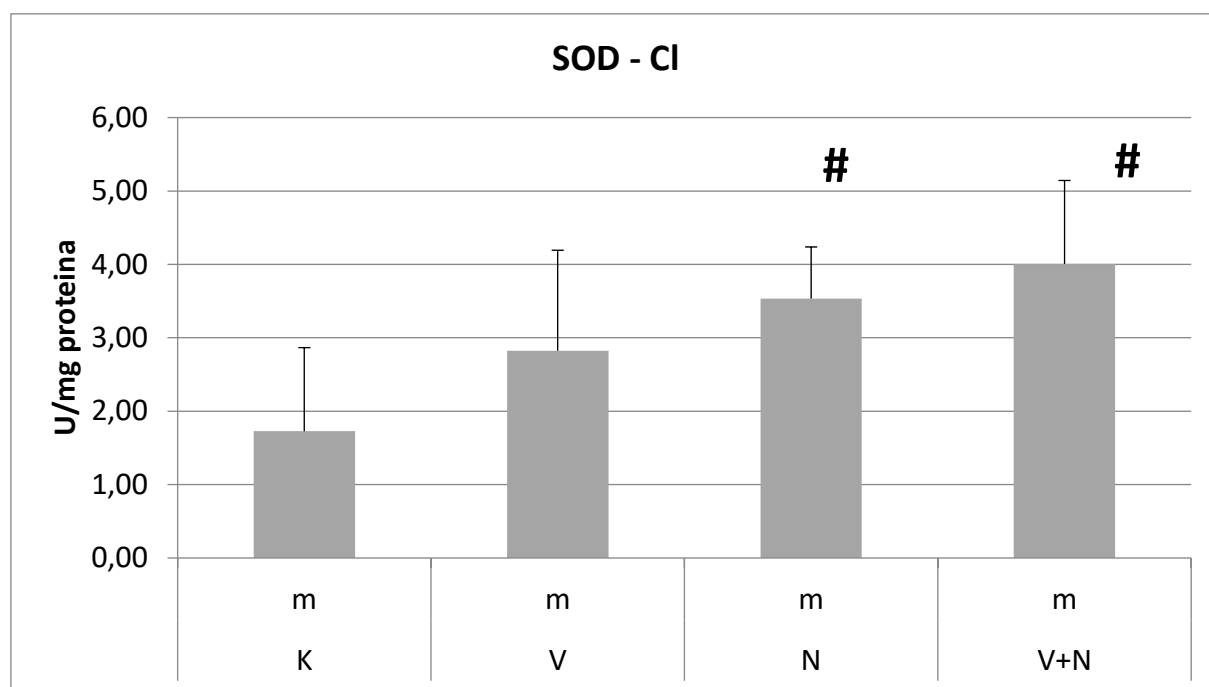
Tablica 14. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za SOD u centralnom korteksu ženskog miša iz slike 16.

Centralni korteks SOD	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,000033
naringenin	0,000015
valporat + naringenin	0,000286

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.2.3 Mjerenje SOD u malom mozgu

Muški miševi tretirani valporatom (slika 17) ne pokazuju značajan statistički rast aktivnosti koncentracije SOD u malom mozgu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju porast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i s naringeninom i valporatom pokazuju značajan rast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu.



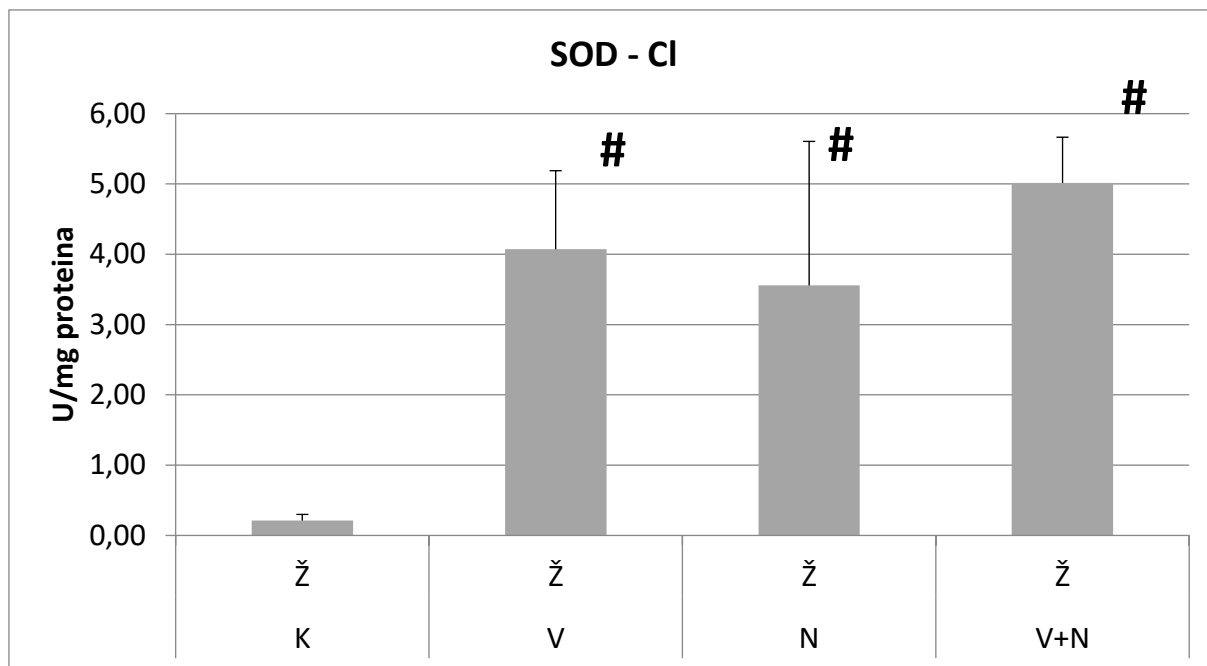
Slika 17. Utjecaj valproata i naringenina na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u malom mozgu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 15. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 15. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za SOD u frontalnom korteksu muškog miša iz slike 17.

Mali mozak SOD	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,093251
naringenin	0,007019
valporat + naringenin	0,000398

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ženski miševi tretirani valporatom (slika 18) pokazuju statistički rast aktivnosti SOD u malom mozgu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju porast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani i s naringeninom i valporatom pokazuju značajan rast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu.



Slika 18. Utjecaj valproata i naringenina na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u malom mozgu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 16. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 16. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za SOD u frontalnom korteksu ženskog miša iz slike 18.

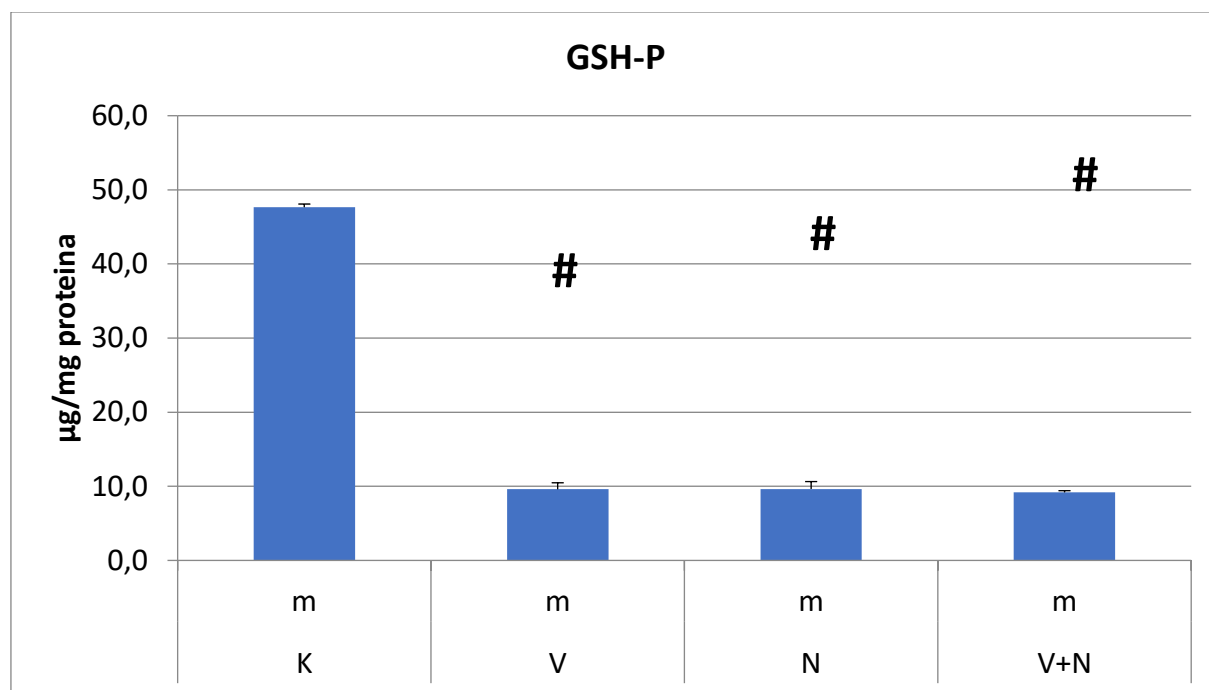
Mali mozak SOD	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,000000
naringenin	0,000004
valporat + naringenin	0,000000

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.3 Mjerenje koncentracije glutationa (GSH)

4.3.1 Mjerenje GSH u frontalnom korteksu mozga

Muški miševi tretirani valproatom (slika 19) tijekom 15. dana pokazuju statistički značajan pad ukupne koncentracije glutationa (GSH) u frontalnom korteksu mozga u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom u dozi od 25 mg/kg tjelesne težine životinje također pokazuju značajan statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom i valporatom pokazuju statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu.



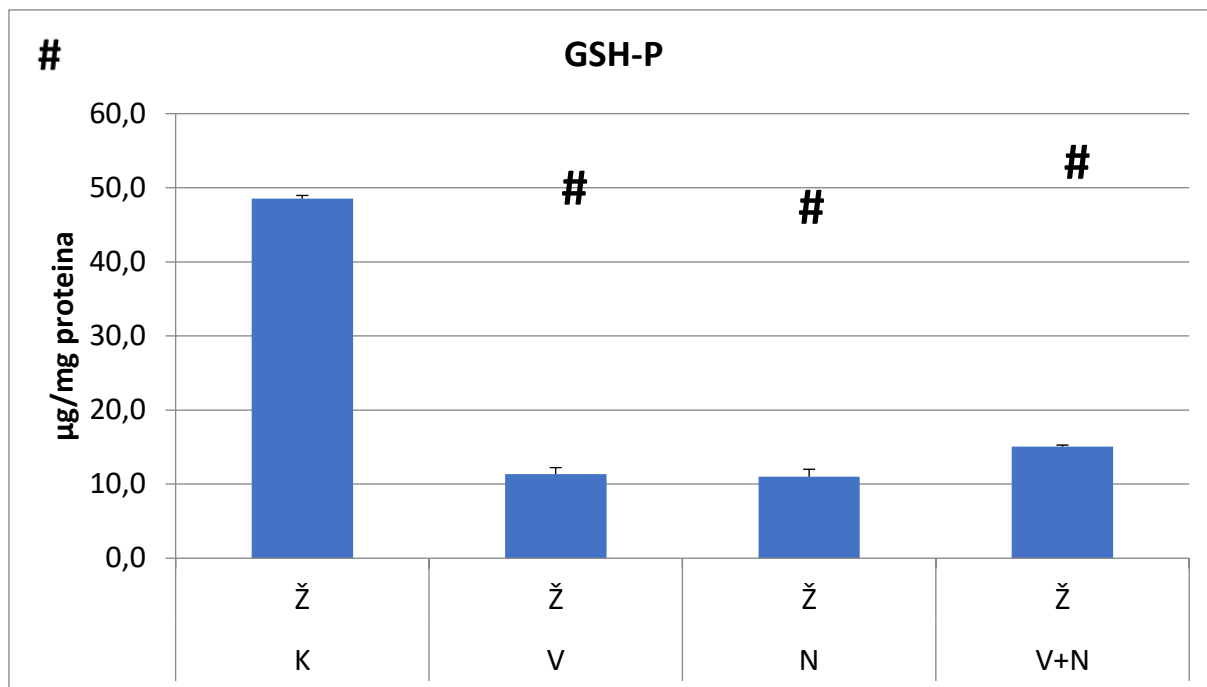
Slika 19. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu glutationa (GSH) u frontalnom korteksu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 17. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 17. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za GSH u frontalnom korteksu muškog miša iz slike 19.

Frontalni korteks GSH	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,000000
naringenin	0,000000
valporat + naringenin	0,000000

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ženski miševi tretirani valproatom (slika 20) tijekom 15. dana pokazuju značajan pad ukupne koncentracije GSH u frontalnom korteksu mozga u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom u dozi od 25 mg/kg tjelesne težine životinje pokazuju značajan statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom i valproatom pokazuju statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu.



Slika 20. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu glutationa (GSH) u frontalnom korteksu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 18. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

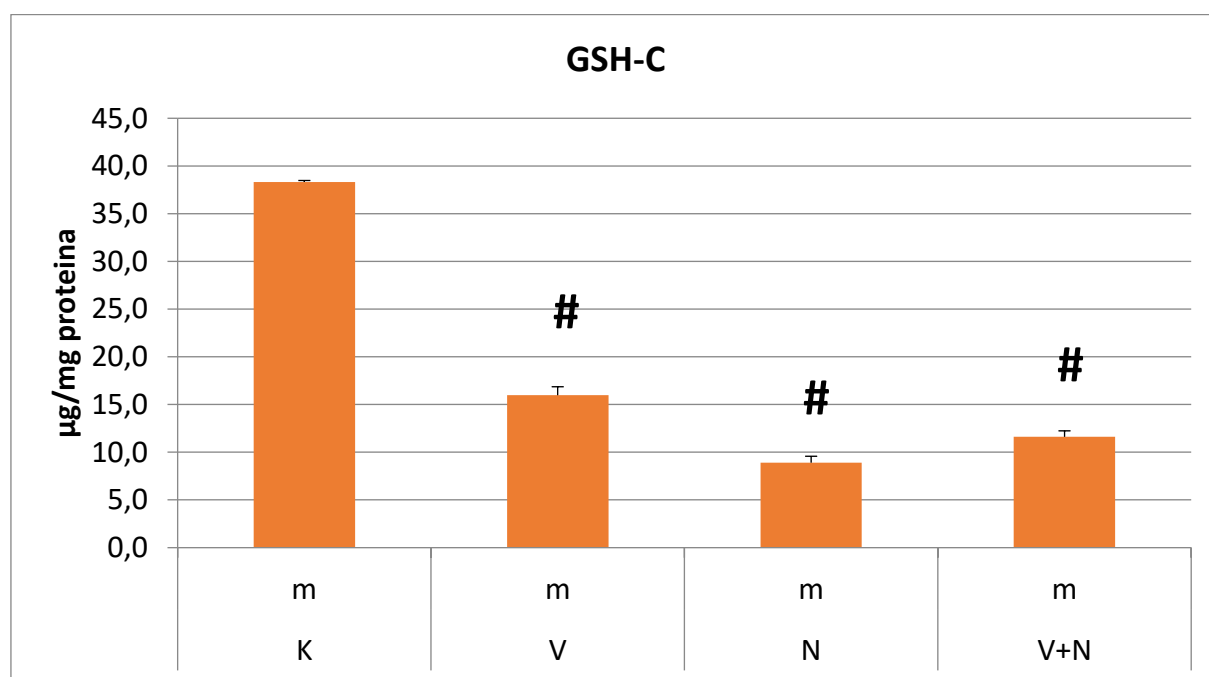
Tablica 18. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za GSH u frontalnom korteksu ženskog miša iz slike 20.

Frontalni korteks GSH	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,000000
naringenin	0,000000
valporat + naringenin	0,000000

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.3.2 Mjerenje GSH u centralnom korteksu mozga

Muški miševi tretirani valproatom (slika 21) pokazuju statistički značajan pad ukupne koncentracije GSH u centralnom korteksu mozga u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom također pokazuju značajan statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom i valporatom pokazuju statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu.



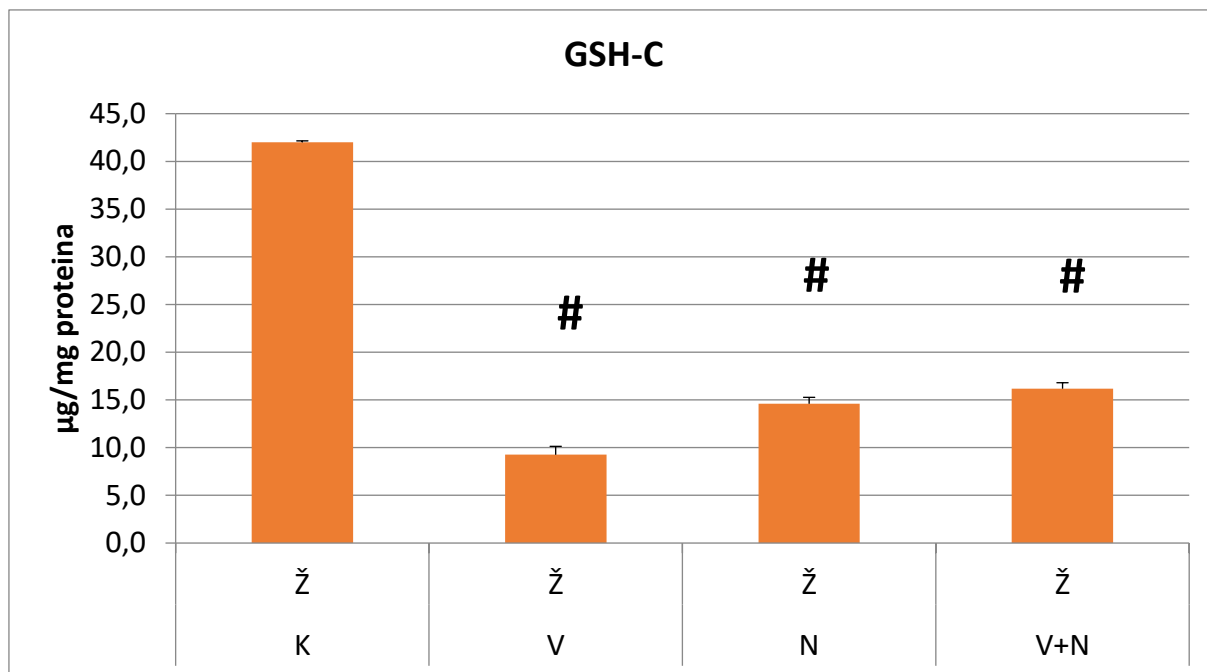
Slika 21. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu glutationa (GSH) u centralnom korteksu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 19. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 19. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za GSH u centralnom korteksu muškog miša iz slike 21.

Centralnom korteksu GSH	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,008116
naringenin	0,000374
valporat + naringenin	0,014835

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ženski miševi tretirani valproatom (slika 22) pokazuju statistički pad ukupne koncentracije GSH u centralnom korteksu mozga u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom pokazuju značajan statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom i valproatom pokazuju statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu.



Slika 22. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu glutationa (GSH) u centralnom korteksu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 20. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

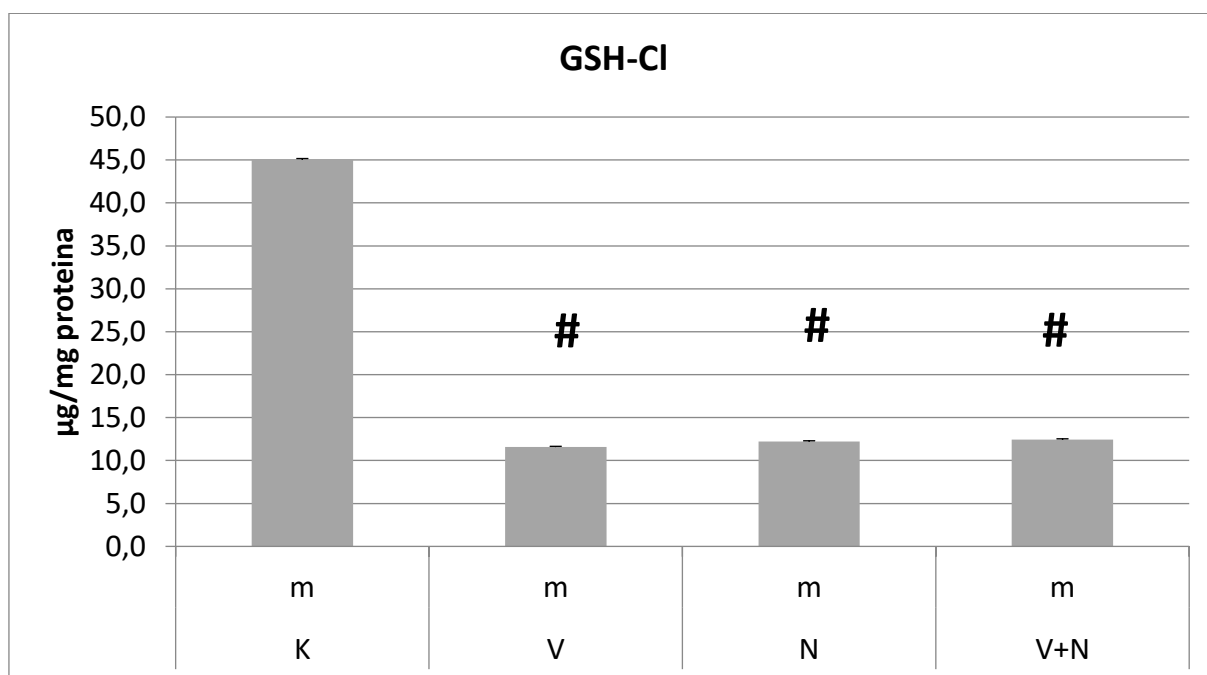
Tablica 20. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za GSH u centralnom korteksu ženskog miša iz slike 22.

Centralnom korteksu GSH	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,000059
naringenin	0,002043
valporat + naringenin	0,000643

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.3.3 Mjerenje GSH u malom mozgu

Muški miševi tretirani valproatom (slika 23) pokazuju statistički značajan pad ukupne koncentracije GSH u malom mozgu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom također pokazuju značajan statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom i valporatom pokazuju statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu.



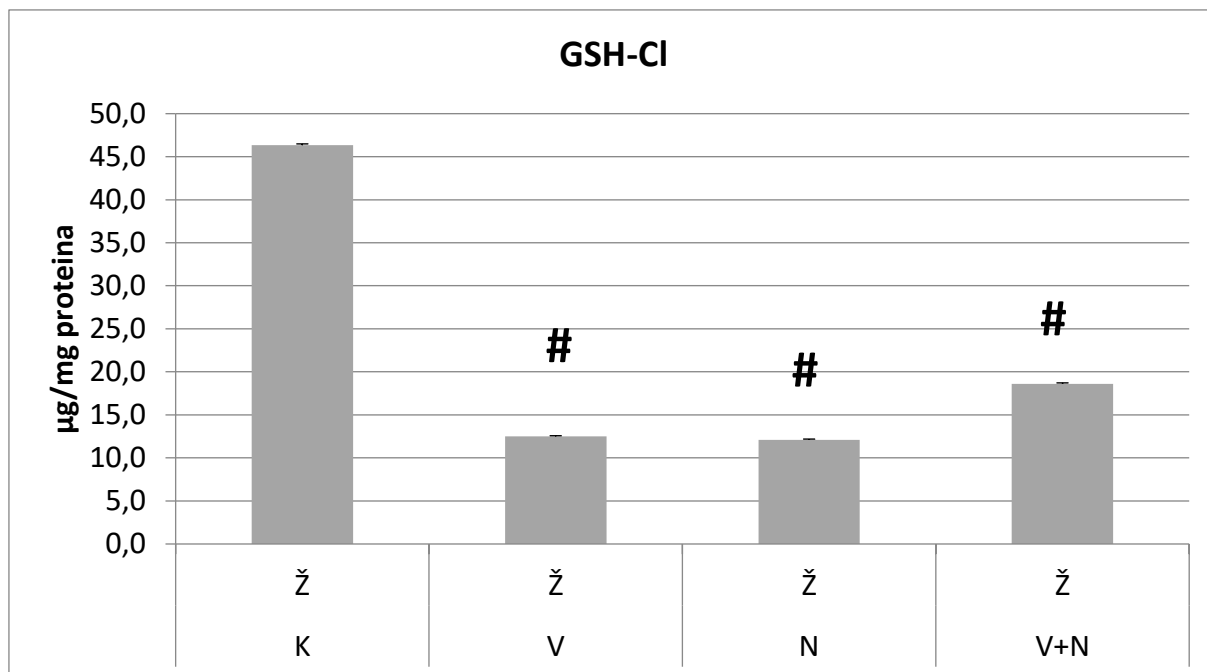
Slika 23. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu glutationa (GSH) u malom mozgu muškog miša (m) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 21. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 21. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za GSH u malom mozgu muškog miša iz slike 23.

Mali mozak GSH	p-vrijednost vs kontrola muški
valporat	0,000155
naringenin	0,000199
valporat + naringenin	0,006679

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ženski miševi tretirani valproatom (slika 24) pokazuju značajni statistički pad ukupne koncentracije GSH u malom mozgu u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom također pokazuju značajan statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu. Miševi tretirani naringeninom i valproatom pokazuju statistički pad ukupnog GSH u odnosu na kontrolu.



Slika 24. Utjecaj valproata i naringenina na ukupnu količinu glutaciona (GSH) u malom mozgu ženskog miša (Ž) u usporedbi s kontrolnim miševima. Prikaz p vrijednosti u tablici 22. Oznaka # označuje skupinu koja je statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrolne skupine. (K=kontrola, V=valporat, N=naringenin, V+N= valporat + naringenin)

Tablica 22. Prikaz p vrijednosti dobivenih LSD testom za GSH u malom mozgu ženskog miša iz slike 24.

Mali mozak GSH	p-vrijednost vs kontrola ženski
valporat	0,000101
naringenin	0,000042
valporat + naringenin	0,000425

Crveno obojenje p vrijednosti predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.

5.RASPRAVA

Rezultati ukazuju da valproat u neuralnom tkivu u sve tri regije mozga može izazvati oksidacijski stres jer je u mužjaka i ženki, tretman valproatom i naringeninom, te njihovim kombinacijama uzrokovao povećanu lipidnu peroksidaciju budući da je utvrđen porast koncentracije molekule MDA. Lipidna peroksidacija najviše je izražena u malom mozgu mužjaka i ženki u svim tretmanima. Najviše se ističe združeni učinak istovremenog uzimanja valproata i naringenina koji izazivaju i najveći porast koncentracije MDA.

Ovi rezultati ukazuju da obje kemikalije, a posebice njihov združeno uzimanje uzrokuje oksidacijski stresan učinak na neuralno tkivo bez obzira na spol. I literaturni podatci poklapaju se sa našim rezultatima. Tako primjerice, 2012. godine znanstvenici Chaudhary i Parvez proveli su istraživanje o utjecaju valproata na neurotoksičnost u mladih štakora na malom mozgu i cerebralnom korteksu in vitro (Chaudhary i Parvez, 2012). Istraživanje je pokazalo značajan porast razine markera oksidacijskog stresa lipidne peroksidacije i karboniliranih proteina. Razine oba markera bile su znatno više nego kod kontrole. Također, došlo je i do značajnog smanjenja razine reduciranog glutationa (GSH) i neproteinskih tiola (NP-SH) ali nije bilo značajno povećanje ili smanjenje koncentracija ukupnog tiola (T-SH) i proteinskog tiola (P-SH). VPA je također pokazao značajno smanjenje aktivnosti glutationa i smanjenje aktivnosti enzima kao što su glutation-S-transferaza (GST), glutation reduktaza (GR) i glutation peroksidaza (GPx) i drugi antioksidacijskih enzima poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) u malom mozgu i cerebralnom korteksu. Značajno povećanje također je zapaženo u aktivnosti ksantina oksidaze. Rezultati pokazuju da VPA inducira oksidativni stres kompromitiranjem antioksidativnog statusa neuronskog tkiva.

I u ljudi je zabilježeno da tretman valproatom uzrokuje oksidativni stres. Grosso i suradnici (Grosso i sur., 2011), koji su proveli istraživanje na tri grupe pacijenata, pri čemu su u skupina 1 (N = 34) bili 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), a u skupini 3 (N = 22) bile zdrave kontrole. Svi pacijenti i zdrava djeca podvrgnuti su vađenju krvi radi procjene redoks statusa mjerenjem razine F2-izoprostana (F2-

izo), naprednih produkata oksidacijskih proteina (AOPP), ne-protein vezujućeg željezo (NPBI), tiola (-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, odnosno povećan oksidacijski stres. Nasuprot tome, nije bilo neke bitne razlike u koncentracijama NPBI u plazmi između skupine 1 i kontrole. Nadalje, nije bilo 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 redoks status zabilježen je u bolesnika s idiopatskom epilepsijom pod dugotrajnom monoterapijom VPA. Budući da je u ljudi nemoguće mjeriti markere oksidacijskog stresa u mozgu, rezultati u krvi indirektno govore o oksidativnom stresu pacijenata.

Najvjerojatnije valproat može utjecati na prijenos elektrona u antioksidacijskom lancu tako da se ili direktno veže na neku biološku komponentu lanca kao recimo SOD ili da direktno preuzima elektron na sebe te na te načine povećava ukupnu količinu nastalog ROS-a. Iako literatura napominje smanjenje aktivnosti SOD-a, naši rezultati pokazuju da sukladno povećanoj lipidnoj peroksidaciji raste i aktivnost SOD-a u svim regijama mozga i u mužjaka i u ženki. Očito je u neuralnom tkivu povećana koncentracija superoksidnog aniona, a povećana aktivnost superoksid dismutaze pokušava ukloniti ovaj radikal. Naime, u literaturi su zabilježeni rezultati u mjerenju aktivnosti SOD-a u krvi gdje se valproat pretvara u anion koji se veže na SOD i inhibira njegovu funkciju (Wells i sur., 2010). Yiş i suradnici (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-ero bolesnika liječeno valproičnom kiselinom za idiopatsku epilepsiju i dvadeset i jedno zdravo dijete. Malondialdehid kao pokazatelj lipidne peroksidacije i antioksidacijski enzimi koji uključuju superoksid dismutazu i glutation peroksidazu bili su mjereni u eritrocitima. Razine malondialdehid bile su značajno niže, a aktivnost superoksid dismutaze je neznatno viša u bolesnika s novodijagnosticiranom epilepsijom. Razine glutation peroksidaze nisu se razlikovale među skupinama. Autori su zabilježili da je tijekom liječenja s valproičnom kiselinom, lipidna peroksidacija bila povećana,

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.

Nadalje, u jetrenim stanicama HEPG2 u staničnoj kulturi Komulainen i suradnici (Komulainen i sur., 2015), utvrdili su smanjenje 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. U drugim tkivima primjerice u bubregu, u pokusu Gezginci-Oktayoglu i suradnici (Gezginci-Oktayoglu i sur., 2016), s ciljem ispitivanja učinka vitamina U (S – metilmetionin) na oksidacijski stres, upalu i fibrozu u štakora s bubrežnim oštećenjima uzrokovanih sa VPA, i zabilježili povećanje aktivnosti katalaze, superoksid dismutaze i razine glutaciona. Očito je da različita tkiva različito aktiviraju superoksid dismutazu.

Literaturni podaci navode da pri oksidaciji valproata u citoplazmi s citokromom P450 nastaje produkt 4-eneVPA koji onda dalje u mitohondriju beta oksidacijom prelazi u 2,4-diene VPA. 2,4-diene VPA se zatim konjugira u tiolne pomoću GSH što smanjuje njegovu koncentraciju u mitohondriju i pridonosi stvaranju ROS (Wells i sur., 2010). Također valproat je pokazao i utjecaj na ne-enzimske antioksidanse gdje se vidi značajna potrošnja GSH i ne proteinske tiolne aktivnosti ali se pritom ne vidi značajno povećanje ili smanjenje u ukupnoj koncentraciji tiola i protein tiola. Uočeno je i znatno smanjenje aktivnosti enzima glutation S-tranferaze, glutation reduktaze i glutation peroksidaze kao i drugih antioksidacijskih enzima kao superoksid dismutaze i katalaze u malom i velikom mozgu. Značajno povećanje također je zabilježeno u aktivnosti ksantin oksidaze. U našim rezultatima utvrđena je izrazito snižena koncentracija reduciranog glutaciona u svim regijama mozga i u svim tretiranim skupinama govori da je, vjerojatno zbog povećanog superoksidnog radikala i oksidacijske ravnoteže u stanici glutation prešao iz reduciranog u oksidirani oblik, najvjerojatnije kao obrana živčanog tkiva pod oksidacijskim stresom. Graf i suradnici (Graf i sur., 1998), ispitali su aktivnost pet antioksidacijskih enzima (glutacion peroksidaza (GSH-Px), glutation reduktaza (GSSG-R),

glutation transferaza, superoksid dismutaze i katalaze u eritrocitima i GSH-Px u plazmi.) u 15 pacijenata kod kojih je došlo de negativne reakcije na VPA i usporedili te rezultate s rezultatima dobivenim kod 35 pacijenata koji nisu imali nekakve štetne posljedice VPA tretmanom i s 50 potpuno zdravih pacijenata istih godina. Ustanovljeno je da kod pacijenata s VPA-povezanim SAE, aktivnost GSH-Px je bila značajno smanjena a GSSG-R je bio značajno povišen u odnosu na druge dvije skupine.

Suprotno pretpostavljenoj hipotezi o protektivnom učinku polifenolne molekule naringenina, rezultati pokazuju da u tretiranoj dozi naringenin, kao strana tvar (ksenobiotik), u mozgu djeluje prooksidativno. Literaturni podaci ne poklapaju se s našim rezultatima. Tako primjerice, 2014. godine, Chtourou i suradnici (Chtourou i sur., 2014) proveli su istraživanje na Wistar štakorima s ciljem otkrivanja mehanizma neuroprotekcije naringenina protiv neurotoksičnosti inducirane željezom u cerebralnom korteksu. Životinje koje su dobivale ponavljajuće injekcije željezo dekstrana tijekom ukupno 4 tjedna pokazale su značajno povećanje lipidnih i proteinskih markera kao što je tiobarbiturna kiselina, povećanje razine kraboniliranih proteina i DNA apoptoze u cerebralnom korteksu. Ove su promjene bile popraćene smanjenjem enzimskih antioksidansa, kao što su superoksid dismutaza i katalaza. Aktivnost glutation-peroksidaze ostala je nepromijenjena, a pokazala se i značajno smanjenje aktivnosti acetazolin-esteraze i $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPaze}$ s značajnim porastom razine dušikovog oksida. Istodobna primjena naringenina i željeza kod štakora značajno je poboljšala aktivnost antioksidacijskih enzima i oslabila oksidacijska oštećenja uočena u cerebralnom korteksu. Također i istraživanje koje su proveli Shakeel i suradnici 2017 (Shakeel i sur., 2017) godine došlo je do sličnih zaključaka. Oni su proveli istraživanje o učinku naringenina na oksidativni stres u epilepsiji induciranoj pilokarpinom u hipokampusu miša. Rezultati su pokazali da miševi liječeni oralno s naringeninom imaju značajno smanjenje lipidne peroksidacije. Nadalje, došlo je do značajnog oporavka sadržaja glutaciona , katalaze, superoksid dismutaze i glutation reduktaze. Također, u slučaju ispitivanih parametara ponašanja, naringenin je pokazao smanjenje težine napadaja.

Sve navedeno upućuje na to da VPA uzrokuje oksidacijski stres u mozgu interferiranjem u rad enzima antioksidacijskog sustava.

Glavni opći zaključak mogao bi biti potencijalna preporuka za detaljnije istraživanje prehrane pacijenata koji uzimaju valproat i hranu bogatu naringeninom (primjerice citrusi). Rezultati ukazuju na to da postoji vjerojatnost da bi se u pacijenta koji uzimaju valproat i hranu bogatu naringeninom mogle dogoditi slične štetne promjene u redoks ravnoteži u neuralnom tkivu.

6. ZAKLJUČCI

1. U mužjaka i ženki, u sve tri regije mozga, tretman valproatom i naringeninom, te njihovim kombinacijama uzrokuje povećanu lipidnu peroksidaciju jer je utvrđen porast koncentracije molekule MDA.
2. Lipidna peroksidacija najviše je zabilježena u cerebelumu mužjaka i ženki u svim tretmanima. Najviše se ističe združeni učinak istovremenog uzimanja valproata i naringenina koji izaziva najveći porast koncentracije MDA. Ovi rezultati ukazuju da obje kemikalije, a posebice njihovo združeno uzimanje uzrokuje oksidacijski stresan učinak na neuralno tkivo bez obzira na spol.
3. Suprotno pretpostavljenoj hipotezi o protektivnom učinku polifenolne molekule naringenina, rezultati pokazuju da u tretiranoj dozi naringenin, kao strana tvar (ksenobiotik), u mozgu djeluje prooksidativno.
4. Sukladno povećanoj lipidnoj peroksidaciji raste i aktivnost SOD-a u svim regijama mozga i u mužjaka i u ženki. Očito je u neuralnom tkivu povećana koncentracija superoksidnog aniona a povećana aktivnost superoksid dismutaze pokušava ukloniti ovaj radikal.
5. Izrazito snižena koncentracija reduciranog glutationa u svim regijama mozga i u svim tretiranim skupinama govori da je, vjerojatno zbog povećanog superoksidnog radikala i oksidacijske ravnoteže u stanici glutation prešao iz reduciranog u oksidirani oblik, najvjerojatnije kao obrana živčanog tkiva pod oksidacijskim stresom.
6. Glavni opći zaključak mogao bi biti potencijalna preporuka za detaljnije istraživanje prehrane pacijenata koji uzimaju valproat i hranu bogatu naringeninom (primjerice citrusi). Rezultati ukazuju na to da postoji vjerojatnost da bi se u pacijenta koji uzimaju valproat i hranu bogatu naringeninom mogle dogoditi slične promjene u redoks ravnoteži u neuralnom tkivu.

7. LITERATURA

Abel T., Zukin S. (2008): Epigenetic Targets of HDAC Inhibition in Neurodegenerative and Psychiatric Disorders. *Current Opinion in Pharmacology* 8(1): 57-64.

Armeanu S., Bitzer M., Bitzer M. (2005): Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Research* 65(14): 6321–6329.

Battino D., Dukes M.N.G., Perucca E. (2000): Anticonvulsants. U: Dukes M.N.G. (ur.), Aronson J.K. (ur.). *Meyler's side effects of drugs*. 14th ed. Amsterdam, Elsevier Science BV 164-197.

Biton V., Mirza W., Montouris G., Voung A., Hammer A.E., Barrett P.S. (2001): Weight change associated with valproate and lamotrigine monotherapy in patients with epilepsy. *Neurology* 56: 172–177.

Breum L., Astrup A., Gram L., Andersen T., Stokholm K.H., Christensen N.J., Werdelin L., Madsen J. (1992): Metabolic changes during treatment with valproate in humans: Implications for weight gain. *Metabolism* 41: 666–670.

Bruni J., Wilder B.J. (1979): Review of a New Antiepileptic Drug. *Archives of neurology* 36: 393-398.

Burton B.S. (1882): On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *Journal of the American Chemical Society* 385-395.

Chaudhary S., Parvez S. (2012): An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. *Neuroscience* 6: 225:258-268.

Chen P.S., Peng G.S., Li G., Yang S., Wu X., Wang C.C., Wilson B., Lu R.B., Gean P.W., Chuang D.M., Hong J.S. (2006): Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Molecular Psychiatry* 11(12): 1116–1125.

Chen P.S., Wang C.C., Bortner C.D., Peng G.S., Wu X., Pang H., Lu R.B., Gean P.W., Chuang D.M., Hong J.S. (2007): Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience* 149(1): 203–212.

Chengappa K.N., Chalasani L., Brar J.S., Parepally H., Houck P., Levine J. (2002): Changes in body weight and body mass index among psychiatric patients receiving lithium, valproate, or topiramate: An open-label, nonrandomized chart study. *Clinical Therapeutics* 24: 1576–1584.

Chtourou Y., Fetoui H., Gdoura R. (2014): Protective Effects of Naringenin on Iron-Overload-Induced Cerebral Cortex Neurotoxicity Correlated with Oxidative Stress. Springer Science+Business Media New York.

Davis R., Peters D.H., McTavish D. (1994): Valproic acid: a reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs* 47: 332-372.

Demir E., Aysun S. (2000): Weight gain associated with valproate in childhood. *Pediatric Neurology* 22: 361–364.

Depakene., Stavzor. (2014): Valproic acid. Dosing, indications, interactions, adverse effects and more. Medscape Reference. WebMD. <https://reference.medscape.com/drug/depakene-stavzor-valproic-acid-343024>.

Dominko K. (2014): Međudjelovanje kolesterola i antioksidativnog sustava. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Diplomski rad.

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*: 1(1).

Fernandes C.G., Leipnitz G., Seminotti B., Amaral A.U., Zanatta A., Vargas C.R., Dutra Filho C.S., Wajner M. (2010): Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(2): 317-326.

Flohé L., Ötting F. (1971): Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology* 105: 70-76.

Genton P., Gelisse P. (2002): Valproic acid: adverse effects. U: Levy R.H. (ur.), Mattson B.S. (ur.), Meldrum B.S. (ur.), Perucca E. (ur.). *Antiepileptic drugs*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 837-851.

Gerstner T., Buesing D., Longin E., Bendl C., Wenzel D., Scheid B., Goetze G., Macke A., Lippert G., Klostermann W., Mayer G., Augspach-Hofmann R., Fitzek S., Haensch C.A., Reuland M., Koenig S.A. (2006): Valproic acid induced encephalopathy—19 new cases in Germany from 1994 to 2003—a side effect associated to VPA-therapy not only in young children. *Seizure* 15(6): 443–448.

Gezginci-Oktayoglu S., Turkyilmaz I.B., 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.

Ghose K., Niven B. (1998): Prophylactic sodium valproate therapy in patients with drug-resistant migraine. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 20: 353–359.

Graf W.D., Oleinik O.E., Glauser T.A., Maertens P., Eder D.N., Pippenger C.E. (1998): Altered antioxidant enzyme activities in children with a serious adverse experience related to valproic acid therapy. *Neuropediatrics* 29(4): 195-201.

Grosso S., Longini M., Rodriguez A., Proietti F., Piccini B., Balestri P., Buonocore G. (2011): Oxidative stress in children affected by epileptic encephalopathies. *Journal of the Neurological Sciences* 300(1-2): 103-106.

Guerrini R., Belmonte A., Campichi R., Casalini C., Perucca E. (1998): Reversible pseudoatrophy of the brain and mental deterioration associated with valproate treatment. *Epilepsia* 39(1): 27-32.

Gurvich N., Klein P.S. (2002): Lithium and valproic acid: parallels and contrasts in diverse signaling contexts. *Pharmacology & Therapeutics* 96: 45–66.

Jamora D., Lim S.H., Pan A., Tan L., Tan E.K. (2007): Valproate-induced Parkinsonism in epilepsy patients. *Movement Disorders* 22(1): 130–133.

Johannessen C.U., Johannessen S.I. (2003): Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Reviews* 9(2): 199–216.

- Keck P.E., McElroy S.L. (2002): Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of antimanic and mood-stabilizing medications. *Journal of Clinical Psychiatry* 63: 3-11.
- Komulainen T., Lodge T., Hinttala R., Bolszak M., Pietilä M., Koivunen P., Hakkola J., Poulton J., Morten K.J., Uusimaa J. (2015): Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology* 331: 47-56.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis Farr A., Randall R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Löscher W. (1999): Valproate: reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanism of action. *Progress in Neurobiology* 58: 31-59.
- Mathew N.T. (2001): Antiepileptic drugs in migraine prevention. *Headache* 41(1):1 8-24.
- McElroy S.L., Keck P.E. Jr., Tugrul K.C., Bennett J.A. (1993): Valproate as a loading treatment in acute ania. *Neuropsychobiology* 27: 146–149.
- McElroy S.L., Keck P.E. Jr., Tugrul K.C., Bennett J.A. (1993): Valproate loading dose in the treatment of acute mania. *Journal of Clinical Psychiatry* 54: 305–308.
- McElroy S.L., Keck P.E. Jr. (1994): Experience with valproate in affective disorders. U: Modingh K. (ur.), Robak O.H. (ur.), Vestergaard P. (ur.). *Anticonvulsants in psychiatry*. Petersfield: Wrightson Biomedical Publishing 57–72.
- Meunier H., Carraz G., Meunier Y., Eymard P., Aimard M. (1963): Proprietes pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacetique. 1er Memoire: Proprietes antiepileptiques. *Therapie* 18: 435-438.
- Mitsikostas D., Polychronidis I. (1997): Valproate versus flunarizine in migraine prophylaxis: A randomised, double-open, clinical trial. *Functional Neurology* 12: 267–276.
- Monti B., Polazzi E., Batti L., Crochemore C., Virgili M., Contestabile A. (2007): Alpha-synuclein protects cerebellar granule neurons against 6-hydroxydopamine-induced death. *Journal of Neurochemistry* 103(2): 518–530.
- Pan T., Li X., Xie W., Jankovic J., Le W. (2005): Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells. *FEBS Letters* 579(30): 6716–6720.

- Perucca E. (2002): Pharmacological and therapeutic properties of Valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* 16(10): 695-714.
- Rajadurai M., Prince P.S. (2009): Naringin ameliorates mitochondrial lipid peroxides, antioxidants and lipids in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Phytotherapy Research* 23: 358-362.
- Sato Y., Kondo I., Ishida S., Motooka H., Takayama K., Tomita Y., Maeda H., Satoh K. (2001): Decreased bone mass and increased bone turnover with valproate therapy in adults with epilepsy. *Neurology* 14: 445–449.
- Shakeel S., Rehman M.U., Tabassum N., Amin U., Mir M.U.R. (2017): Effect of Naringenin (A naturally occurring flavanone) Against Pilocarpine-induced Status Epilepticus and Oxidative Stress in Mice. *Pharmacognosy Magazine* 13(1): 154-160.
- Shashank K., Abhay K.P. (2013): Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* Article ID 162750.
- Silberstein S.D. (2002): Valproic acid. Clinical efficacy and use in other neurological disorders. U: Levy R.H. (ur.), Mattson R.H. (ur.), Meldrum B.S. (ur.), Perucca E. (ur.). *Antiepileptic drugs*. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 818–827.
- Thompson P.J., Trimble M.R. (1982): Anticonvulsant and cognitive functions. *Epilepsia* 23: 531-544.
- Tietze F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27: 502-522.
- Tolou-Ghamari Z., Palizban A. (2015): Review of Sodium Valproate Clinical and Biochemical Properties. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 17(8): 2207.
- Tremolizzo L., Carboni G., Ruzicka W.B., Mitchell C.P., Sugaya I., Tueting P., Sharma R., Grayson D.R., Costa E., Guidotti A. (2002): An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 17095–100.

Van Lint C., Emiliani S., Verdin E. (1996): The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene expression* 5: 245–253.

Venkateswara Rao P., Kiran S.D.V.S., Rohini P., Bhagyasree P. (2017): Flavonoid: A review on Naringenin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(5): 2778-2783.

Vining E.P.G. (1987): Cognitive dysfunction associated with antiepileptic drug therapy. *Epilepsia* 28(2): 18–22.

Wells P.G., Lee C.J., Mccallum G.P., Perstin J., Harper P.A. (2010): Receptor- and reactive intermediate-mediated mechanisms of teratogenesis. *Handbook of Experimental Pharmacology* 196: 131 –162.

Yiş U., Seçkin E., Kurul S.H., Kuralay F., Dirik E. (2009): Effects of epilepsy and valproic acid on oxidant status in children with idiopathic epilepsy. *Epilepsy Research* 84(2-3): 232-237.

Zhang Y., Zhang F.G., Meng C., Tian S.Y., Wang Y.X., Zhao W., Chen J., Zhang X.S., Liang Y., Zhang S.D., Xing Y.J. (2011): Inhibition of sevoflurane postconditioning against cerebral ischemia reperfusion-induced oxidative injury in rats. *Molecules* 17(1): 341-354.

European Medicines Agency (2017) : Valproate. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Valproate/human_referral_000187.jsp aspx (datum posljednjeg pristupa 06. 06. 2018)

Human Metabolome Database (2016): Naringenin.

<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0002670> aspx (datum posljednjeg pristupa 08. 06. 2018)

ŽIVOTOPIS

Rođen sam 14. veljače 1993 godine u Puli, Hrvatska. Osnovnu i srednju školu završio sam u Zagrebu. Maturirao sam 2011. godine u II. Gimnaziji u Zagrebu, te iste godine upisao Fakultet elektrotehnike i računarstva (FER). Ne pronašavši se na toj vrsti studija sljedeće godine upisujem studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu – Biološki odsjek. 2016. godine stekao sam zvanje prvostupnika na preddiplomskom studiju Molekularne biologije obranivši završni rad pod nazivom „Uloga fitohelatina u toleranciji na teške metale u biljaka“. Iste godine upisujem diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu-Biološki odsjek.