

Učinak združenog unosa lijeka valproata i polifenola naringenina na fiziološke i serumske odrednice bubrežne funkcije miša C57Bl6

Milardović, Tonći

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:574842>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-09**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tonći Milardović

**Učinak združenog unosa lijeka
valproata i polifenola naringenina na
fiziološke i serumske odrednice
bubrežne funkcije miša C57BI6**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na savjetima i pristupačnosti tijekom pisanja mog diplomskog rada te prilagodbi na specifične okolnosti uzrokovane epidemijom.

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

Učinak združenog unosa lijeka valproata i polifenola naringenina na fiziološke i serumske
odrednice bubrežne funkcije miša C57BI6

Tonći Milardović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Cilj rada bio je odrediti utjecaj lijeka valproata i polifenola naringenina na stvaranje oksidacijskog stresa i oštećenja u bubregu miša, te može li kombinirana primjena naringenina i valproata pozitivno utjecati na oksidacijski stres i zaštititi smanjiti oštećenja bubrega. U C57BL6 miševa, tretiranih 15 dana valproatom, naringeninom i njihovim kombinacijama izmjerene su serumske koncentracije dušika iz ureje u krvi, kreatinina, bilirubina, natrija, kalija i kalcija i aktivnost alkalne fosfataze, te lipidna peroksidacija, aktivnost superoksid dismutaze i katalaze kao oksidacijskih markera u tkivu bubrega. Rezultati su pokazali da je tretman valproatom podignuo razine dušika iz ureje, kreatinina i bilirubina i kalija u serumu što daje naznaku oštećenja bubrega, ali nije bitno utjecao na povećanje lipidne peroksidacije, te je aktivnost katalaze suprotno očekivanom, povećana. Protektivno djelovanje naringenina nije utvrđeno u tkivu bubrega, već suprotno od očekivanog, tretman kombinacije naringenina i valproata povećao je lipidnu peroksidaciju i smanjio aktivnost katalaze. Iako je koncentracija bilirubina snižena, koncentracija ureje u dušiku, kreatinina te aktivnost alkalne fosfataze se bitno ne razlikuju od skupine tretirane isključivo valproatom.

(45 stranica, 11 slike, 8 tablica, 23 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: valproat, naringenin, oksidativni stres, serumski markeri, lipidna peroksidacija, superoksid dismutaza, katalaza

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

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Domagoj Đikić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

The effects of joint intake of medicament valproate and polyphenol naringenin on
physiologic and serologic markers of kidney function in C57Bl6mouse

Tonći Milardović
Roosevelet square 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to determine the effect of medicament valproate and poliphenole naringenin on the formation of oxidative stress and damage in mouse kidney, and wether the combined application of valproate and naringenin can have a positive effect on oxidative stress and defense and reduce kidney damage. In C57BL6 mice, serum concentrations of urea bind nitrogen, creatinine, bilirubine, sodium, potassium, calcium, and alkaline phosphatase activity, withkidney lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activity were measured. Results showed that the valproat treatment elevated serum concentrations of bind urea nitrogen, creatinine and bilirubine which indicates kidney damage, but did not significantly increase lipid peroxidation and it also, contrary to expectations, increased the catalase activity. The protective action of naringenin for kidney tissue was not shown. The treatment with combination of valproate and naringenin increased lipid peroxidation and decreased catalase activity. Although, the concentration of bilirubine was decreased, concentrations of bind urea nitrogen, creatinine and activity of alkaline phosphatase did not differ significantly from the group treated with valproate.

(45 pages, 11 figures, 8 tables, 23 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: valproate, naringenin, oxidative stress, serum markers, lipid peroxidation, , superoxide dismutase, catalase

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

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

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Farmakokinetička svojstva.....	2
1.2 Mehanizam i područja djelovanja.....	2
1.3 Nuspojave kod terapije valproatom.....	4
1.4 Toksični učinci valproata na bubreg i bubrežne funkcije.....	6
1.5 Osnovne karakteristike i farmakološka svojstva naringenina.....	6
1.6 Oksidacijski stres u bubregu.....	7
2. CILJ RADA.....	9
3. MATERIJALI I METODE10	
3.1. Pokusne životinje i izlaganje životinja valproatu i naringenu.....	10
3.2. Vetscan cjeloviti dijagnostički profil.....	10
3.2 Mjerenje lipidne peroksidacije.....	19
3.3 Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	19
3.4 Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT).....	20
3.5 Statistička analiza.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Urea i dušik u serumu.....	21
4.2. Natrij, kalcij i kalij u serumu.....	22
4.3Kreatininu serumu.....	24

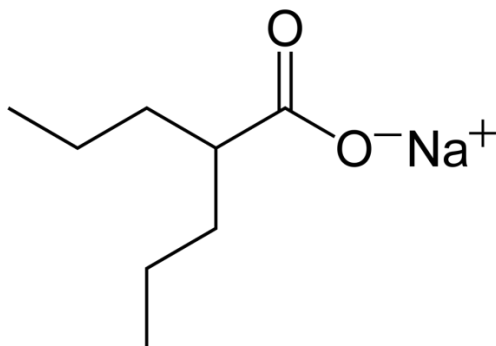
4.4Bilirubin u serumu.....	25
4.5 Alkalna fosfataza u serumu.....	26
4.5 Antioksidacijski pokazatelji u tkivu bubrega.....	27
5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČCI.....	35
7. LITERATURA.....	36
8. ŽIVOTOPIS.....	39

1.UVOD

U usporedbi sa drugim antikonvulzivnim lijekovima valproat se ističe kao jedinstveni lijek jer se strukturno razlikuje od ostalih lijekova koji se koriste u liječenju epilepsije. Otkriven je slučajno 1962. godine jer se koristio kao organsko otapalo za druge antikonvulzivne spojeve. Valproična kiselina (N-dipropilacetična kiselina) ili valproat (VPA) je kratkolančana razgranata masna kiselina molekularne mase 144.21. Zbog svoje jedinstvene i jednostavne kemijske strukture vrlo je slabo topljiv u vodi zbog toga se priprema kao natrijev valproat (slika 1.) čime se znatno povećava topljivost. Ostali oblici pripreme su magnezijev valproat i natrijev hidrogen valproat.

Od 1962. godine kada je otkriven, preklinička istraživanja provedena na valproatu pokazala su njegov raznovrstan učinak a najznačajniji je da u živčanom tkivu djeluje kao antikonvulzivni agens (Johannessen i Johannessen, 2003). Danas je valproat poznat kao jedan od glavnih lijekova koji se koriste za liječenje širokog spektra pojedinih podtipova epileptičkih napada: generaliziranih (absensa, toničko-kloničkih, miokloničkih), parcijalnih te specifičnih napada (infantilni spazmovi, Lennox-Gastaut sindrom) te *statusa epilepticusa* (Marson i Sills, 2016).

Američka agencija FDA-e je 1995. godine, osim za epilepsiju, odobrila je valproat za liječenje akutne manije, psihoznih stanja i poremećaja sa maničnim epizodama uključujući bipolarni poremećaj. Poznato je da se valproat koristi izvan odobrene indikacije (eng. off label) u tretmanu psihijatrijskih poremećaja kao što su alkoholna apstinencija, demencija, granični poremećaj ličnosti, šizofrenija i agresivno ponašanje. Što se tiče nepsihijatrijskih poremećaja, koristi se u prevenciji migrene i migrenskih napadaja. (Ayano, 2016).



Slika 1. Strukturna formula natrij valproata (preuzeto sa: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sodium-valproate-2D-skeletal.png>).

1.1 Farmakokinetička svojstva

Biodostupnost valproata je gotovo potpuna (96% - 100%). U svakodnevnoj uporabi dolazi u različitim formulacijama kao što su tablete, želučano obložene kapsule ili kapsule sa produljenim oslobađanjem, ili u obliku oralnih ili intravenoznih otopina. Stopa apsorpcije varira ovisno o formulaciji od 1-2 sata kod konvencionalnih tableta, otopina i rektalnog apliciranja, od 3-6 sati kod želučano obloženih tableta i između 6-12 sati kod tableta sa produljenim oslobađanjem (Johannessen i Johannessen, 2003). Nakon unosa u organizam, maksimalna koncentracija u plazmi postiže se kroz vrijeme od 5-10 sati.

Valproat vrlo brzo ulazi u cerebro-spinalnu tekućinu pasivnom difuzijom i aktivnim transportom. Poluživot valproata bez dodatnih lijekova je 9-12 sati te se eliminacija odvija jetrenim (hepatičkim) metabolizmom sa vrlo malim udjelom tvari koji se eliminira nepromijenjen putem mokraće (Schafer i Brandl, 2020). Iznimno visoko vezivanje valproata za plazmatske proteine (87%-95%) rezultira smanjenim izlučivanjem iz organizama (6-20 ml/h).

Metabolizam valproata se odvija preko tri procesa: glukuronidacijom, β -oksidacijom unutar mitohondrija i oksidacijom citokroma P450. Sva tri procesa stvaraju toksične metabolite koji mogu rezultirati oštećenjima jetre i urinarnog trakta (Ghodke-Puranik *i sur*, 2013).

1.2 Mehanizmi područja djelovanja

Specifični biokemijski mehanizam kojim valproat postiže stabiliziranje raspoloženja i ponašanja do danas nije u potpunosti razjašnjen. Dok se postizanje antikonvulzivnog efekta postiže vrlo brzo, za postizanje antimaničnih i antidepresivnih efekata je potrebno duže vrijeme te zahtijevaju dugoročno uzimanje.

U živčanom sustavu, valproat djeluje na dopaminergične i serotonične neurotransmitere, antagonistički na sintezu prekursora glutamatnog NMDA receptor i nagomilavanje glavnog inhibitornog neurotransmitera GABA-e koji je zaslužan za regulaciju dopaminergične i glutamatne transmisije (Ayano, 2016). Valproat potiče nagomilavanje GABA-e kroz inhibiciju

njene degradacije, odnosno inhibiciju 4-aminobutirat aminotransferaze (ABAT), enzima zaduženog za razgradnju GABA-e. *In vitro* valproat također inhibira sukcinil-semialdehid dehidrogenazu i α -ketoglutarat dehidrogenazu čime se inhibiraju enzimi ciklusa limunske kiseline i skreće se dio energije u GABA ciklus (Johannessen i Johannessen, 2003). Valproat utječe na razinu monoamina i metabolizam glukoze u mozgu, te dodatno sadrži epigenetičke efekte kojima utječe na strukturu kromatina inhibirajući histonske deacetilaze. Saznanja o epigenetičkim utjecajima valproata mogli bi proširiti primjenu valproata na liječenje tumora i HIV-a (Schäfer i Brandl, 2020).

Valproat štiti kortikalne dijelove mozga od ekscitotoksičnog djelovanja. Nadalje, valproat je *in vitro* pokazao preventivno djelovanje na umjetno formirane epileptične izboje i okidanja neurona u hipokampusu, amigdali i entorinalnom korteksu mozga štakora. U *in vivo* uvjetima, valproat je suprimirao električne izboje u hipokampusu mačaka te povisio prag za ponovljeno izazivanje akcijskih potencijala u amigdali štakora te talamusu mačaka (Löscher, 2002).

Njegov glavni neuroprotektivni mehanizam je inhibicija histon deacetilaza (HDAC) čime potiče proliferaciju neurona i glija stanica, neoplastičnost neurona, remodeliranje aksona i grupiranje sinapsina. Indirektnim djelovanjem na inhibiranje glikogen kinaze 3 (GK-3) potiče stvaranje antioksidativnih molekula unutar zrnatih neurona malog mozga (Kanai *i sur*, 2004). Što se tiče dijelova mozga na koje djeluje valproat, pokazano je da nema specifičnu molekularnu metu te se njegovi različiti mehanizmi mogu pronaći u svakom dijelu živčanog sustava. Istraživanje iz 2004. koje su proveli Laeng *i sur.*, pokazuje povećan rast gabaergetičnih neurona i glija stanica u neokorteksu i lateralnim ganglijima štakora čime se dokazuje utjecaj valproata na neurogenezu i diferencijaciju neurona.

U vidu neurotrofičkih učinaka, valproat stimulira otpuštanje neurotrofnog faktora glija stanične linije (GDNF) i moždanog neurotrofnog faktora (BDNF) iz astrocita srednjeg mozga štakora čime se stimulira proliferacija i diferencijacija dopaminergičnih neurona te u istima djeluje neuroprotektivno naspram neurotoksičnog djelovanja lipopolisaharida (LPS) te 1-metil-4-fenilpiridin (MPP+) (Chen *i sur*, 2006).

Valproat kao i većina ostalih antikonvulziva, blokira natrijeve te naponom regulirane kalcijeve (CACNA1 tip –C, D, N i F) i kalijeve (SCN) kanale. Iako nije utvrđeno kojim načinom se blokiraju navedeni kanali, smatra se da blokiranje ionskih kanala ima posebice bitnu ulogu

u epileptičnim napadajima jer se time smanjuje visoko-frekventno okidanje neurona (Chateauvieux *i sur*, 2010).

1.3 Nuspojave kod terapije valproatom

Jedna od dobrih strana terapije valproatom je široka granica sigurnosti (engl. *margin of safety*). Rijetko se pojavljuju idiosinkrazijske reakcije, te su ostale nuspojave uglavnom one najčešće kao što su povraćanje, malaksalost i žgaravica. Rjeđe se mogu pojaviti nuspojave kao što su iritabilnost, pospanost i ataksija. VPA kao i ostali psihotropni agensi mogu izazvati metaboličke promjene kao što je povećanje tjelesne mase, koji je do danas najpoznatiji štetni učinak terapije valproatom. Mehanizam još nije razjašnjen, te povećanje tjelesne mase ne korelira sa dobi, spolom, medicinskim stanjem, dozom ili serumskim koncentracijama VPA. Ostali metabolički poremećaji koji mogu nastati kod terapije VPA su hipokarnitinemija, hiperamonemija, trombocitopenija te inhibicija agregacije trombocita (Lagace *i sur*, 2004). Sve nuspojave i štetni učinci koje se mogu pojaviti kod terapije valproatom navedene su u Tablici 1.

Tablica 1. Najčešće nuspojave i neželjeni učinci terapije valproatom (Marson i Sils, 2016).

Neurološke	Gastro-intestinalne	Hepatičke i pankreasne	Hematološke	Metaboličke/endokrine	Teratogene (uključujući učinke na postnatalni razvoj nakon prenatalnog izlaganja)	Ostale
Tremor	Mučnina	Otkazivanje jetre	Trombocitopenija	Hiperamonemija	Velike kongenitalne malformacije i defekti neuralne cijevi	Gubitak kose
Pospanost	Povraćanje	Pankreatitis	Smanjena agregacija krvnih pločica	Hipokarnitinemija	Odgadanje neurorazvoja i poremećaji autističnog spektra	Edemi lica i udova
Letargičnost	Anoreksija		Istrošenost fibrinogena	Hipoinzulinizam		Noćna enureza
Zbunjenost	Gastrointestinalne smetnje		Drugi koagulativni poremećaji	Policistični ovariji		Hiponatrijemija
Reverzibilna Demencija	Povećanje težine		Neutropenija	Nepravilnosti u menstruaciji		Smanjena mineralna gustoća kosti
Atrofija mozga			Supresija koštane srži			Kožni osipi
Encefalopatija						Imunološki modulirane idiosinkrazijske reakcije
Ekstrapiramidni sindrom						

1.4 Toksični učinci valproata na bubreg i bubrežne funkcije

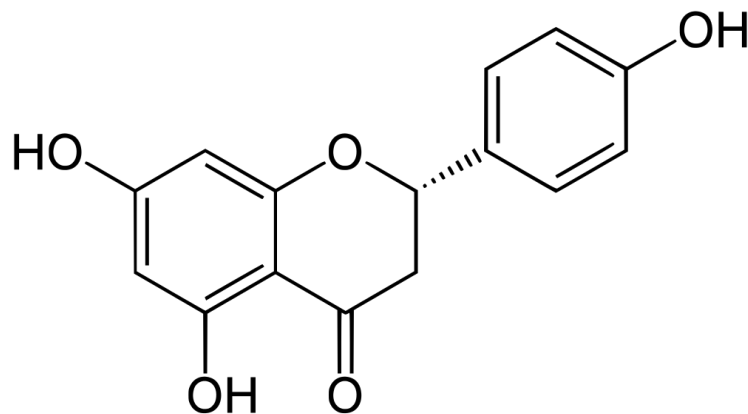
Fanconijev sindrom je skup višestrukih poremećaja reasorpcije u proksimalnim kanalićima bubrega koji uključuje poremećaj reasorpcije natrija, kalija, bikarbonata, fosfata glukoze, aminokiselina, mokraćne kiseline te proteina i peptida male molekulske mase kao i drugih topljivih organskih metabolita.

Valproat se smatra jednim od lijekova koji može izazvati oštećenja bubrega te Fanconijev sindrom koji se specifično javlja u subpopulaciji djece s epilepsijom te se liječe valproatom. Najčešći marker kojim se dijagnosticira i prati oštećenje bubrega je NAG (N-acetil- β -D-glukozaminidaza). NAG je lizosomska hidrolaza koja se u većem broju nalazi u stanicama proksimalnog tubula i uključena je u metabolizam glikoproteina, glikozaminoglikana te glikozida. NAG je vrlo osjetljiv i pouzdan indikator poremećaja rada bubrega. Njegova povišena koncentracija u mokraći je direktno povezana sa oštećenjima bubrega te tijekom terapije valproatom u djece s epilepsijom primjećuje se drastična elevacija koncentracije NAG u urinu (Knights i Finlay, 2014). Ove podatke potvrđuje rad kojeg su izveli Heidari i sur. 2017. gdje su praćeni toksični utjecaji valproata na bubreg analizom serumskih i tkivnih biomarkera te utjecaj na funkciju mitohondrija u štakora. Rezultati su pokazali značajno povišene serumske koncentracije alkalne fosfataze, kreatina, γ -glutamin transferaze te dušik iz ureje u krvi zajedno sa hipokalemijom, hipofosfatemijom te smanjenom koncentracijom mokraćne kiseline u serumu u štakora koji su tretirani valproatom. Također je pokazano da je valproat u stanicama izazvao povećanu lipidnu peroksidaciju te povišenje koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta te potrošenje bubrežnog glutaciona. Mitohondrijska funkcija je također narušena, smanjenom aktivnošću sukcinil dehidrogenaze, bubrenjem i depolarizacijom mitohondrija. Smanjena je također koncentracija ATP-a te glutaciona sa povećanom lipidnom peroksidacijom i koncentracijom reaktivnih kisikovih vrsta.

1.5. Osnovne karakteristike i farmakološka svojstva naringenina

Narigenin ($C_{15}H_{12}O_5$) (slika 2.) je prirodni flavonoid koji se najviše nalazi u jestivom voću, posebice agrumima, rajčicama te smokvama vrste *Ficus carica*. Ova široko distribuirana polifenolna molekula je netopljiva u vodi, ali je topljiva u organskim otapalima. Brojni dokazi

ukazuju da naringenin posjeduje različita farmakološka svojstva, koja uključuju hepatoprotektivno, antiupalno, antitumorsko, antimutageno i antimikrobno djelovanje te se zbog toga intenzivno istražuje zbog primjene u liječenju i kontroliranju bolesti. Glavna karakteristika njegovog djelovanja je da djeluje kao snažan antioksidans, smanjujući lipidnu peroksidaciju, karbonilaciju proteina, te potiče metabolizam ugljikohidrata i sam ima ulogu kao „scavenger“ reaktivnih kisikovih radikala (ROS). U jetri sprječava nakupljanje masti, potičući oksidaciju lipida a preko unutarstaničnih signalnih puteva čak može potaknuti osjetljivost hepatocita na inzulin. Antitumorsko djelovanje pokazuje popravkom DNA, dok antivirusno djelovanje pokazuje inhibicijom sastavljanja virusnih čestica, ili prevencijom intracelularne replikacije. Problem u farmakološkoj primjeni naringenina je u njegovoj apsorpciji jer se samo 15% unesenog naringenina apsorbira u organizam probavnim sustavom pri oralnoj ingestiji (Salehi i sur., 2019) .



Slika 2. Strukturna formula naringenina. (preuzeto sa: <https://en.wikipedia.org/wiki/Naringenin#/media/File:Naringenin.svg>)

1.6 Oksidacijski stres u bubregu

Bubreg je organ koji za svoju normalnu funkciju zahtijeva mnogo energije te se pritom najviše oslanja na aerobni metabolizam, odnosno na ATP koji nastaje procesom oksidativne fosforilacije. Redukcija molekularnog kisika u transportnom lancu elektrona je esencijalna za bubrežnu funkciju, no dugoročno može biti štetna ili pogubna. Svaki od 5 multienzmskih kompleksa u transportnom lancu predstavlja mjesto na kojem se potencijalno mogu stvarati

reaktivne kisikove vrste (ROS). Kompleks I i III posebice pridonose stvaranju superoksidnog radikala (O_2^-), koji posljedično tvore vodikov peroksid (H_2O_2) što rezultira peroksidacijom lipida membrane mitohondrija. Liziranjem mitohondrija otpušta se citokrom C, aktivira se kaspazni signalni put rezultirajući apoptozom stanice. Poremećaji u oksidativnoj fosforilaciji i nastanku ATP-a mogu nastati zbog korištenja substrata iz lanca, primjerice reducirane NADH i NADH oksidaze. Transportni lanci promijenjeni na taj način uzrokuju povećano nastajanje ROS, smanjenu sintezu ATP-a te poremećaj u potencijalu membrane mitohondrija. Postoje i drugi izvori ROS-a u bubregu, primjerice ksantin i NADPH oksidaza te degradacija lizosoma. (Small *i sur*, 2012). Nefroni proksimalnih bubrežnih kanalića su za razliku od drugih dijelova bubrega najviše ovisni o aerobnom metabolizmu te imaju veću gustoću mitohondrija što i doprinosi povećanom stvaranju ROS-a (Hall *i sur*, 2009).

2. Cilj rada

Koristeći *in vivo* model C57Bl6 miševa koji su tretirani svakodnevno, tijekom 15 dana valproatom, u terapijskoj dozi od 150 mg/kg, dozom od 25 mg/kg polifenola naringenina i kombinacijom navedenih doze valproata i naringenina (N+V), željelo se utvrditi hoće li se u bubregu dogoditi promjene u redoks ravnoteži antioksidacijskih biljega malondialdehida (MDA), superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) koji ukazuju na oštećenje tkiva, te da li će se u serumu promijeniti razine metabolita vezanih uz normalnu fiziologiju bubrega (elektroliti, urea, alkalna fosfataza i dr.). Očekivalo se da će tretman združenim davanjem polifenola naringenina zajedno sa lijekom valproatom (N+V) umanjiti negativne potencijalne učinke uzimanja valproata na bubreg.

3. Materijali i metode

3.1. Pokusne životinje i izlaganje životinja valproatu i naringenu

Pokus je proveden na odraslim C57Bl6 miševima muškog spola, starosti cca. 30 dana, prosječne mase 25-30 g uzgojenima u uzgojnoj jedinici za laboratorijske životinje Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom 15 dana pokusnog tretmana, svakodnevno se oralno gastričkom kanilom apliciralo istraživane kemikalije: lijek valproat i otopina polifenola naringenina. Životinje su bile raspoređene u pokusne skupine s obzirom na primljeni tretman (N=6 životinja/skupini):

1. Skupina K- kontrola, oralno je svakodnevno primala 0.2 ml fiziološke otopine aplicirane gastričkom kanilom;
2. Skupina V– oralno je svakodnevno primala terapijsku dozu valproata od 150 mg/kg životinje aplicirane gastričkom kanilom;
3. Skupina N– oralno je se svakodnevno tretirana otopinom polifenola naringenina u dozi od 25 mg/kg životinje aplicirane gastričkom kanilom;
4. Skupina N+V – tretirana je sa kombinacijom doza skupina navedenih pod stavkama 2. (V) + 3. (N) apliciranih gastričkom kanilom.

3.2. Vetscan cjeloviti dijagnostički profil

Razine serumskih elektrolita (natrij, kalij i kalcij i serumske koncentracije uree, bilirubina i kreatina) izmjerene su aparatom VetScan™ sa pripadajućim komercijalnim kitovima. Vetscan cjeloviti dijagnostički profil rotor reagensa korišten zajedno s VetScan kemijskim analizatorom iskorištava suhe i tekuće reagense za dobijanje *in vitro* kvantitativnih podataka za alanin aminotransferazu (ALT), albumin, (ALB), alkalnu fosfatazu (ALP), amilazu (AMY), ukupni kalcij (Ca^{2+}), kreatinin (CRE), globulin* (GLOB), glukozu (GLU), fosfor (PHOS), kalij (K^+), natrij (Na^+), ukupni bilirubin (TBIL), ukupni protein (TP) i dušik u ureji (BUN) u hepariniziranoj cjelovitoj krvi, plazmi ili serumu.

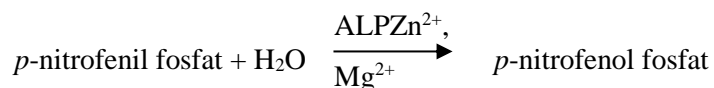
VetScan cjeloviti dijagnostički profil rotor reagensa i Vetscan kemijski analizator tvore *in vitro* dijagnostički sustav koji pomaže veterinarima u dijagnozi sljedećih poremećaja:

Alanin aminotransferaza:	Bolesti jetre, uključujući virusni hepatitis i cirozu; bolesti srca.
Albumin:	Bolesti jetre i bubrega.
Alkalna fosfataza:	Jetra, kost, paratiroidne i probavne bolesti.
Amilaza:	Bolesti bubrega i pankreasa.
Kalcij:	Paratiroidne, koštane te kronične bolesti bubrega; tetanus.
Kreatinin:	Bolesti bubrega.
Globulin:	Povećavanje koncentracije globulina uslijed dehidracije te potencijalno uslijed stimulacije antigenima.
Glukoza:	Dijabetes, hiperglikemija, hipoglikemija, dijabetičke i jetrene bolesti.
Fosfor:	Bolesti bubrega, hipoparatiroidizam te nutritivni poremećaji.
Kalij:	Pothranjenost i bubrežne bolesti. Navedeni se elektrolit se koristi za dijagnosticiranje uzroka povraćanja, dijareje, te srčanih simptoma.
Natrij:	Dehidracija i dijabetes. Navedeni se elektrolit koristi za dijagnosticiranje uzroka povraćanja, dijareje i srčanih simptoma.
Ukupni bilirubin:	Hepatički poremećaji.
Ukupni protein:	Dehidracija, bolesti jetre i bubrega, metaboličke i nutritivni poremećaji.
Dušik iz ureje u krvi:	Bolesti jetre i bubrega.

U ovom radu prikazani su samo rezultati serumskih parametara vezanih uz bubreg, koji su mjereni prema sljedećim protokolima:

Alkalna fosfataza (ALP)

VetScan procedura je uzeta je iz AACC i IFCC metoda i modificirana. Alkalna fosfataza hidrolizira *p*-NPP (*p*-nitrofenil fosfat) u puferu za ionima metala te formira *p*-nitrofenol i fosfat. Korištenje *p*-NPP povećava brzinu reakcije. Pouzdanost ove tehnike se uvelike povećava korištenjem pufera sa ionima metala koji održava koncentraciju cinka i magnezija u reakciji. Američko udruženje za kliničku kemiju koristi *p*-NPP kao supstrat te pufer sa metalnim ionima.

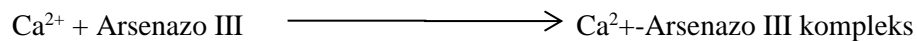


Količina ALP u uzorku je proporcionalna stopi povećanja razlike u apsorbanciji između 405 nm i 500 nm.

Ukupni kalcij (Ca²⁺)

Referentna metoda za kalcij je atomska apsorpcijska spektroskopija. Međutim, ova metoda nije prikladna za rutinski uporabu. Spektrofotometrične metode najčešće koriste ili *o*-krezoltalein kompleks (CPC) ili Arsenazo III metalokromske indikatore. Arsenazo III ima visoki afinitet za kalcij i nije ovisan o temperaturi kao CPC.

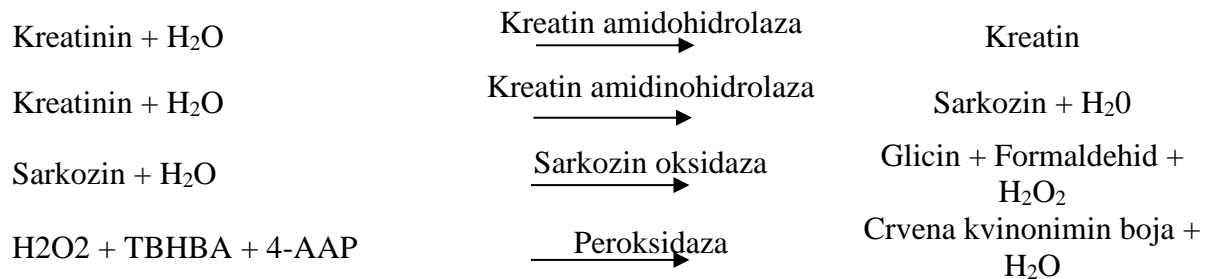
Kalcij u uzorku pacijenta se veže na Arsenazo III i nastaje kalcij-boja kompleks.



Završna reakcija se monitorira na 405 nm, 467 nm i 600 nm. Količina kalcija u uzorku je proporcionalna apsorbanciji.

Kreatinin

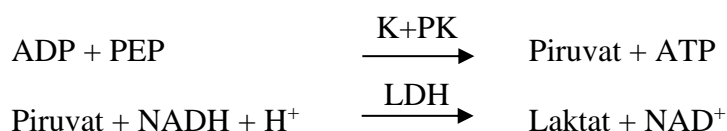
Jaffe metoda, prvi puta predstavljena 1886. godine, još uvijek je najčešće korištena metoda utvrđivanja koncentracije kreatinina u krvi. Trenutna referentna metoda je kombinacija Fuller's earth (fluoridinske) metodesa Jaffeovom metodom kako bi se povećala specifičnost reakcije. Razvijene su enzimatske metode koje su specifičnije za kreatinin od raznih modificiranih protokola Jaffeove tehnike. Korištenje enzima kreatinin amidohidrolaze eliminira problem interferencije amonijeva iona, koje se pojavljuju u reakcijama sa kreatinin iminohidrolazom.



Za određivanje koncentracije kreatinina u uzorku koriste se dvije kivete. Endogeni kreatinin mjeri se u netretiranoj kiveti (blank/slijepa proba), čiji se rezultati oduzimaju od dobivenih u testnoj kiveti koja sadrži endogeni i enzimatskom reakcijom stvoreni kreatinin. Nakon izuzimanja endogenog kreatinina iz izračuna koncentracija kreatinina postaje proporcionalna intenzitetu proizvedene crvene boje. Produk završne reakcije mjeri se kao razlika apsorbancije između mjerenja pri 550 nm i 600 nm valne duljine svjetlosti.

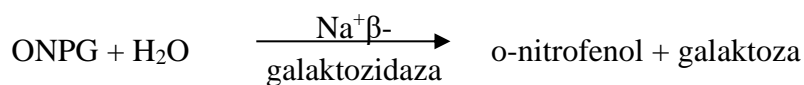
Kalij

Za koncentraciju kalija razvijene su spektrofotometrijske metode koje omogućuju mjerenje korištenjem standardne kliničke kemijske instrumentacije/aparature. Abaxis enzimatska metoda temelji se na aktivaciji piruvat kinaze (PK) kalijem i pokazuje odličnu linearnu međuovisnost uz zanemarivu osjetljivost na druge endogene tvari. Interferencije od strane natrijevih i amonijevih iona minimizirane su dodatkom Kryptofixa i glutamat dehidrogenaze. U ukupnom enzimatskom procesu, PK defosforilira fosfoenolpiruvat (PEP) do piruvata, dok laktat dehidrogenaza (LDH) katalizira prevođenje piruvata u laktat, pri čemu se NADH oksidira u NAD^+ . Stopa promjene apsorbancije mjerene između 340 nm i 405 nm je rezultat oksidacije NADH što je direktno proporcionalno količini kalija u uzorku.



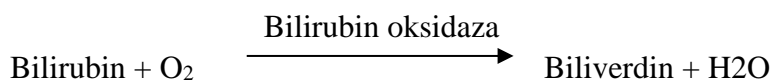
Natrij

Za mjerenje koncentracije natrija korištenjem standardne kliničke kemijske instrumentacije razvijene su kolorimetrijske i enzimatske metode. U Abaxis enzimatskoj reakciji, natrij aktivira β -galaktozidazu u uzorku. Aktivirani enzim katalizira reakciju o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozida (ONPG) do o-nitrofenola i galaktoze. Reakcijska stopa nastajanja produkata mjerena između 405 nm i 500 nm proporcionalna je koncentraciji natrija.



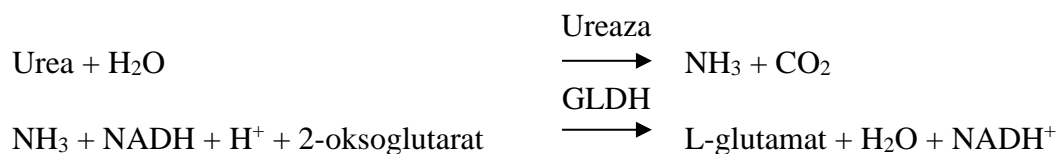
Ukupni bilirubin

Koncentracije ukupnog bilirubina obično se mjere testovima koji koriste diazotiziranu sulfanilnu kiselinu. Međutim, razvijene su nove, specifičnije metode koje koriste bilirubin oksidazu. Prilikom korištenja specifičnijeg testa za ukupni bilirubin, potrebno je minimizirati fotodegradaciju amilata na analizatoru da bi se postigla mogućnost testiranja uzorka odmah nakon prikupljanja. U enzimatskoj proceduri bilirubin oksidira u biliverdin posredstvom bilirubin oksidaze. Bilirubin se kvantificira kao razlika u apsorbanciji između 467 nm i 550 nm. Inicijalna apsorbancija ove reakcije određuje se iz slijepe probe, a konačna iz testne kivete. Količina bilirubina u uzorku proporcionalna je razlici između inicijalnog i konačnog mjerenja apsorbancije.



Urea dušik

U Abaxis sustavu koristi se kombinirana enzimatska reakcija. U prvoj reakciji, ureaza hidrolizira ureu u amonijak i ugljikov dioksid. U drugoj reakciji, amonijak reagira s 2-oksoglutaratom i NADH, teenzim glutamat dehidrogenaza (GLDH) oksidira NADH do NAD⁺.



Stopa promjene u apsorbanciji mjeri se kao razlika u apsorbanciji pri 340 nm i 405 nm, kao posljedica oksidacije NADH u NAD⁺, što je proporcionalno količini uree prisutne u uzorku.

Svaki VetScan Comprehensive Diagnostic Profile reagens rotor sadrži liofilizirane specifične reagense za kemijsku reakciju opisnu za svaki parametar. Suhi uzorak slijepe probe je uključen u svaki reagens rotorisadrži puffer i konzervanse. Posebno namijenjene slijepe probe uključene su u rotor u svrhu izračuna koncentracija kreatinina, ukupnog bilirubina i ukupnih proteina. Svaki kit također sadrži otapalo (diluens) koji se sastoji od surfraktanata i prezervativa.

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

Prikupljanje i priprema uzoraka:

Uzorci seruma dobiveni su punkcijom srca životinja koje su bile anestezirane mješavinom xylapana i narketana (omjer 1:10, 0,1 ml/g životinje).

Minimalna potrebna količina uzorka je ~100 µL heparinizirane cijele krvi, heparinizirane plazme, seruma ili kontrole. Rotor s reagensima može zaprimiti najviše 120 µL uzorka.

Uzorke prikupljene u hepariniziranoj mikropipeti treba prebaciti u rotor odmah nakon prikupljanja.

Za prikupljanje uzoraka cijele krvi ili plazme koristiti samo tubice sa litij heparinom. (green stopper). Za uzorke seruma koristiti samo serum separator tubice ili tubice bez aditiva (red stopper).

Uzorci cijele krvi prikupljeni venipunkturu moraju biti homogenizirani prije prijenosa uzorka u rotor

Testiranje mora započeti unutar 10 minuta od prebacivanja uzoraka u rotor.

Testiranje uzoraka cijele krvi prikupljenih venipunkturu mora započeti unutar 60 minuta od trenutka prikupljanja, a ako to nije moguće, onda separirati uzorke i prebaciti uzorke u čiste ispitne tubice. Pokrenuti testiranje razdvojene plazme ili seruma unutar 5 sati od centrifugiranja. Ako to nije moguće, onda rashladiti uzorke u testnim tubicama na 2-8 °C u trajanju ne duljem od 48 sati. Uzorak plazme ili seruma može biti pohranjen na -10 °C najdulje 5 tjedana u hladnjaku bez ciklusa samoodmrzavanja.

Koncentracija glukoze pada približno brzinom 5-12 mg/dl u 1 satu u necentrifugiranim uzorcima na sobnoj temperaturi.

Rashlađivanje uzoraka cijele krvi može značajno promijeniti koncentracije glukoze i kreatinina u uzorcima.

Rezultati ukupnog bilirubina mogu biti ozbiljno narušeni fotodegradacijom. Uzorci cijele krvi čije testiranje nije pokrenuto neposredno nakon prikupljanja moraju se pohraniti na tamnom mjestu ne dulje od 60 minuta. Ako uzorci ne mogu biti ispitani unutar tog perioda,

trebaju se razdvojiti na plazmu i serum te pohraniti u zatvorene tubice na tamnom mjestu tami pri niskoj temperaturi.

Poznate ometajuće supstance:

Jedini antikoagulant preporučen za upotrebu sa Vet Scan Chemistry analizatorom je litij heparin. Natrij heparin ne smije se koristiti za uzorke krvi sa ovim paketom testiranja. Abaxis je proveo istraživanja koja pokazuju kako EDTA, fluoridi, oksalati i bilo koji drugi antikoagulanti koji sadrže amonijeve ione interferiraju sa najmanje jednom kemikalijom iz VetScan cjelovitog dijagnostičkog profila.

Fizičke smetnje (hemoliza, ikterus i lipemija) mogu prouzročiti promjene u koncentracijama pojedinih ispitivanih supstanci. Primjerni indikatori su istaknuti na dnu svake kartice s rezultatima kako bi informirali korisnika o razinama ometala u svakom uzorku. VetScan Chemistry analizator zanemaruje svaki rezultatna koji je utjecala interferencija veće od 10% zbog hemolize, lipemije ili ikterusa. U takvom slučaju prikazuju se oznake "HEM", "LIP" ili "ICT" na kartici sa rezultatima.

Hemoliza može uzrokovati očitavanje znatno povišenih koncentracija kalija. Ovaj problem može proći neopažen pri analizi uzoraka cijele krvi (ispuštanje kalija iz svega 0,5% eritrocita može povećati serumske razine kalija za 0.5mmol/L). Konkretnije, čak nehemolizirani uzorci koji nisu ispravno pripremljeni mogu imati povišene razine kalija zbog unutarstaničnih curenja kalija.

Bilirubin može interferirati sa peroksidazom korištenom u kreatininskoj reakciji. Rezultantne koncentracije kreatinina su snižene kada su razine bilirubina veće od 10 mg/dL.

Koncentracije glukoze su osjetljive na vremensko trajanje od posljednjeg obroka ispitivane životinje i ovise o vrsti prikupljanog uzorka. Za preciznu interpretaciju rezultata glukoze, uzorke valja prikupiti nakon perioda gladovanja od najmanje 12 sati.

Interferencija može biti zamijećena pri ispitivanju ukupnih proteina u uzorka sa lipidemijskim indeksom 3+. (52) Uzorci sa koncentracijama triglicerida većim od 400 mg/dL mogu pokazivati povećane koncentracije ukupnih proteina. (48) Vet Scan Chem. analizator odbacuje sve rezultate sa interferencijom većom od 10 % uzrokovanom lipemijom. U takvom slučaju aparat prikazuje "LIP" umjesto rezultata na kartici s rezultatima.

Vet Scan test za kalij je kombinacija enzimskih reakcija piruvat kinaze (PK) i laktat dehidrogenaze (LDH). Zbog toga, u slučajevima ekstremne mišićne ozlijede ili vrlo povišene koncentracije kreatin kinaze (CK), VetScan može očitati lažno povišene razine kalija. U takvom slučaju, povišena koncentracija kalija mora biti potvrđena korištenjem druge metodologije.

Procedura

Vet Scan sustav funkcionira na ambijentalnoj temperaturi između 15 °C i 32 °C. Vrijeme analize uređaja za svaki rotor je manje od 14 minuta. Uređaj zadržava rotor na temperaturi od 37 °C tijekom ispitnog intervala.

Vet Scan uređaj kalibriran je tvornički tijekom proizvodnje od strane proizvođača prije pošiljke. Barkod ispisan na barkod prstenu rotora nosi informaciju o potrebnoj kalibraciji za taj rotor.

Rezultati: VetScan kemijski analizator automatski izračunava i ispisuje koncentracije analiziranih tvari u uzorcima.



Slika 3. VetScan uređaj (preuzeto sa:<https://www.abaxis.com/vs2-chemistry-analyzer>)

3.2. Mjerenje lipidne peroksidacije

Za mjerenje lipidne peroksidacije koristila se metoda koja mjeri koncentraciju malondialdehida koji nastaje kao glavni product lipidne peroksidacije te je modificirana verzija metode koju su opisali Jayakumar i sur. 2008. bazira se na reakciji tiobarbituratne kiseline sa MDA pri čemu se stvara kromogeni product koji se mjeri spektrofotometrijski.

U eppendorf epruvetu dodaje 100 μ L 8,1%-tnog SDS-a, 750 μ L 20%-tne octene kiseline (pH=3.5), 750 μ L 0,8%-tne TBA i 100 μ L homogenog uzorka. Otopina se zatim stavlja u vodenu kupelj 60 minuta na 100 °C. Nakon toga se naglo hladi na i zatim se centrifugira 15 min na 5000 rpm pri temperaturi od 4–6 °C. Supernatant se izdvaja te se mjeri apsorbancija pri 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izražena je u jedinici nmol MDA po mg proteina.

8,1% SDS

0,81 g SDS-a u 10 mL dH₂O

20% octena kiselina

20 mL 99,5% octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH₂O i podesi pH=3,5 te nadopuni dH₂O do 100 mL

0,8% TBA

0,8 g TBA u 40 mL dH₂O uz lagano zagrijavanje. Dodaje se 500 μ L 5M NaOH te se nadopuni s dH₂O do 100 mL. Priprema se svježe na dan pokusa.

3.3. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

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

Metoda kojom smo mjerili superoksid dimutazu u ovom radu koristi dvije slijepa probe. Prva slijepa proba se sastoji od otopine A čija se apsorbancija mjeri na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služi namještanju aktivnosti enzima ksantin oksidaze (XOD). Sljedeći korak je stavljanje 1,45 mL otopine A, 25 μ L dH₂O te 20-30 μ L XOD (0,8 U/mL), odmah nakon čega se otopina brzo promiješa, prebaci u kivetu te se mjeri promjena apsorbancije što označava aktivnost enzima XOD. Nakon što se postiže optimalna aktivnost SOD ($\Delta A=0,0025$, s obzirom na volumen XOD), u svaku reakcijsku smjesu umjesto dH₂O dodaje se 25 μ L uzorka,

odgovarajući volumen XOD, te se odmah mjeri apsorbancija. Enzimatska aktivnost izražava se kao postotak inhibicije aktivnosti XOD $\%_{\text{inhibicije}} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{slijepa proba}}) * 100$.

Reakcijska otopina A (za SOD)	190 mL 0,05 mM citokroma c (29 mg citokroma c u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
Otopina B enzima ksantin oksidaze (aktivnost 0,8 U/mL)	40 µL ksantin oksidaze i 960 µL dH ₂ O

3.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

Katalazna aktivnost u supernatantu bubrega određena je spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984). U kiveti je pomiješano 20 µL fosfatnog pufera i 980 µL 10 mM H₂O₂, što predstavlja slijepu probu. U sljedećoj kiveti je pomiješano 20 µL razrijeđenog uzorka (bubreg) i 980 µL 10 mM H₂O₂, čime započinje enzimska reakcija. Svaki uzorak termostatiran je na 25 °C. Aktivnost enzima mjerena je jednu minutu pri valnoj duljini $\lambda = 240$ nm. Pad u apsorbanciji u jedinici vremena je mjera katalazne aktivnosti, pri čemu je jedinica katalazne aktivnosti definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1 µmol H₂O₂ u minutu kod pH = 7,0 pri 25 °C gdje koncentracija H₂O₂ pada od 10,3 do 9,2 mM., gdje iznosi duljina kivete l iznosi 1 cm. d predstavlja faktor razrjeđenja uzorka. Aktivnost CAT-a u uzrocima bubrega izražena je u µmol razgrađenog H₂O₂ po minuti po miligramu proteina (µmol H₂O₂/min mg proteina), što odgovara jedinicama CAT-a po miligramu proteina (U CAT/mg proteina).

3.5. Statistička obrada podataka

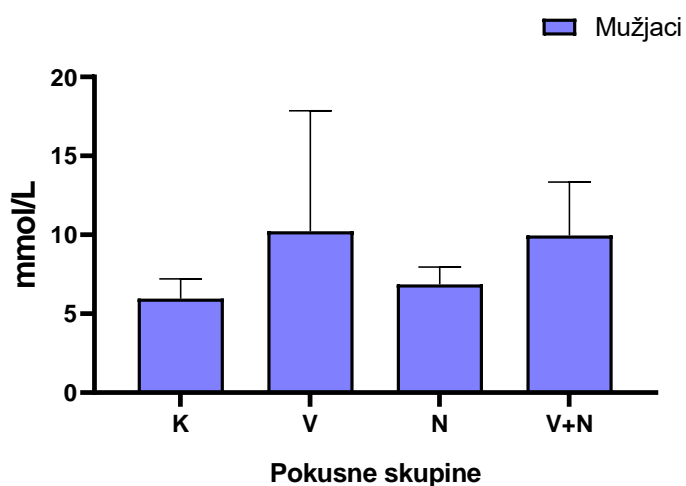
Razlike između skupina su uspoređene na razini statističke značajnosti ($p \leq 0.05$), koristeći ANOVA test sa Tukey's multiple comparisons post hoc testom. Analize i grafovi su napravljene pomoću statističkog programa GraphPad Prism.

4. Rezultati

4.1. Urea i dušik u serumu

Slika 4. prikazuje izmjerene koncentracije uree i dušika u serumu kod četiri pokusne skupine miševa nakon 15 dana. U odnosu na kontrolnu skupinu, skupina tretirana valproatom (V), skupina tretirana naringeninom (N) i skupina tretirana kombinacijom V + N ne pokazuju značajnu statističku promjenu u koncentraciji dušika i ureje u serumu (Tablica 2.).

Urea i vezani dušik (BUN, engl- bind urea nitrogen)u serumu mužjaka



Slika 4. Koncentracija uree i dušika (BUN) (mmol/L seruma). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina

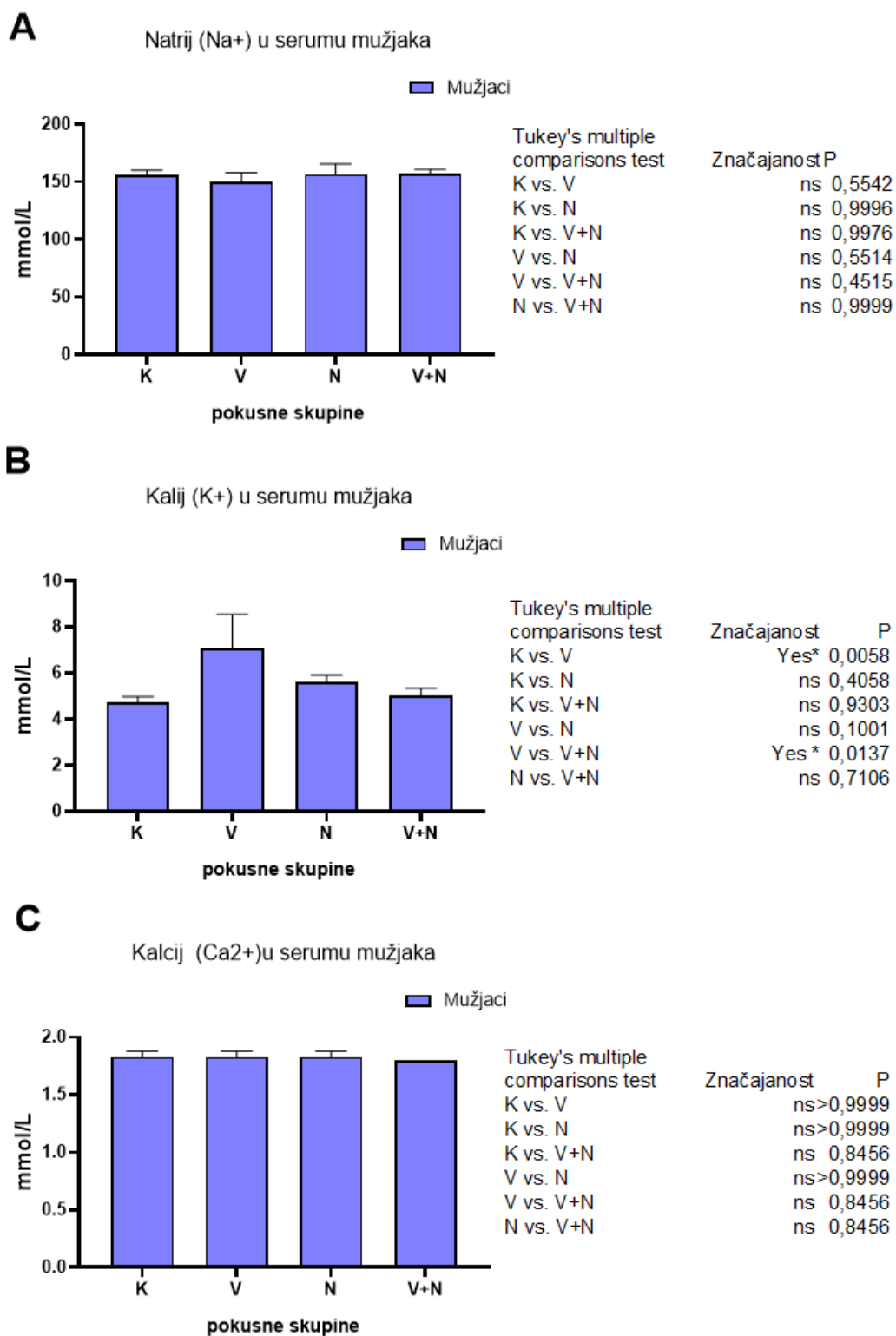
Tablica 2. Statistička analiza koncentracije uree i dušika (BUN).

Tukey's multiple comparisons test	Medijan Razlike,	95,00% CI razlike,	Značajnost	Podešena Zaključak P vrijednost
K vs. V	-4,275	-13,22 do 4,672	Ne	ns 0,5121
K vs. N	-0,9000	-9,847 do 8,047	Ne	ns 0,9903
K vs. V+N	-4,000	-12,95 do 4,947	Ne	ns 0,5642
V vs. N	3,375	-5,572 do 12,32	Ne	ns 0,6848
V vs. V+N	0,2750	-8,672 do 9,222	Ne	ns 0,9997
N vs. V+N	-3,100	-12,05 do 5,847	Ne	ns 0,7365

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

4.2. Natrij, kalcij i kalij u serumu

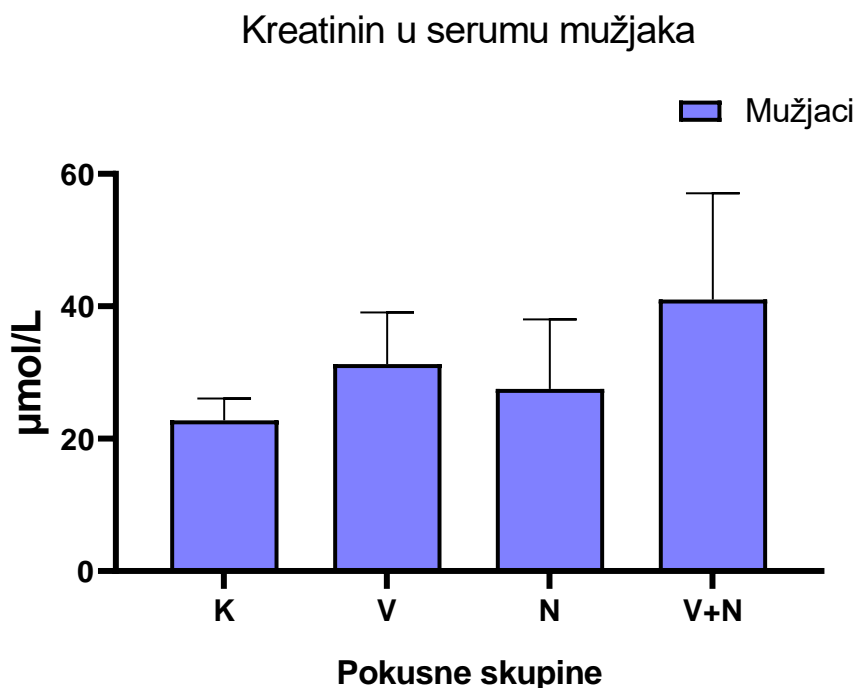
Slika 5. prikazuje izmjerene ukupne koncentracije natrija, kalija i kalcija nakon 15 dana kod pokusnih skupina miševa. Promjena koncentracija natrija u serumu, kod bilo koje od skupina nakon 15 dana, se ne razlikuje značajno od kontrolne skupine. Skupina tretirana valproatom pokazuje statistički značajnu promjenu ukupne koncentracije kalija u odnosu na kontrolnu skupinu, dok skupine tretirane naringeninom i kombinacijom valproata i naringenina ne pokazuju. Skupina tretirana valproatom također pokazuje statistički značajnu promjenu koncentracije kalija u odnosu na skupinu tretiranu kombinacijom N + V. Promjena koncentracije kalcija u serumu bilo koje od skupina nakon 15 dana nije statistički značajna.



Slika 5. A) koncentracija natrija u serumu, B) koncentracija kalija u serumu, C) koncentracija kalcija u serumu pokusni životinja. Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina, ns-nije statistički značajno.

4.3. Kreatininu serumu

Slika 6. prikazuje izmjerene koncentracije kreatinina u serumu pokusnih skupina nakon 15 dana. Promjene koncentracije kreatinina između skupina u odnosu na kontrolnu skupinu nisu statistički značajne (Tablica 3.).



Slika 6. Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$ seruma). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina

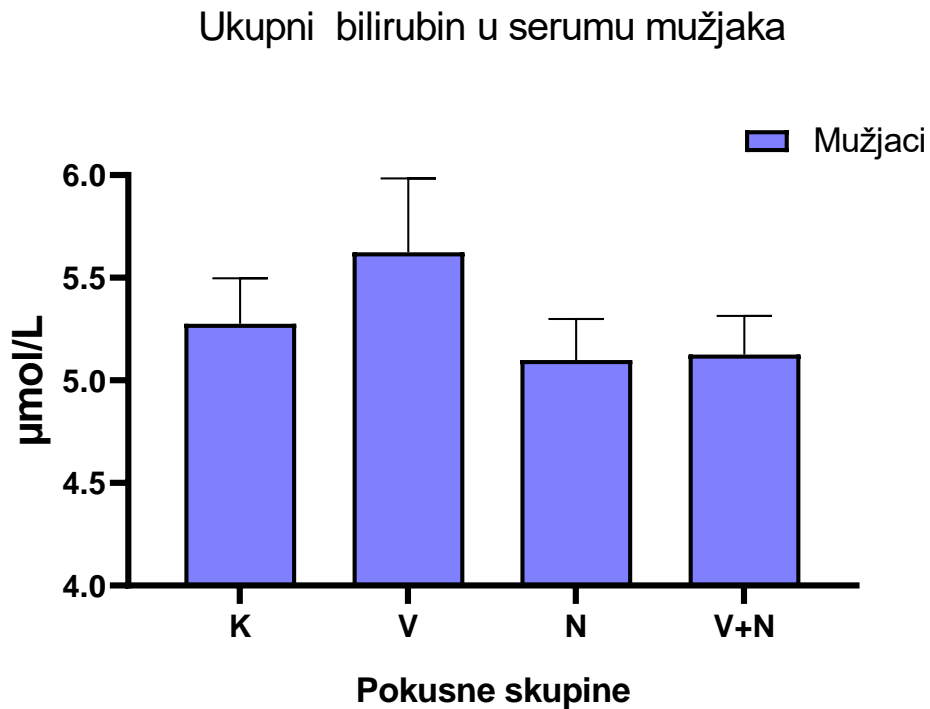
Tablica 3. Statistička analiza koncentracije kreatinina.

Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike,	95,00% CI razlike,	Značajnost?	Zaključak	Podršena P vrijednost
K vs. V	-8,500	-29,43 to 12,43	Ne	ns	0,6266
K vs. N	-4,750	-25,68 to 16,18	Ne	ns	0,9015
K vs. V+N	-18,25	-40,86 to 4,362	Ne	ns	0,1286
V vs. N	3,750	-17,18 to 24,68	Ne	ns	0,9476
V vs. V+N	-9,750	-32,36 to 12,86	Ne	ns	0,5828
N vs. V+N	-13,50	-36,11 to 9,112	Ne	ns	0,3250

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

4.4. Bilirubin u serumu

Slika 7. prikazuje izmjerene koncentracije bilirubina u serumu pokusnih skupina nakon 15 dana. Promjene koncentracije bilirubina u serumu između tretiranih skupina i u odnosu na kontrolnu skupinu nisu statistički značajne (Tablica 4).



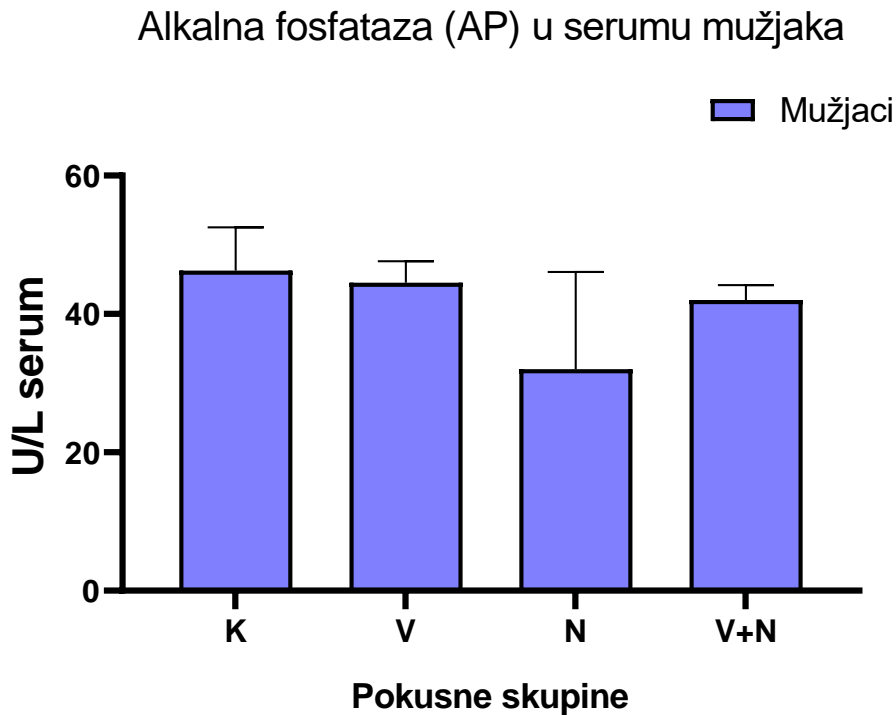
Tablica 4. Statistička analiza koncentracije bilirubina.

Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike	95,00% razlike	Značajnost?	Zaključak	Podršena P vrijednost
K vs. V	-0,3500	-0,8792 to 0,1792	Ne	ns	0,2543
K vs. N	0,1750	-0,3542 to 0,7042	Ne	ns	0,7622
K vs. V+N	0,1500	-0,3792 to 0,6792	Ne	ns	0,8338
V vs. N	0,5250	-0,004188 to 1,054	Ne	ns	0,0521
V vs. V+N	0,5000	-0,02919 to 1,029	Ne	ns	0,0662
N vs. V+N	-0,02500	-0,5542 to 0,5042	Ne	ns	0,9990

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

4.5 Alkalna fosfataza u serumu

Slika 8. pokazuje aktivnost enzima alkalne fosfataze u jedinici (U/mL) u serumu pokasnih skupina nakon 15 dana. Promjene u aktivnosti alkalne fosfataze u serumu pokasnih skupina nije statistički značajna između tretiranih skupina ni u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5).



Slika 8. Aktivnost alkalne fosfataze (U/L seruma). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina

Tablica 5. Statistička analiza aktivnosti alkalne fosfataze (Podatci srednjih vrijednosti i standardnih devijacija prikazani na Slici 8).

Tukey's multiple comparisons test	Medijan razlike,	95,00% CI of diff,	Značajnost?	Zaključak	Podršena P vrijednost
K vs. V	1,750	-14,91 to 18,41	Ne	ns	0,9890
K vs. N	14,25	-2,410 to 30,91	Ne	ns	0,1035
K vs. V+N	4,250	-12,41 to 20,91	Ne	ns	0,8718
V vs. N	12,50	-4,160 to 29,16	Ne	ns	0,1709
V vs. V+N	2,500	-14,16 to 19,16	Ne	ns	0,9692
N vs. V+N	-10,00	-26,66 to 6,660	Ne	ns	0,3277

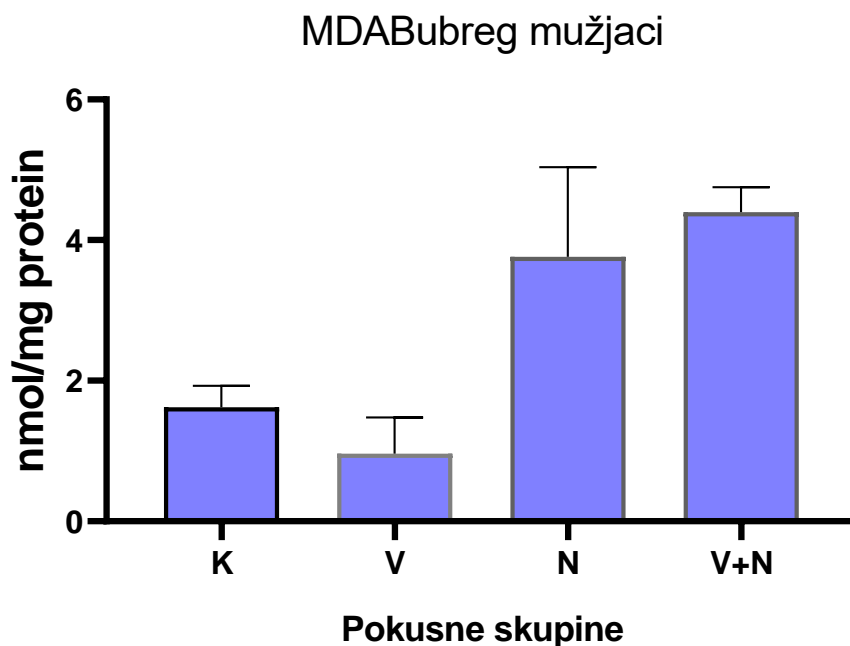
Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana naringeninom, N+V-skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina, ns-nije statistički značajno.

4.5 Antioksidacijski pokazatelji u tkivu bubrega

Slika 9. prikazuje koncentracije malondialdehida (MDA) kao markera lipidne peroksidacije u bubregu pokusnih skupina izmjerenih nakon 15 dana. Razlika u koncentraciji MDA u bubregu kontrolne skupine i skupine tretirane valproatom nije statistički značajna. Skupina tretirana naringeninom te skupina tretirana kombinacijom V+N pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu skupinu. U usporedbi saskupinom tretiranom valproatom, ova razlika je još veća (Tablica 6).

Slika 10. prikazuje aktivnost superoksid dismutaze (SOD) kao antioksidativnog markera u bubregu pokusnih skupina izmjerenu nakon 15 dana. Dok statistički značajne razlike između kontrolne skupine i skupine tretirane valproatom i skupine tretirane naringeninom nema, postoji statistički značajno povećanje aktivnosti SOD kod skupine tretirane kombinacijom V+N. Uspoređujući aktivnost SOD skupine tretirane valproatom i skupine tretirane naringeninom također se primjećuje statistički značajno povećanje u potonjoj skupini, dok je razlika još veća kod skupine tretirane kombinacijom V+N (Tablica 7).

Slika 11. prikazuje aktivnost enzima katalaze (CAT) u bubregu pokusnih skupina koja također služi kao antioksidacijskimarker i izmjerena je nakon 15 dana. U odnosu na kontrolnu skupinu, aktivnost katalaze je povećana značajnije u skupini tretiranoj valproatom, dok preostale dvije tretirane skupine ne pokazuju značajnije odstupanje. Statistički značajna razlika postoji također između skupine tretirane valproatom i skupine tretirane naringeninom, međutim ne postoji statistički značajna razlika između skupine tretirane valproatom te skupine tretirane kombinacijom V+N (Tablica 8).



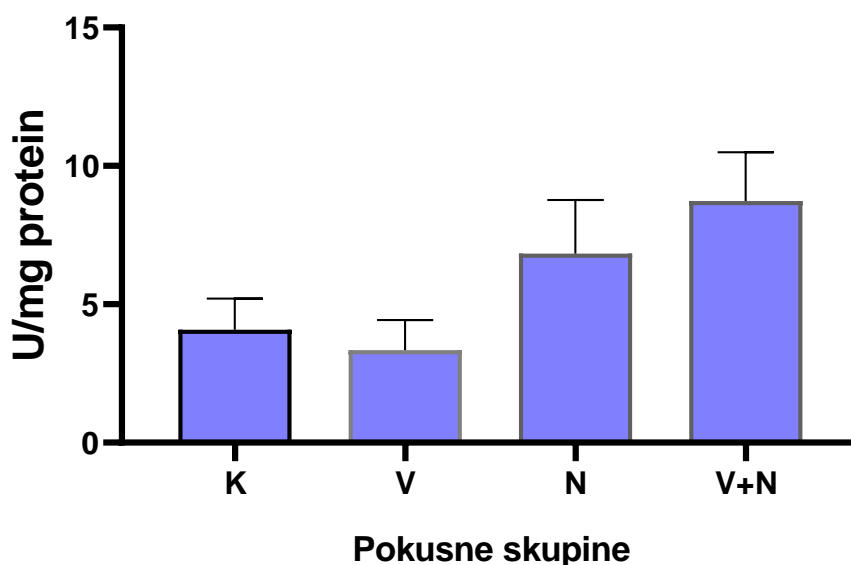
Slika 9. Koncentracija malondialdehida (nmol/mg protein). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V-Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina.

Tablica 6. Statistička analiza koncentracije malondialdehida.

Dunn's multiple comparisons test	Medijan razlike,	Značajnost?	Zaključak	Podršena P vrijednost
K vs. V	6,000	Ne	ns	>0,9999
K vs. N	-11,75	Da	*	0,0473
K vs. V+N	-14,25	Da	*	0,0143
V vs. N	-17,75	Da	***	0,0009
V vs. V+N	-20,25	Da	****	<0,0001
N vs. V+N	-2,500	Ne	ns	>0,9999

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

SOD Bubrezi muškarci

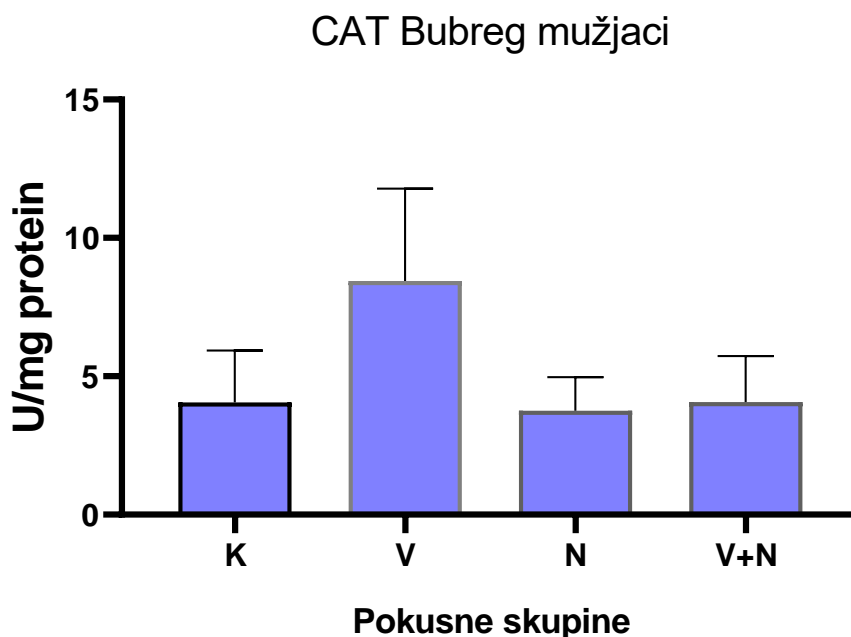


Slika 10. Aktivnost superoksid dismutaze (U/mg proteina). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina.

Tablica 7. Statistička analiza aktivnosti superoksid dismutaze.

Dunn's multiple comparisons test	Medijan razlike	Značajnost?	Zaključak	Podršena P vrijednost
K vs. V	3,875	Ne	ns	>0,9999
K vs. N	-10,63	Ne	ns	0,1410
K vs. V+N	-15,25	Da	**	0,0069
V vs. N	-14,50	Da	*	0,0120
V vs. V+N	-19,13	Da	***	0,0003
N vs. V+N	-4,625	Ne	ns	>0,9999

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



Slika 11. Aktivnost katalaze (U/mg proteina). Pokusne skupine: K-kontrola, V-skupina tretirana valproatom, N-skupina tretirana varingeninom, N+V Skupina tretirana kombinacijom valproata i naringenina

Tablica 8. Statistička analiza aktivnosti katalaze.

Dunn's multiple comparisons test	Medijan razlike,	Značajnost?	Zaključak	Podršena P vrijednost
K vs. V	-13,00	Da	*	0,0331
K vs. N	0,000	Ne	ns	>0,9999
K vs. V+N	-1,000	Ne	ns	>0,9999
V vs. N	13,00	Da	*	0,0331
V vs. V+N	12,00	Ne	ns	0,0624
N vs. V+N	-1,000	Ne	ns	>0,9999

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

5. Rasprava

Rezultati istraživanja potvrđuju relativno blagi toksični učinak valproata na bubrež i bubrežne funkcije. Poremećajem rada proksimalnog tubula i onemogućivanjem reasorpcije u serumu su, iako ne značajno, povišene koncentracije kreatinina i ureje (dušika), ali je značajno povišena koncentracija kalija. Ne postoji značajna razlika u aktivnosti alkalne fosfataze između kontrolne skupine i skupine tretirane valproatom što znači da valproat nije utjecao na metabolizam monoestera te nastajanje fosfata. Koncentracija bilirubina u serumu pokusne skupine tretirane valproatom je, iako ne značajno, povišena u odnosu na kontrolnu i preostale dvije skupine, čemu je najvjerojatniji razlog zasićenje albumina vezanjem na valproat, što rezultira elevacijom slobodnog bilirubina u serumu, dok je njegova eliminacija inhibirana zasićenjem UDP-glukuroniltransferaze valproatom koji je u kompeticiji sa bilirubinom (Yu i Shen, 1998). Tretmani valproatom, naringeninom i kombinacijom oba nisu pokazali značajnije odstupanje koncentracije kalcija i natrija od kontrolne skupine. Koncentracija kalija u serumu skupine tretirane valproatom pokazuje značajan porast u odnosu na kontrolnu skupinu te je koncentracija kalija u skupini tretiranoj kombinacijom oba spoja statistički značajno manja od nje.

Istraživanje se uglavnom poklapa sa podacima iz literature. El-Shhenawy i Hamza, 2016. su proveli istraživanje utjecaja nefrotoksičnosti valproata u štakora i kako L-cistein smanjuje toksične efekte. U njihovom istraživanju serumska koncentracija kreatinina u dvjema pokusnim skupinama (n=10) tretiranima sa manjom i većom dozom valproata se primjećuje značajan porast koncentracije kreatinina. Porast kreatinina u serumu kod terapije valproatom se zamjećuje i u ljudi, primjericu u studiji iz 2018. koje provode Hamed i sur. gdje se na uzroku od 60 ljudi primjećuje porast koncentracije kreatinina (iako unutar referentnih vrijednosti). Drugo istraživanje, koje je proveo Al-Almoudi 2017. istražuje protektivni utjecaj ulja komorača na oštećenja proizvedena valproatom. Eksperiment je proveden na Sprague-Dawley štakorima kojih u podijeljeni u 4 skupine (n=10). Prva skupina je kontrolna, druga je tretirana valproatom, treća uljem komorača i četvrta kombinacijom oba spoja 3 puta tjedno u periodu od 6 tjedana. Izmjereni su biokemijski markeri: dušik iz ureje u krvi, kreatinin, bilirubin, ukupni protein te aktivnosti enzima alkalne fosfataze, alanin-aminotransferaza i aspartat transaminaza. U serumu je zabilježen značajniji porast koncentracija dušika iz ureje u krvi, kreatinina i bilirubina, te aktivnost alkalne fosfataze. Uspoređujući te podatke s našim eksperimentom, gdje se u slučaju dušika iz ureje, kreatinina te bilirubina također se bilježi porast koncentracija, razliku predstavlja aktivnost alkalne fosfataze kojoj u našem eksperimentu nije zabilježena povećana

aktivnost. Kod skupina tretiranih uljem komorača i kombinacijom oba spoja bilježi se značajan pad u svim navedenim markerima te se farmaceutska, antioksidativna te antiupalna svojstva ulja komorača potvrđuju ovim eksperimentom.

Smanjena koncentracija malondialdehida znači smanjena aktivnost lipidne peroksidacije, najvjerojatnije jer je u našem slučaju zamjetno veća aktivnost enzima katalaze, koja otklanja vodikov peroksid koji je glavni uzročnik lipidne peroksidacije. Podatci iz literature se u slučaju malondialdehida ne poklapaju sa našim podacima. Eksperiment iz 2014. kojeg su proveli Chaudhary i sur. gdje su testirali antioksidacijski i nefroprotektivni učinak flavonoida kvercetina valproat na bubreg Wistar mužjaka miševa. U grupama koje su tretirane samo sa valproatom izmjerene su veće količine malondialdehida. Tretman kvercetinom je u eksperimentu smanjio koncentraciju malondialdehida te općenito djelovao antioksidativno. Aktivnost superoksid dismutaze u skupine tretirane valproatom u našem eksperimentu je, iako ne značajno, smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u skupinama tretiranim naringeninom te kombinacijom oba spoja značajno povećana u odnosu na kontrolnu skupinu i na skupinu tretiranu valproatom. Aktivnost katalaze je, međutim, povećana u skupini tretiranoj valproatom u odnosu na kontrolnu skupinu te na skupine tretirane naringeninom i kombinacijom oba spoja. Ovi vrijednosti se poklapaju sa podacima iz literature za superoksid dismutazu, ali ne i za katalazu. U istraživanju spomenutom ranije, El Shhenawy i sur. mjere aktivnosti antioksidativnih enzima u štakora tretiranih: valproatom u manjoj i većoj dozi, L-cisteinom i kombinacijom oba spoja. Primjećuje se smanjenje aktivnosti superoksid dismutaze, katalaze, glutathion peroksidaze i glutathion reduktaze kod skupina tretiranih samo valproatom, posebice u skupini sa većom dozom, dok se aktivnost povećava u skupina tretiranih L-cisteinom te kombinacijom oba spoja. U drugom eksperimentu kojeg su 2014. Proveli Gezginci-Oktayoglu i sur. testirajući antioksidativna, antiupalna i antifibrozna svojstva vitamina U (S-metilmetionina), prirodnog derivata iz nekih biljaka, na štetne učinke valproata u bubregu. Za pokus su korištene ženke Sprague-Dawley štakora koje su podjeljene u 4 skupine: kontrolna skupina, skupina tretirana valproatom, skupina tretirana vitaminom U te skupina tretirana kombinacijom oba spoja. Nakon 15 dana su im se mjerili serumski markeri. Kao oksidacijski markeri mjereni su lipidna peroksidacija (koncentracija malondialdehida), koncentracija glutathiona, te aktivnosti ksantin oksidaze, superoksid dismutaze i katalaze. U skupini tretiranoj valproatom aktivnost ksantin oksidaze je bila značajno povišena dok je aktivnost superoksid dismutaze bila smanjena. U istoj skupini je koncentracija glutathiona i aktivnost glutathion-S-transferaze također bila smanjena. Ovo je rezultiralo značajnim nakupljanjem vodikovog peroksida unutar stanice zbog njegove

smanjene eliminacije. Za razliku od našeg eksperimenta i sukladno podacima iz literature koncentracija malondialdehida je u skupini tretiranoj valproatom bila povišena, dok je aktivnost katalaze bila smanjena. Kod skupina tretiranih kombinacijom valproata i vitamina U (S-metilmetionin) aktivnost enzima se povećala, koncentracija malondialdehida je pala te se time dokazuje antioksidacijski učinak vitamina U.

Tretman isključivo naringeninom pokazao je oprečne rezultate. Iako su razlike statistički beznačajne, koncentracije dušika iz ureje u krvi, kreatinina bilirubina zajedno sa aktivnošću alkalne fosfataze i katalaze su manje od onih u skupini tretiranih valproatom, što znači manje oštećenje bubrega te bolja reasorpcija u proksimalnim bubrežnim kanalicima. Zanimljivo je da lipidna peroksidacija te aktivnost superoksid dismutaze značajno povišena u odnosu na kontrolnu skupinu. Eksperiment koji su 2020. izveli Shakeel i sur. u kojem se testirao utjecaj naringenina na oksidacijski stres u hipokampusu izazvan pilokarpinom je, za razliku od našeg, pokazao mnogo veću antioksidativnu aktivnost naringenina. Pokuse se provodio na 5 grupa švicarskih albino miševa (n=10). Prva skupina je bila kontrolna, druga skupina se 15. dana tretirala pilokarpinom u dozi od 300 mg/kg, treća skupina valproatom 15 dana (doza 300 mg/kg) te im je 15. dana administriran pilokarpin (doza 300 mg/kg). Posljednje dvije grupe tretirane su naringeninom 15 dana (jedna dozom od 20 mg/kg, druga dozom od 40 mg/kg) te im je 15. dana administriran pilokarpin (300 mg/kg). Nakon 15 dana, životinje su žrtvovane, izoliran im je i homogeniziran hipokampus. Mjereni su markeri oksidativnog stresa: lipidna peroksidacija preko koncentracije MDA i aktivnost SOD, CAT i glutation reduktaze (GR). Skupina tretirana kombinacijom valproata i pilokarpina nije dala statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Skupine tretirane naringeninom uvelike su smanjile oksidacijski stres izazvan pilokarpinom, povećavajući aktivnost SOD, CAT i GR i smanjujući koncentraciju MDA značajno u odnosu na skupinu tretiranu isključivo pilokarpinom. Kombinirani unos valproata i naringenina dao je podvojene rezultate. Koncentracije dušika iz ureje u krvi i kreatinina su, iako ne značajno, povišene u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija dušika iz ureje u krvi slična je onoj u skupini tretiranoj valproatom, dok je razina kreatinina čak i nešto viša od iste. Razina bilirubina je slična kao i kod kontrolne skupine i, premda ne značajno, niža od skupine tretirane valproatom. Aktivnost alkalne fosfataze se ne razlikuje uvelike od skupine tretirane valproatom i kontrolne skupine. Lipidna peroksidacija se značajno povećala u odnosu na kontrolnu skupinu, te još više u odnosu na skupinu tretiranu valproatom. Aktivnost superoksid dismutaze je također povećana u odnosu na skupinu sa valproatom, dok je aktivnost katalaze smanjena. Za bolje razumijevanje ovakvih rezultata u antioksidacijskom sustavu

trebala bi se napraviti analiza aktivnosti prooksidativnih enzima kao što je ksantin oksidaza. Pri analizi rezultata treba uzeti u obzir dugotrajnu pohranu bubrežnog tkiva u zamrzivaču i uzeti to u obzir pri mjerenju aktivnosti enzima i markera oštećenja. Također je moguće da sinergistička primjena valproata i naringenina zapravo djeluje prooksidativno na bubreg, te potiče oštećenja, pri čemu bi se trebao razmotriti smanjen unos agruma i hrane bogate naringeninom kod pacijenata koji se liječe valproatom.

6. Zaključci

U pokusnim skupinama tretiranim isključivo valproatom pokazano je da valproat ometa normalnu homeostazu bubrega i bubrežne funkcije, povećavajući koncentracije dušika, kreatinina i bilirubina što ukazuje na oštećenje bubrežnih tubula.

Lipidna peroksidacija te aktivnost superoksid dismutaze, glavni markeri oksidativnog oštećenja, smanjeni su kod tretmana valproatom što se može objasniti visokom aktivnošću katalaze koja uklanja vodikov peroksid. Visoka aktivnost katalaze također označava porast oksidacijskog stresa (izazvanog vodikovim peroksidom) unutar bubrežnog tkiva.

Tretman isključivo naringeninom dao je rezultate suprotne očekivanom, povećavajući oksidacijski stres.

Tretman kombinacijom naringenina i valproata dao je neočekivane rezultate te nije posebno utjecao na smanjivanje oksidativnog stresa. Serumske koncentracije metabolita nisu bitno promijenjene u odnosu na tretman valproatom (osim kalija).

Za postizanje boljih rezultata u idućim eksperimentima ovi se parametri trebaju ispitivati u skupinama koje primaju različite doze valproata. Uz mjerenje ovih parametara trebala bi se dodatno mjeriti aktivnost prooksidativnih enzima, primjerice ksantin oksidaze.

Treba uzeti u obzir oralno apliciranje naringenina. Oralnim apliciranjem naringenina apsorbira se tek oko 15 % te se trebaju razmotriti druge metode apliciranja.

7. Literatura

Ayano, G. (2016) „Bipolar Disorders and Valproate: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Therapeutic Effects and Indications of Valproate: Review of Articles“, *Bipolar Disorder: Open Access*, 02(02). doi: 10.4172/2472-1077.1000109.

Al-Amoudi, W. M. (2017) „Protective effects of fennel oil extract against sodium valproate-induced hepatorenal damage in albino rats“, *Saudi Journal of Biological Sciences*. King Saud University, 24(4), str. 915–924. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.10.021.

Chateauvieux, S., Morcea, F., Dicato, M., Diederich, M. (2010) „Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid“, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, str. 1–18. doi: 10.1155/2010/479364.

Chaudhary, S. Ganjoo P., Raiusddin S., Parvez S,(2014). „Nephroprotective activities of quercetin with potential relevance to oxidative stress induced by valproic acid“, *Protoplasma*, 252(1), str. 209–217. doi: 10.1007/s00709-014-0670-8.

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), str. 1116–1125. doi: 10.1038/sj.mp.4001893.

El-Shenawy, N. S. i Hamza, R. Z. (2016) „Nephrotoxicity of sodium valproate and protective role of L-cysteine in rats at biochemical and histological levels“, *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27(5), str. 497–504. doi: 10.1515/jbcpp-2015-0106.

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), str. 127–135. doi: 10.1007/s00709-015-0796-3.

Ghodke-Puranik, Y. Thorn, C. F., Lamba, J. K., Leeder, J. S., Song, W., Birnbaum, A. K.,

Altman, R.B., Klein, T. E. (2013) „Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics“, *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(4), str. 236–241. doi: 10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2.

Hamed, S. A., Rageh, T.A., Mohamad, A.O., Abou Elnour, S. M. (2018). „Renal dysfunctions/injury in adult epilepsy patients treated with carbamazepine or valproate“, *Expert Review of Clinical Pharmacology*. Taylor & Francis, 11(8), str. 819–824. doi: 10.1080/17512433.2018.1501556.

Hall, A. M., Unwin, R. J., Parker, N., Duchon, M. R. (2009) „Multiphoton imaging reveals differences in mitochondrial function between nephron segments“, *Journal of the American Society of Nephrology*, 20 (6), str. 1293–1302. doi: 10.1681/ASN.2008070759.

Heidari, R., Jafari, F., Khodaei, F., Shirazi Yeganeh, B. and Niknahad, H. (2018), Mechanism of valproic acid-induced Fanconi syndrome involves mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rat kidney. *Nephrology*, 23: 351-361. doi:10.1111/nep.13012.

Johannessen, C. U. i Johannessen, S. I. (2003) „Valproate: Past, Present, and Future Mechanisms of Action“, *CNS Drug Reviews*, 9 (2), str. 199–216.

Kanai, H. Sawa, A., Chen, R. W., Leeds, P., Chuang, D. M. (2004) „Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons“, *Pharmacogenomics Journal*, 4, str. 336–344. doi: 10.1038/sj.tpj.6500269.

Knights, M. J. i Finlay, E. (2014) „The effects of sodium valproate on the renal function of children with epilepsy“, *Pediatric Nephrology*, 29(7), str. 1131–1138. doi: 10.1007/s00467-013-2512-x.

Lagace, D. C. Diane C., O'Brien, W. T., Gurvich, N., Nachtigal, M. W., Klein, P. S. (2004) „Valproic acid: How it works. Or not“, *Clinical Neuroscience Research*, 4, str. 215-225. doi: 10.1016/j.cnr.2004.09.013.

Löscher, W. (2002) „Basic pharmacology of valproate: A review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy“, *CNS Drugs*, 16, str. 669–694. doi: 10.2165/00023210-200216100-00003.

Marson, A. G. i Sills, G. J. (2016) „Valproate“. U: Shorvon S, Perucca E., Engel J. (ur). *Treatment od Epilepsy*, četvrto izdanje. John Wiley & Sons, Ltd. Str. 652-666.

Laeng, P., Pitts R. L., Lemire, A. L., Drabik, C. E., Weiner, A., Tang, H., Thyagarajan, R., Mallon B. S., Altar, C. A. (2004) „The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells“, *Journal of Neurochemistry*, 91, str. 238–251. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02725.x.

Salehi, B., Fokou, P., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., Sharifi-Rad, J. (2019). The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 12(1), str. 1-18. doi.org/10.3390/ph12010011.

Schäfer M., Brandl E.J. (2020) Mood Stabilizers: Valproate. U: Riederer P., Laux G., Mulsant B., Le W., Nagatsu T. (ur). *NeuroPsychopharmacotherapy*. Springer, Cham. Str. 1-9

Shakeel, S., Rehman, M. U., Tabassum, N., Amin, U., Mir, M. (2017). Effect of Naringenin (A naturally occurring flavanone) Against Pilocarpine-induced Status Epilepticus and Oxidative Stress in Mice. *Pharmacognosy magazine*, 13, str. 154–S160. doi.org/10.4103/0973-1296.203977.

Small, D. M., Coombes, J. S., Bennett, N., Johnson, D. W., Gobe, G. C. (2012) „Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology* 17, str. 311–321.

Yu, H. Y., i Shen, Y. Z. (1998). Effect of valproate on the pharmacokinetics of free and total plasma bilirubin in experimental hyperbilirubinemia in guinea pigs. *Journal of pharmaceutical sciences*, 87(1), str. 21–24. doi.org/10.1021/js970236+.

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 14.12.1996. u Splitu. Osnovnu školu završio sam u Kaštel Sućurcu. 2015. godine završio sam I. Gimnaziju (jezični program) u Splitu. Iste godine upisujem prediplomski studij Biologije i ekologije mora na Sveučilišnom odjelu za studije mora u Splitu te 2018. stječem zvanje prvostupnika obranom završnog rada pod nazivom „Bioaktivni spojevi morskih beskralješnjaka“. Iste godine upisujem diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul: Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu (PMF).