Učinak antiepileptika valproata i flavanona naringina na antioksidacijski sustav obrane u mozgu, jetri i bubregu

Jutrić, David

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:598078

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

David Jutrić

UČINAK ANTIEPILEPTIKA VALPROATA I FLAVANONA NARINGINA NA ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV OBRANE U MOZGU, JETRI I BUBREGU

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Zagreb, 2022

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

David Jutrić

THE EFFECTS OF THE ANTIEPILEPTIC DRUG VALPROATE AND OF THE FLAVANONE NARINGIN ON THE ANTIOXIDATIVE DEFENCE SYSTEM IN THE BRAIN, LIVER AND KIDNEY

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof. Domagoj Đikić, PhD

Zagreb, 2022

Ovaj je doktorski rad izrađen na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Životopis mentora

prof. dr. sc. Domagoj Đikić

(broj u upisniku istraživača: 236741)

Redoviti profesor dr. sc. Domagoj Đikić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, radi na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od 2000. godine. U Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a, u zvanje redovitog profesora izabran je 2018. godine. Doktorirao je na istom fakultetu obranom doktorskog rada „Učinak prometrina na odnose serumskih i tkivnih enzimatskih biomarkera u miša“ pod vodstvom profesora Oskara Springera. Nakon doktorata usavršavao se na Sveučilištu Phillips universität u Marburgu u Njemačkoj na Zavodu za animalnu fiziologiju i fiziologiju metabolizma u sklopu vlastitog postdoktorskog projekta „Uloga glikolipida gangliozida i lipidnih splavi u stanjima hibernacije, torpora, hipometabolizma i suspendirane animacije kralješnjaka“, financiranog od Hrvatske zaklade za znanost. Znanstveni interes, uz modelna biomedicinska istraživanja na laboratorijskim životinjama i staničnim modelima u području fiziologije, toksikologije i metabolizma, proširio je istraživanjima fizioloških i molekularnih mehanizama i promjena u organizmu uvjetovanih različitim vrstama prehrane. Od zaposlenja na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu vodi i sudjeluje u izvođenju nastave iz tematskih kolegija u području fiziologije, neurofiziologije, toksikologija metabolizma i oksidacijskog stresa u ljudi i životinja. Na matičnom fakultetu obnašao je brojne voditeljske dužnosti od kojih se ističu ova: voditelj studijskih programa i povjerenik Biološkog odsjeka PMF-a za međunarodnu suradnju. Na drugim institucijama nositelj je kolegija Osnove biologije za studente psihologije na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu od 2009. godine. Vodio je kolegij Fiziologija čovjeka na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (2009.-2017.). Izabrani je predavač na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu gdje je od 2006. godine predavao kolegije Fiziologija čovjeka i Osnove ekologije. Vodio je 5 doktorskih radova i više od 40 magistarskih, diplomskih i završnih radova od kojih je jedan nagrađen rektorovom nagradom. Objavio je radove u koautorstvu sa studentima i doktorantima. Sudjelovao je na 14 projekata (10 nacionalnih i 4 međunarodna), financiranih od Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske, strukturnih fondova Europske unije Hrvatske zaklade za znanost i Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Voditelj je stručnog projekta PMF-a i Ministarstva zdravstva RH-e „Ocjena biocidnih pripravaka“ i suradnik je u projektu Centra izvrsnosti Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Autor je i koautor preko 70 znanstvenih radova, a prema bazama WoS i Scopus od toga je 40 radova objavljeno u kvartilima iznad medijana područja (Q1,Q2) i citirani su više od 700 puta (h-index: 16). Baza GoogleScholar citira ga 1213 puta (h-index 21). Koautor je ili autor 10 poglavlja u knjigama i priručnicima. Prezentirao je više od 80 radova na znanstvenim skupovima, od toga 40 međunarodnih. Urednik je u časopisu Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. Sudjeluje u radu 5 strukovnih društava: Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog društva fiziologa, Hrvatskog društva biokemičara i molekularnih biologa, Hrvatskog genetičkog društva, Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama gdje je obnašao dužnost člana predsjedništva. Član je Državnog bioetičkog povjerenstva za dobrobit životinja i predsjednik Bioetičkog povjerenstva za dobrobit životinja na Prirodoslovno- matematičkom fakultetu.

Zahvala

Zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na stručnom vodstvu, strpljenju, podijeljenom znanju, dobroj organizaciji, savjetima i podršci tijekom izrade i pisanja ovoga rada.

Zahvaljujem svim zaposlenicima Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za stručnu i tehničku pomoć pri izradi ovoga rada. Posebno zahvaljujem zaposlenici Zavoda za animalnu fiziologiju Dyani Odeh, mag. exp. biol., dr. sc. Anici Horvat-Knežević i laboratorijskoj tehničarki Mariji Potočić te studentima eksperimentalne biologije i diplomantima profesora Domagoja Đikića: Eleni Marić, Draganu Juriću, Tončiju Milardoviću i Almošu Borošu koji su doprinjeli u eksperimentalnom radu tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima, sestri, bratu, i ujaku koji su me podržavali tijekom cijelog doktorskog studija.

Sveučilište u Zagrebu Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Učinak antiepileptika valproata i flavanona naringina na antioksidacijski sustav obrane u mozgu, jetri i bubregu

DAVID JUTRIĆ

Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

Valproat je često korišten antiepileptički lijek. Neželjene pojave kod predoziranja ili produljenog unosa uključuju oksidaciju neurona, hepatičnu steatozu i zatajenje jetre, te Fankonijev sindrom. Velik broj istraživanja usmjeren je prema mogućnostima umanjivanja tih nepovoljnih učinaka sinergijskim uzimanjem prirodnih bioaktivnih molekula, primjerice naringina. C57BL6 miševi oba spola bili su svakodnevno, tijekom 10 dana, tretirani individualnim dozama i kombinacijom od 150 mg/kg valproata i 25 mg/kg naringina, prirodnog bioaktivnog polifenola iz citrusnih biljaka. Također su tretirane HepG2 i PK stanice *in vitro*. Između skupina tretiranih valproatom, naringinom te kombinacijom ova dva spoja, u mozgu, jetri i bubregu, uspoređena je peroksidacija lipida (analizom malondialdehida, MDA), te glavni markeri antioksidacijske stanične obrane (superoksid dismutaza-SOD, katalaza-CAT, reducirani glutation-GSH). Koncentracije MDA, CAT i GSH uspoređeni su i u *in vitro* pokusu. Dodatno su u jetri analizirani transkripcijski faktori i enzimi lipidnog metabolizma (PPARα, PGC1α, ACOX1, NFE2R2) i nastanak steatoze. Cilj je bio utvrditi može li primjena naringina ublažiti nuspojave valproata, te do koje mjere se parametri mijenjaju u pokusu *in vivo* i *in vitro*. Uspoređeni su rezultati između muškog i ženskog spola. U korteksu velikog i središnjeg mozga, te u jetri i bubregu valproat uzrokuje lipidnu peroksidaciju. Naringin je također uzrokovao lipidnu peroksidaciju ali samo u mozgu i bubregu vjerojatno zbog prooksidacijskog djelovanja katalitičkih doza naringina u apolarnom okruženju. Naringin u kombinaciji s valproatom je ublažio oštećenje bubrega i jetre, donekle je zaštitio mozak, a razine lipida i triglicerida u serumu, te steatozu jetre vratio je u kontrolne razine. Naringin je normalizirao razine transkripcijskih čimbenika PPARα i PGC1α u jetri, a razine acetilCoA oksidaze 1 (ACOX1) koje valproat podiže, je spustio u kontrolne razine. Zabilježen je značajno veći oksidacijski stres kod mužjaka, vjerojatno jer su ženke zaštićene antioksidacijskim djelovanjem estrogena. *In vitro* model pokusa bi mogao služiti kao predskazatelj *in vivo* staničnih odgovora, ili ga zamjeniti ali uz određene predtretmane hormonima i metabolitima koje treba dodatno istražiti.

Ovaj rad sadrži: (176 stranica, 108 slika, 5 tablica, 272 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: oksidacijski stres, antiepileptik, polifenoli, metabolizam lipida, transkripcijski faktori, steatoza

Mentor: dr. sc. Domagoj Đikić, redoviti profesor

Ocjenjivači: dr. sc. Vesna Benković, redoviti profesor
dr. sc. Irena Landeka Jurčević, redoviti profesor
dr. sc. Dubravka Rašić,viši znanstveni suradnik

Zamjena: dr. sc. Ana Galov, izvanredni profesor

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

The effects of the antiepileptic drug valproate and of the flavanone naringin on the antioxidative defense system in the brain, liver and kidney

DAVID JUTRIĆ

The Department of Animal Physiology, University of Zagreb, Faculty of Science

Valproate is a commonly used antiepileptic drug. Side effects from overdose or prolonged intake include the oxidation of neurons, hepatic steatosis and liver failure, as well as Fancony Syndrome. Extensive research has been done as to elucidate whether the adverse effects can be reduced by synergistic intake of natural bioactive molecules. C57Bl6 mice of both sexes were exposed for 10 days to individual and combined doses of 150 mg/kg valproate and 25 mg/kg naringin, a natural bioactive polyphenol from citrus plants. HepG2 and PK cells were also exposed *in vitro*. In the brain, liver and kidney, the valproate-induced, naringin-induced, and combination of these two compounds-induced lipid peroxidation (*via* malondialdehyde analysis, MDA), as well as the main markers of antioxidant cellular defense (superoxide dismutase-SOD, catalase-CAT, reduced glutathione-GSH) were compared *in vivo* and to the *in vitro* experiment. Additionally, transcription factors and enzymes of lipid metabolism (PPARα, PGC-1α, ACOX1, NFE2R2) and steatosis were analyzed in the liver. The aim was to determine whether the use of naringin reduces the side effects of valproate *in vivo* and *in vitro* experiments. The results were compared between the sexes as well. In the frontal and middle cerebral cortex, liver and kidney valproate caused lipid peroxidation. Naringin also caused lipid peroxidation but only in the brain and kidney, likely because of the pro-oxidant activity of catalytic doses of naringin in apolar environments. Naringin in combination with valproate did decrease damage to the liver and kidney, somewhat to the brain, and it did bring the levels of lipids and triglycerides, as well as the liver steatosis close to control levels. Naringin normalized the levels of PPARα and PGC-1α in the liver, and it brought the levels of acetyl CoA oxidase 1 (ACOX1) which valproate increases, close to control levels. A significantly higher oxidative stress was recorded in the male group, probably because of the antioxidant protection by estrogen afforded to females. The *in vitro* model could serve as a predictor of *in vivo* cellular responses, or as a replacement of *in vivo* models, although certain pretreatments with hormones and metabolites maybe necessary and should further be investigated.

This Ph.D. thesis contains: (176 pages, 108 figures, 5 tables, 272 references, original: in Croatian)

Keywords: oxidative stress, antiepileptic, polyphenols, lipid metabolism, transcription factors, steatosis

Supervisor: PhD. Domagoj Đikić, Full professor
Reviewers: PhD. Vesna Benković, Full professor
PhD. Irena Landeka Jurčević, Full professor
PhD. Dubravka Rašić, senior scientific associate
Substitute: PhD. An Galov, Part time professor

SADRŽAJ:

1 UVOD ... 1

2 LITERATURNI PREGLED ... 1

2.1 Valproična kiselina i valproat ... 1

2.1.1 Metabolizam valproične kiseline i valproata ... 3

2.1.3 Mehanizmi djelovanja valproata ... 5

2.1.4 Fiziološki učinci valproata u epilepsiji i psihijatrijskim bolestima ... 7

2.1.5 Fiziološki učinci valproata u drugim bolestima i patološkim stanjima ... 11

2.2 Štetni učinci valproata ... 12

2.2.1 Hepatotoksični učinci valproata ... 13

2.2.2 Štetni učinci valproata na metabolizam, dislipidemiju i pretilost ... 14

2.2.3 Nefrotoksičnost valproata ... 15

2.2.4 Sindrom policističnih jajnika i hormonalni poremećaji uzrokovani valproatom ... 16

2.3 Polifenolne i druge bioaktivne molekule prirodnog porijekla kojima se preveniraju štetni učinci valproata ... 17

2.3.1 Naringin i naringenin ... 18

3 CILJ ISTRAŽIVANJA ... 21

4 MATERIJALI I METODE ... 22

4.1 Eksperimentalne životinje ... 22

4.2 Plan pokusa i pokusne skupine ... 22

4.3 Priprema tkiva ... 23

4.4 Određivanje parametara oksidacijskog stresa u tkivima ... 24

4.4.1 Koncentracija proteina u tkivima ... 24

4.4.2 Koncentracija malondialdehida (MDA) u tkivima ... 25

4.4.3 Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u tkivima ... 26

4.4.4 Aktivnost katalaze (CAT) u tkivima ... 27

4.4.5 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u tkivima ... 28

4.4.6 Koncentracija karboniliranih proteina u jetri ... 28

4.5 Lipidni parametri u serumu ... 29

4.5.1 Ukupni trigliceridi u serumu ... 29

4.5.3 Ukupni kolesterol u serumu ... 30

4.5.4 HDL kolesterol u serumu ... 30

4.5.5 LDL kolesterol u serumu ... 30

4.6 Histologija lipidnih naslaga u tkivu jetre metodom Oil Red O ... 31

5 TRANSKRIPCIJSKI FAKTORI I ENZIMI LIPIDNE OKSIDACIJE U JETRI ... 31

5.1.1 Receptor aktivacije proliferacije peroksisoma-alfa (PPARα) ... 31
5.1.2 Koaktivator receptora aktivacije proliferacije peroksisoma gama 1-alfa (PPARG1α) ... 31
5.1.3 Acil-koenzim A oksidaza1 (ACOX1) ... 32
5.1.4 Nuklearni faktor NFE2R2 ... 32
5.1.5 Biokemijski parametri u serumu ... 32
5.3 In vitro učinci valproata i naringina u jetrenim Hep G2 stanicama i PK stanicama bubrega 33
5.4 Statistička obrada podataka ... 33
6 REZULTATI ... 35
6.1 Pokazatelji oksidacijskog stresa u mozgu ... 35
6.1.1 Koncentracija malondialdehida (MDA) u mozgu ... 35
6.1.2 Aktivnost superoksid disimutaze (SOD) u mozgu ... 41
6.1.3 Aktivnost katalaze (CAT) u mozgu ... 47
6.1.4 Reducirani glutation (GSH) u mozgu ... 53
6.2 Promjene u jetri pokusnih životinja ... 59
6.2.1 Nakupljanje lipida u hepatocitima ... 59
6.2.2 Transkripcijski faktor PPARGC1α u jetri ... 60
6.2.3 Transkripcijski faktor PPARα u jetri ... 62
6.2.4 Enzim ACOX1 u jetri ... 64
6.2.5 Transkripcijski faktor NFE2R u jetri ... 66
6.2.6 Lipidna peroksidacija (MDA) u jetri ... 68
6.2.7 Karbonilirani proteini u jetri ... 70
6.2.8 Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u jetri ... 72
6.2.9 Aktivnost katalaze (CAT) u jetri ... 74
6.2.10 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u jetri ... 76
6.3 Pokazatelji oksidacijskog stresa u bubregu pokusnih životinja ... 78
6.3.1 Koncentracija malondialdehida (MDA) u bubregu ... 78
6.3.2 Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u bubregu ... 80
6.3.3 Aktivnost katalaze (CAT) u bubregu ... 82
6.3.4 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u bubregu ... 84
6.4 Biokemijski pokazatelji u serumu ... 86
6.4.1 Biokemijski pokazatelji energetskog metabolizma, glukoza i lipidni parametri u serumu 86
6.4.2 Ukupni proteini, albumin i globulini u krvi pokusnih životinja ... 98
6.4.3 Enzimski biomarkeri u serumu laktat dehidrogenaza (LDH), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (AP) i amilaza (AMY) ... 100
6.4.4 Serumski kreatinin, bilirubin, urea (BUN), natrij, kalcij i kalij ... 103

6.5 Vijabilnost stanica i promjene pokazatelja oksidacijskog stresa u jetrenim HepG2 i PK stanicama bubrega in vitro 106
7 RASPRAVA 114
7.1 Oksidacijski stres i antioksidacijski enzimi u različitim regijama mozga 114
7.2 Oksidacijski stres i antioksidacijski enzimi u jetri 121
7.3 Oksidacijski stres i antioksidacijski enzimi u bubregu 126
7.5 Razlike među spolovima 134
8 ZAKLJUČAK 137
9 LITERATURA 138
10 ŽIVOTOPIS DOKTORANDA 172
11 POPIS RADOVA 172
12 PRILOZI 175

POPIS KRATICA:

- AB: Alzeimerova bolest
- ABAT: GABA transaminaza, 4-aminobutirat transaminaza
- ACOX1: Peroksisomalna acil-koenzim A oksidaza 1
- ALT: alanin aminotransferaza
- AML: akutna mielogena leukemija
- AMY- amilaza
- AP: alkalna fosfataza
- APP: prethodnik amiloidnog proteina (iz engl.: "amyloid precursor protein")
- ATRA: transretinoična kiselina (iz engl.: "all-trans-retnoic acid")
- Bcl-XL: B stanični limfom-ekstra veliki protein (iz engl.: "B cell lymphoma extra large protein")
- BDNF: derivat neurotropskog faktora u mozgu (iz engl.: brain derived neurotropic factor)
- BUN: Urea
- CAT: katalaza
- CD36: "cluster of differentiation 36"
- CoA: Koenzim A
- CREB: "cAMP response element binding protein"
- DNMT1: DNK metiltransferaza
- D2 receptor: dopaminski receptor 2
- ELISA (enzimski povezani imunosorbentni test
- Erα: estrogen receptor alpha
- ERK: kinaza regulirana vanstaničnim signalom (iz engl.: "extracellular signal regulated kinase")
- ERR α: receptor srodan estrogenu α (iz eng.: " estrogen related receptor α ")
- FABP1: protein koji veže masne kiseline 1
- GABA: gama-aminomaslačna kiselina, γ- aminomaslačna kiselina, 4-aminobutanska kiselina
- GCLDNF: derivat neurtropičnog faktora iz stanica glialne linije (iz engl.: "glial cell line-derived neurotropični faktor")
- GSH: reducirani glutation

- GSH-Px: glutation peroksidaza
- GSK-3β: glikogensinteza-kinaza 3β
- HAART: visoko aktivna antiretroviralna terapija
- HAT: histonska acil transferaza
- HD: Huntingtonova bolest (iz engl.: "Huntington's Disease")
- HDAC: histonska deacetilaza
- 4-HNE: 4-hidroksinonenal
- Hsp90: "heatshock protein 90"
- IGF-1: inzulinu sličan faktor rasta 1
- IL-6: interleukin 6
- IVP3: inzulin vežući protein 3
- JAK2: „janus kinaza 2“
- A-KGDH: α-Ketoglutaratdehid dehidrogenaza
- KBZ- kronično bubrežno zatajenje
- Mcl-1: protein iz obitelji Bcl-2
- MDA: malondialdehid
- MHP: mutirani huntington protein
- mRNA: glasnička RNA
- MS: mielodisplastični sindrom
- NEP: neprilisin
- NFE2R2: Faktor 2 povezan s nuklearnim faktorom eritroida 2 (iz engl. "Nuclear factor erythroid 2-related factor 2")
- NF- κB: faktor jezgre kappa beta (κB)
- NMDA: N-metil-D-aspartat
- NO: dušikov monoksid
- O^{2-}: superoksidni anion
- PI3K/Akt: fosfatidilinositol 3-kinaza
- PPARα: "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha"
- PPARGC1A- PPARGC1 antitijelo
- PPARGC1α (PGC-1α): gama koaktivator 1-alfa receptor aktiviranog proliferatorom peroksisoma
- PV: fosfovalproat

- SAH: subarahnoidalno krvarenje
- SOD: superoksid dismutaza
- Src: protoonkogena tirozin kinaza src
- SSADH: sukcinat semialdehid dehidrogenaza
- STAT3: "Signal Transducer and Activator of Transcription 3"
- SŽS: središnji živčani sustav
- TAFII: Čimbenik transkripcijske inicijacije II
- TNFα: "tumor necrosis factor α"
- VEGF: vaskularni endotelialani čimbenik
- VPA: valproična kiselina

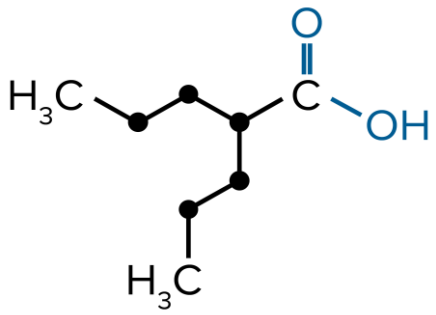
1 UVOD

Valproična kiselina i njezin derivat valproat, koriste se kao učinkoviti antiepileptički lijekovi. Danas su valproična kiselina i valproat najčešći propisani lijekovi za liječenje epilepsije, neuropsihijatrijskih i drugih bolesti. Međutim dugoročno, ili u visokim dozama, ovi spojevi mogu izazvati i određene neželjene zdravstvene pojave kod predoziranja ili produljenog unosa, koje uključuju različite promjene u mozgu, steatozu jetre i dislipidemiju a i bubregu i ovarijima mogu narušiti oksidacijsko redukcijsku biokemijsku ravnotežu u stanicama. Opsežno se proučava može li se ove nepovoljne učinke umanjiti sinergijskim uzimanjem prirodnih bioaktivnih molekula i antioksidansa. Naringin je flavonoid koji se u prirodi najčešće može naći u citrusima. Ova bioaktivna molekula prirodnog porijekla istražuje se zbog svojih navodnih antioksidacijskih, anti-adipoznih i anti-dijabetskih svojstava. Hipoteza ovog rada je da će naringin ublažiti sve nuspojave valproata. U ovom radu željeli smo utvrditi na koji način će se različiti odabrani fiziološki parametri u mozgu, jetri i bubregu promijeniti nakon unosa povećanih doza valproata i naringina i njihovih međusobnih kombinacija.

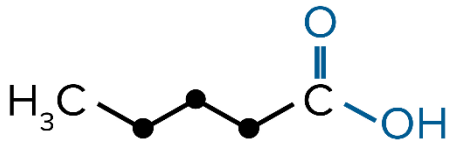
2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Valproična kiselina i valproat

Valproična kiselina (2-propil-pentanska kiselina) (slika 1) je kratkolančana, razgranata masna kiselina i analog valerične kiseline (slika 2). Valerična kiselina je porijeklom iz korijena biljke *Valeriana officinalis*. Valproičnu kiselinu je po prvi puta sintetizirao Burton 1882. godine (1, 2). Valproična kiselina ima bistru boju, a pri sobnoj temperaturi je u tekućem stanju.



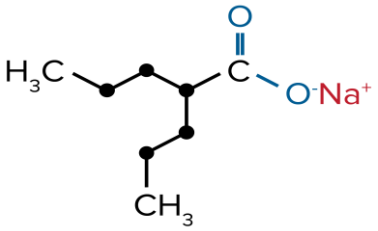
Slika 1. Strukturna formula valproične kiseline



Slika 2. Strukturna formula valerične kiseline

Valerična se kiselina, iz biljke Valerijane, koristi u tradicionalnoj medicini za: otklanjanje boli, liječenje nesanice, anksioznosti i spazma mišića (3). Biološki i farmaceutski učinci opisani su u biomedicini i farmakologiji jer povećava razine molekula γ-aminomaslačne kiseline (GABA) u središnjem živčanom sustavu (SŽS-u) te djeluje na razine serotonina i noradrenalina (4).

Valproična kiselina se koristila u pokusima kao lipofilno otapalo za molekule koje nisu topive u vodi gotovo 80 godina. Antikonvulzivna svojstva valproične kiseline prvi put je opisao Pierre Eymard 1962. godine, istražujući farmakološke učinke različitih lijekova za epilepsiju na modelima štakora, koristio je valproičnu kiselinu kao otapalo, te je uočio bolje učinke u skupinama životinja koje su primale samo otapalo, odnosno samo valproičnu kiselinu i na taj je način slučajno došao do rezultata da je valproična kiselina odlično antikonvulzivno sredstvo. Ovaj neočekivani rezultat prezentiran je Francuskom društvu za terapeutiku i farmakodinamiku 1962. godine, te je objavljen u francuskom časopisu *Therapie* 1963. godine. Laboratoriji Berthier patentirali su ga (CAM 244) 1969. godine (2). Valproična se kiselina kao lijek za epilepsiju, pod komercijalnim nazivom Depakine, koristi u obliku natrijeve soli, natrijevog valproata



Slika 3. Strukturna formula natrijevog valproata

koji se na tržištu u Francuskoj prvi puta pojavio 1967. godine, samo pet godina nakon otkrića njegovih antikonvulzivnih svojstava u pokusima (2).

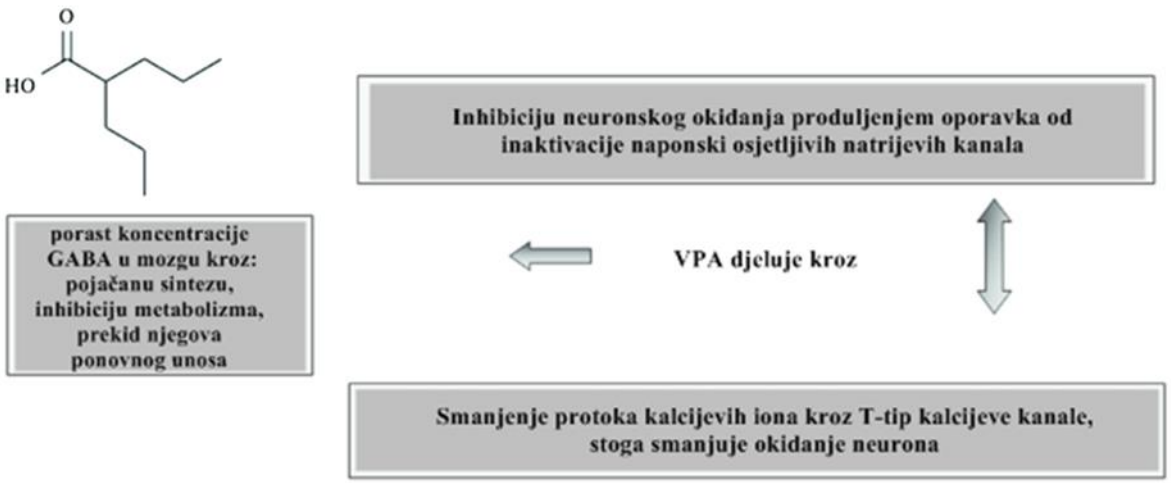
Tri su oblika Depakina danas najčešće primjenjivana: valproična kiselina, sol natrijev vaproat (slika 3) ili kombinacija ovih dvaju oblika nazvana diVPA (5). Brojni drugi lijekovi na bazi valproične kiseline i valproata pojavili su se nakon što se Depakin komercijalizirao u više od 100 drugih zemalja (u Sjedinjenim Američkim Državama 1978. godine). Tržišna imena kao što su Ergenyl, Depakane, Depakote, Depakon, Depakine, Convulex, Epilim, Labazene, Leptilan, Eurekene, Leptilan, Orfiril, postoje i danas (2, 7, 8).

Danas je valproična kiselina ili mješavina valproične kiseline i natrijevog valproata, najčešće propisani lijek za tretiranje epileptičkih napadaja u svijetu. Zbog širokog spektra djelovanja protiv generalnih ili žarišnih napadaja koristi se u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim lijekovima (6, 7). Valproičnu kiselinu odobrila je FDA (Food and drug administration USA) kao samostalnu ili pomoćnu terapiju pri liječenju epilepsije, bipolarnog poremećaja, i prevenciji napadaja migrene, dok ga Europi, Europska medicinska agencija (EMA) odobrava za iste poremećaje (6, 8).

2.1.1 Metabolizam valproične kiseline i valproata

Oralni put najuobičajeniji je način primjene valproične kiseline i natrijevog valproata. Oba se spoja u organizmu disociraju i stvaraju farmakološku aktivnu tvar valproat, stoga će se u daljnjem tekstu pri opisima farmakoloških, fizioloških, biokemijskih i toksikoloških mehanizama u organizmu ili stanicama koristiti generalni pojam valproat (9, 10), ukoliko literaturni izvor citiran u ovom radu specifično ne navodi pojam valproična kiselina ili natrijev valproat.

Terapijske koncentracije valproata osciliraju između 50 i 150 mg /L u serumu (5-11). Struktura valproata slična je ostalim kratkolančanim masnim kiselinama pa se u tijelu apsorbira, slično ostalim trigliceridima, uz apsorpciju od 100% (12). U serumu je nakon apsorpcije 90% valproata vezano za proteine, većinom albumin (7). Samo je slobodni valproat fiziološki aktivan i može se unijeti u stanice mozga i jetre pomoću transportera ili difuzijom.



Slika 4. Mehanizam djelovanja valproata (Preuzeto iz: reference br. 20)

Metabolizam valproata odvija se pomoću tri različita metabolička puta: glukuronidacijom, β-oksidacijom i citokromom P-450. Dob i genska struktura osobe utječu na aktivnost ovih metaboličkih puteva, a to objašnjava različito doziranje lijeka od pojedinca do pojedinca i djelomičnu osjetljivost na valproat kod male djece (13-15).

Glukuronidacija je glavni metabolički put zaslužan za metaboliziranje 50% valproata, zatim β-oksidacijom se metabolizira 40%, a CYP odnosno citokrom P-450 enzimima približno 10%. Glukuronidacija stvara valproat glukuronid koji se izlučuje mokraćom. Krajnji produkti CYP puta metaboliziranja valproata su 3-hidroksi valproat, 4-hidroksi valproat, 5-hidroksi valproat i 4-en-valproat. U mitohondrijima β-oksidacija valproata proizvodi 3-keto-valproat i 2-en-valproat, a u proces β-oksidacije može ući i 4-en-valproat. Kontinuiranom enzimskom oksidacijom 2-en i 4-en valproat može formirati 2,4-dien-valproat koji se konjugira s glutationom i može iscrpiti mitohondrijske zalihe glutationa, što je jedan od glavnih uzroka oksidacijskog oštećenja jetre valproatom (6, 14).

Konjugati 2,4-lipida valproata i koenzima A (CoA) mogu spojiti nekoliko enzima u kaskadi β-oksidacije (11, 13). Samo 5% ukupnog valproata izluči se nepromijenjen iz tijela preko bubrega. Ostatak se izlučuje kao konjugirana glukuronska kiselina ili kao neki proizvod beta oksidacije. Vrijeme polovične eliminacije iz tijela pacijenata je između 6-16 sati, no kod djece mlađe od 18 mjeseci je ono duže (12). Visoka vezanost valproata za proteine plazme uzrokuje sporo izlučivanje iz tijela (6-20 mL/h/kg).

2.1.3 Mehanizmi djelovanja valproata

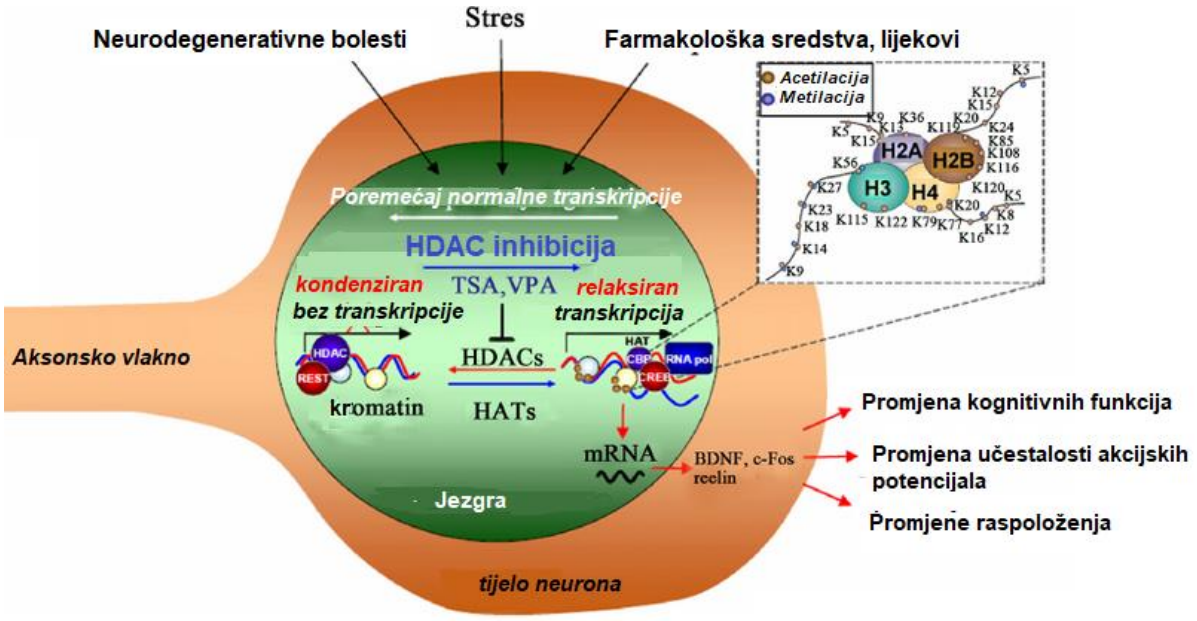
Valproat djeluje kao kompetitivni i alosterični inhibitor (slika 4) raznih enzima i receptora u središnjem živčanom sustavu (SŽS-u) (15-27). U ljudskom mozgu valproat poboljšava funkciju γ-aminomaslačne kiseline (GABA) te povećava njezinu proizvodnju i koncentraciju, a smanjuje njenu razgradnju u svim dijelovima mozga, posebno u strukturi bazalnih ganglija zvanom *supstancia nigra* (crna tvar) za koju se vjeruje da je centar koji generira i kontrolira epileptičke napadaje (15-22) (slika 4). GABA smanjuje podražljivost, a inhibira depolarizaciju i transmisiju električnih impulsa između neurona, što je čini glavnom molekulom za inhibiciju u SŽS-u (15-22). Valproat uzrokuje porast koncentracije GABA na način da alosterički inhibira enzim 4-aminobutirat aminotransferazu (GABA transaminaza, ABAT) i α-ketoglutaratdehidrogenazu (α-KGDH), dok kompetitivno inhibira sukcinat semialdehid dehidrogenazu (SSADH) (17, 21). Navedeni enzimi od izuzetne su važnosti u transmisiji električnih impulsa u SŽS-u (17).

Valproat smanjuje prolaz kalcijevih iona kroz ionske kanale i tako općenito smanjuje podražljivost neurona (20-28). Abnormalni dotok kalcijevih iona u neurone ima dominantnu ulogu u inicijaciji i propagaciji epileptičkog napadaja (28). Nadalje, valproat blokira i naponom regulirane natrijeve i kalijeve kanale i tako smanjuje učestale akcijske potencijale u neuronima (20, 25, 29) (slika 4), što omogućuje brzi prekid toničkog kloničkog epileptičkog napadaja (18). Farber i sur. (23) su pokazali da valproat djeluje slično tetrodotoksinu koji je poznati inhibitor natrijevih kanala (23).

Valproat inhibira N-metil-D-asparat receptor (NMDA receptor) koji također upravlja akcijskim potencijalom neurona (24, 25). Glutamat podražuje neurone putem NMDA receptora, a valproat smanjuje podražljivost blokiranjem NMDA receptora (22, 25). Inhibiranjem NMDA receptora, valproat smanjuje prolaz kalcija kroz taj kanal i tako zaustavlja depolarizaciju i ekscitotoksičnost neurona (20-22). Trajanje inhibicijskih postsinaptičkih potencijala tako se produžava, a dodatno se smanjuje repetitivno okidanje neurona (15,20, 21-25).

Phiel i sur. (26) su 2001. g. pretpostavili da su učinci valproične kiseline uzrokovani mehanizmom inhibicije histonskih deacetilaza (HDAC) (24). Histonske deacetilaze (HDAC) su enzimi koji odstranjuju acetil grupe s lizinskih rezidua na histonima i tako se histoni čvršće zategnu oko DNA molekule, odnosno histonske deacetilaze tako održavaju strukturu DNA kondenziranom (slika 5, 27, 28). One zajedno s histonskim acetiltransferazama reguliraju ekspresiju gena DNA molekule otklanjanjem i postavljanjem acetil grupa na lizinske rezidue

histona, odnosno održavanjem DNA molekule kondenziranom ili labavom (30, 31) (slika 5). Kada je DNA kondenzirana, razni transkripcijski faktori nemaju pristup za vezanje na DNA molekulu te se tako ne može vršiti transkripcija, a kasnije i translacije. Na taj je način ekspresija gena onemogućena. S druge strane, acetil grupe koje ostaju na lizinskim reziduama histona zbog inhibicije HDAC valproatom, svojom veličinom šire prostore između lanaca DNA molekule i tako ju čine razmotanom na mjestima genske ekspresije (slika 5) (30-32). Razmotana DNA molekula ima više prostora u koje transkripcijski čimbenici mogu ući. Tako započinje ekspresija gena. Valproat inhibiranjem histonskih deacetilaza održava DNA molekulu razmotanom na mjestima genske ekspresije (26-30). Pokazalo se da najučinkovitije inhibira klasu I i klasu IIa histonskih deacetilaza, što ga čini izvrsnim kandidatom za liječenje neuroloških, psihijatrijskih, onkoloških i infektivnih bolesti (26-34). Göttlicher i sur. su tu pretpostavku dokazali *in vivo* i *in vitro* te su implicirali da bi se valproat kao snažan inhibitor histonskih deacetilaza mogao koristiti za liječenje onkoloških bolesti (27).



Slika 5. Mehanizam djelovanja valproata u inhibiciji histonske deacetilaze (HDAC) (Preuzeto i prilagođeno iz: reference br. 30)

2.1.4 Fiziološki učinci valproata u epilepsiji i psihijatrijskim bolestima

Valproat u ljudskom mozgu inhibira razne ionske kanale i receptore te povisuje koncentraciju GABA-e te tako zaustavlja epileptičke napadaje. Epileptički napad je klinička manifestacija kaotične i abnormalne aktivnosti neurona u korteksu (15). Iako još nije razjašnjeno što točno uzrokuje inicijaciju epileptičkog napadaja, vjeruje se da je jedan od glavnih razloga disbalans između ekscitacijskih i inhibicijskih neurotransmitera. Ekscitacijski neurotransmiteri uključuju glutamat i acetilkolin koji djeluju ekscitatorno na kortikalne neurone, dok GABA djeluje inhibicijski (15). Napad započinje kao rezultat neravnoteže ovih neurotransmitera, a ona inducira abnormalno prolongiranu depolarizaciju aktiviranih neurona, nakon čega slijedi lokalna hiperpolarizacija zahvaćenih neurona. Njihov električni napon i otpuštanje akcijskih potencijala aktivira susjedne neurone sve do subkortikalne strukture i talamusa (15). Kada dosegne taj dio i obuhvati retikularni aktivirajući sustav, dolazi do poremećaja svijesti. Subkortikalni dijelovi mozga često su zahvaćeni prilikom epileptičnog napadaja, što rezultira i bilateralnim uključenjem cijelog tijela (15). Epileptički napad može uzrokovati naglu hipertenziju, tahikardiju, tahipneju, hiperglikemiju, laktatnu acidozu, rabdomiolizu (15). Uključenje autonomnog živčanog sustava rezultira inkontinencijom urina i fecesa, povraćanjem, ugrizom jezika te narušavanjem dišnog sustava (15).

Većina psihijatrijskih bolesti uzrokovana je disbalansom glavnih neurotransmitera kao što su serotinin, dopamin, noradrenalin, adrenalin i GABA. U depresiji koncentracije GABA-e su snižene u svim regijama mozga, najčešće u prefrontalnom korteksu (30, 35). Najčešći lijekovi u terapiji psihijatrijskih bolesti su inhibitori pohrane serotonina, noradrenalina i dopamina (30). I drugi molekularni faktori važni su za izlječenje, na primjer ekspresija gena za "brain derived neurotropic factor" (BDNF). Produkti gena za BDNF mijenjaju ponašanje i funkciju neurona i potiču neurogenezu, na primjer u hipokampusu (30, 36). Inhibitori histonskih deacetilaza, kao što je valproat, dovode do ekspresije tog gena (31). U depresiji, razne vrste stresa mogu uzrokovati hipoacetilaciju histona mnogih gena, ne samo BDNF faktora. Valproat aktivira i gene za transport serotonina i gene vaskularnog endotelialnog faktora (VEGF) i "cAMP response proteina (CREB)" (37-41). Ti faktori poboljšavaju ishode u depresiji (34, 42, 43). Dodatno, kao što je već objašnjeno, valproat snažno povisuje koncentracije GABA-e u svim dijelovima mozga (17-24).

Valproat također, može osloboditi triptofan vezan za proteine u serumu te na taj način povisiti njegove koncentracije za sintezu serotonina, što je jedan od glavnih ciljeva u liječenju depresije (40, 41). Valproat smanjuje sintezu dopamina u bolesnika s akutnom manijom bez

kompenzatornog povećanja u koncentraciji receptora dopamina (40-42). U maniji je pojačana dopaminergična transmisija implicirana kao glavni patofiziološki uzročnik (40-42). Antagonisti NMDA, kao što je ketamin, imaju snažna antidepresivna djelovanja (35). Valproat također inhibira NMDA receptor (23-25). Na taj način štiti i od atrofije neurona jer ekscitotoksični učinci vezanja glutamata za NMDA receptor uzrokuju atrofiju neurona (35). Valproat blokira i otpuštanje glutamata u sinapse neurona.

Svi ti navedeni mehanizmi sugeriraju da je valproat izvrstan kandidat za liječenje depresije i bipolarnog poremećaja. McElroy i sur. (43) su pokazali da ublažava manične faze bipolarnog poremećaja čak i kod onih pacijenata koji su bili otporni na druge lijekove (43). 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 (42-44). To podupire prijašnju tezu da inhibiranjem HDAC izravno djeluje na DNA molekulu i tako daleko ranije uklanja simptome depresije i bipolarnog poremećaja od klasičnih inhibitora pohrane neurotransmitera (30, 33-37, 42-46). Davis i sur. (46) su također dokazali da značajno smanjuje simptome depresije i kod bolesnika bez bipolarnog poremećaja (46). Anksiozni su poremećaji uzrokovani smanjenim koncentracijama serotonina, i povišenim koncentracijama noradrenalina (40, 41, 47). NMDA sustav sve se više pokazuje kao finalni zajednički put anksiolitičnih poremećaja (40). Zbog toga se valproat može koristiti kao moćan anksiolitik. (40, 21-25). Whittle i Singewald (48) kažu da ciljano povećavanje acetilacije histona doprinosi eliminaciji straha i anksiosnosti, vjerojatno putem moduliranja signalizacije u putevima BDNF i NMDA (48). Keck i sur. (49) navode da postoje dokazi o efikasnosti valproata u liječenju paničnih napadaja (49).

Kronično tretiranje valproatom u štakora pokazalo je da blokira signaliziranje kroz dopaminski receptor 2 (D2 receptor) putem arahidonske kiseline (50). D2 receptori igraju važnu ulogu u šizofreniji, a arahindonska kiselina im je važan sekundarni glasnik (50-53). Prekomjerna stimulacija tih receptora uzrokuje psihotičke simptome, a implicirani su u pogoršanju psihoze kada šizofreničari konzumiraju droge koje povećavaju koncentracije dopamina u sinapsama neurona, poput amfetamina ili metilfenidata (52). D2 receptor glavna je meta svih antipsihotika (53). Oni u terapeutskim dozama zauzimaju 60%-80% svih D2 receptora, a aripiprazol čak 90% (53). Međutim, iako oni blokiraju te receptore i smanjuju koncentracije D2 receptora, dugotrajni tretmani povećavaju senzitivnost na dopamin pa receptori postaju supersenzitivni (53). S druge strane, valproat smanjuje količinu arahidonske kiseline u fosfolipidima mozga i smanjuje aktivnost i koncentraciju ciklooksigenaze (COX) i

njenih metabolita (50). Na taj način smanjuje signaliziranje kroz D2 receptor. Dodatno, smanjuje i sintezu D2 receptora (50). Osim D2 receptora u šizofreniji su implicirani i glutaminski, serotoninski i kolinergički sustavi (51, 54, 55), a valproat djeluje na gotovo sve njihove patofiziološke mehanizme. Kada se valproat kombinirao s antipsihotičnom terapijom u bolesnika s šizofrenijom, došlo je do smanjenja nuspojava antipsihotika, kao što je tardivna diskinezija (54-55), pridonio je boljoj sedaciji bolesnika, smanjio agresiju i ranije smanjio pozitivne simptome šizofrenije (54-56). Uspješno je korišten u liječenju post traumatskog stresnog poremećaja i sindroma ustezanja (57- 59).

Dokazano je da valproična kiselina umanjuje miokloničnu hiperkineziju u Huntingtonovoj bolesti (HD), najvjerojatnije putem hiperacetilacije histona što inducira povećanu produkciju GABA i drugih molekula, proteina i enzima važnih za fiziološki normalno funkcioniranje i/ili za smanjenu sintezu dopamina (59-61). Huntingtonova bolest (HD) progresivna je smrt neurona, naročito u dijelu mozga zvanim *Corpus striatum* (59). *Corpus striatum* je regija mozga u bazalnim ganglijama prednjeg mozga koja je odgovorna za koordinaciju pokreta, kogniciju, motivaciju, sustav nagrade, planiranje i donošenje odluka. HD karakteriziraju agresivnost i drugi neuropsihijatrijski poremećaji, korea i mioklonska hiperkinezija i veliki kognitivni deficiti (59-61). Mutirani Huntington protein (MHP) izravno dovodi do hipoacetilacije histona na genima koje kodiraju za proteine važne u funkciji transkripcije, kao što su na primjer Sp1, čimbenik transkripcijske aktivacije (TAFII), i histonske aciltransferaze (HAT). Na taj su način ugašeni mnogi geni koji doprinose normalnoj funkciji zdravih ljudi (59). Inhibitori su HDAC-a (slika 5) izvrsni lijekovi za modifikaciju kromatina i za poboljšanje transkripcije mnogih važnih gena za zdravlje (59). Njihovom primjenom smanjuje se agresija i psihoza, te se općenito stabilizira zdravstveno stanje bolesnika s HD (59-61).

Pri lječenju migrene, intravenski valproat umanjuje migrenske glavobolje u dozama od 900-1200 mg (62).

U Alzheimerovoj bolesti (AB) glavni je patofiziološki poremećaj nakupljanje izvanstaničnih nakupina amiloidnih beta peptida i intraneuronskih neurofibrilarnih čvorova u mozgu za koje se vjeruje da su glavni uzrok kolinergičke hipofunkcije, neurotoksičnosti te smrti neurona, a oni dovode do gubitka memorije, problema s učenjem, razmišljanjem, planiranjem, organizacijom itd. (63). Jedan od glavnih medijatora koji vodi u AB je enzim glikogen-sintetza-kinaza-3β (GSK-3β). GSK-3β aktivira brojne patofiziološke mehanizme. Na primjer, fosfolira tau protein na serinu 396 i 262, a to dovodi do prekomjerne transkripcije i translacije

prethodnika amiloidnog proteina (APP) i njegove obrade putem gama sekretaze (39, 63). Obrada APP stvara amiloide β40 i β42, a oni stvaraju neurfibrilirane čvorove (38-39, 63, 65). Nadalje, GSK-3β fosfolira i piruvat dehidrogenazu, što dovodi do smanjenja sinteze acetilkolina te supresije kolinergičke funkcije u mozgu (39, 63). Acetilkolin je ekscitatorna molekula u mozgu, čije smanjenje doprinosi problemima u koncentraciji, poteškoćama u organiziranju misli, čitanju, pisanju, razgovoru itd. (35, 47). Isto tako, GSK-3β doprinosi smrti stanice jer inhibira više čimbenika koji promoviraju preživeljenje, a to su iz engl. "cAMP response element-binding protein (CREB)" i β-katenin (38-39, 63). Valproična kiselina inhibira GSK-3ß putem aktivacije staničnog signalnog puta kojim upravlja fosfatidilinositol 3-kinaza ((PI3K)/Akt) i tako dovodi do smanjenja proizvodnje beta amiloida i stvaranja senilnih pločastih neurfibrilarnih nakupina, poboljšane sinteze acetilkolina, CREB-a, BDNF-a i beta katenina (38-39, 63). Inhibicija HDAC-a dovodi i do ekspresije Bcl-2 i proteina-43 koji djeluju antiapoptotski. U jednom pokusu inducirao je apoptozu stanica mikroglije, a one u AB luče neurotoksine koji pogoršavaju bolest (64). Tako poboljšava rast neurona i stvaranje veza između njih. Valproična kiselina stimulira neurogenezu i na druge načine, na primjer aktivacijom ERK signalnog puta ili pojačanom ekspesijom gena za ciklin D2 te signalnim putem Ras-(ERK)-p21 (64). Nadalje, putem inhibicije HDAC-a dovodi do indukcije molekule α-sinukleina u korteksu štakora *in vitro* i *in vivo*, koji štiti od podražljive toksičnosti glutamata (63), i poboljšava funkcije sinapsi (65). Acetilacija histona putem inhibicije HDAC-a dovodi do klijanja dendrita, ponovnog i novog stvaranja neuronskih mreža te poboljšanja memorije i učenja (64). Valproična kiselina, kao inhibitor HDAC-a, povećava transkpriciju β-katenina te uz spajanje ovog proteina i kadherina promovira sinaptogenezu i plasticitet neurona u SŽS-u, a time smanjuje progresiju patoloških lezija i kognitivne disfunkcije u AB-u (64). Štoviše, HDAC inhibicija inducirana putem natrijevog valproata, dovodi do ekspresije neprilizina (NEP) u staničnim linijama ljudskih neuroblastoma (SH-SY5Y), a to je enzim koji degradira amiloid te u zdravom mozgu održava fiziološki niske razine amiloida (66). Ekspresija NEP-a je inducirana u hipokampusu štakora natrijevim valproatom (66). Aktivnost ovog enzima smanjuje se s godinama te uz druge patološke kondicije dovodi do kasnog oblika AB (66).

Na sve ove načine valproat štiti neurone, stvara nove neurite, poboljšava njihov rast, potiče njihovo preživljenje i modificira sinaptičke strukture neurona (39, 40, 65, 66). U nekim pokusima simptomi su se poboljšali više u muških nego u ženskih miševa, a razlog tomu su fiziološke, genetske, metaboličke i hormonalne razlike između spolova, koje utječu na funkciju valproične kiseline (40, 63, 65).

2.1.5 Fiziološki učinci valproata u drugim bolestima i patološkim stanjima

U onkologiji, fosfovalproat (PV) inhibira rast transplantiranih ljudskih stanica raka gušterače kod miševa za 60 do 97%, odnosno 100% kada se kombinirala s cimetidinom (67). Ciljni protein PV-a je STAT-3 koji je ključni u patogenezi raka gušterače (67). Protein STAT-3 ima ulogu u inicijaciji, transformaciji i progresiji tumorskih stanica (67). U mitohondrijima podržava zloćudnu transformaciju ovisnu o signalnom proteinu Ras, te održava uredno funkcioniranje elektronskog transportnog lanca tumorskih stanica, a u jezgri ima važnu transkripcijsku ulogu (67). PV djeluje tako da inhibira fosforilaciju proteina STAT 3. Zbog toga se STAT-3 ne može uspješno translocirati iz citosola u mitohondrije. Bez STAT-3 se niti transportni lanac elektrona, niti Ras ovisna zloćudna transformacija gušterače ne mogu održati. Koncentracije kisikovih radikala tada rastu, te se inducira apoptoza zloćudnih stanica (67, 68). U metastatičnim neuroendokrinim tumorima, valproat povisuje razinu ekspresije NOTCH-1, gena za supresiju tumora (69). *In vitro*, u modelu akutne mielogene leukemije (AML) i mielodisplastičnog sindroma inducira apoptozu i diferencijaciju atipičnih blasta te je uključena u istraživanja kao moguća monoterapija ili u kombinaciji s all-trans-retinoičnom kiselinom (ATRA) (69). U kombinaciji s azacitidinom, inhibitorom DNA metiltransferaze (DNMT1), valproat je dramatično povisio preživljene bolesnika u slabo rizičnoj mielodisplaziji (69). Terapija epigenetskim agensima kao što je valproat, pokazala je da obnavlja osjetljivost na kemoterapeutike koji su ranije korišteni (69). Značajan pad rizika oboljenja od karcinoma glave i vrata uočen je u korisnika valproata koji su valproat koristili najmanje tri godine u terapijskim dozama za epileptičke napadaje u usporedbi s bolesnicima koji nisu koristili valproat (69).

Valproat je djelotvoran i u bolestima izazvanim virusima. Može inhibirati ulazak Herpes virusa u diferencirane oligodendritične stanice, i zaustaviti transkpriciju i ekspresiju viralnih gena, naročito transkripciju viralnih alfa gena (70). Osim toga, drastično je smanjio replikaciju omotanih virusa, kao na primjer virusa zapadnog nila ili limfocitičnog koriomeningitis virusa, tako što je zaustavio sintezu RNA lanca te translaciju virusnih proteina (71). Mehanizam djelovanja valproične kiseline protiv omotanih virusa je taj da valproična kiselina mijenja kompoziciju lipidnih staničnih membrana domaćina, koje virus koristi za ulazak u stanicu te za stvaranje virusne omotnice (71). Promjena u kompoziciji domaćinovih lipidnih membrana zaustavlja virusnu RNA translaciju i transkripciju ili stvara nestabilne nove dijelove viriona koji se ne mogu sastaviti (71). Doze valproične kiseline koje se inače koriste za suzbijanje epilepsije dovoljne su za suzbijanje replikacije omotanih virusa (71). Drugi mehanizam

djelovanja protiv virusa je putem histonske deacetilaze 1 (HDAC 1). Kondenzirani kromatin DNA lanca omogućuje latenciju integriranog HIV virusa jer dopušta mirovanje genoma bez transkripcije i translacije (72). Valproična kiselina, koja je inhibitor histonske deacetilaze 1 (HDAC 1), ostavlja hiperacetilaciju histona te tako poboljšava transkripciju i translaciju integriranog HIV genoma. Hiperacetilacija histona poboljšava ekspresiju beta galaktosidaze u ponavljajućim regijama (iz engl. "longterminal repeat") (LTR), a to dovodi do transkripcije i translacije HIV genoma (72). To je dovelo do ubrzanja raščišćavanja latentnog HIV rezervoara u mirujućim CD4+ stanicama (72). Kombinacija valproične kiseline sa antiretroviralnom terapijom visoke aktivnosti (iz engl. "highly active antiretroviral therapy", HAART) istražuje se kao mogućnost za potpunu eradikaciju HIV-a u organizmu (72). Ove spoznaje mogla bi biti korisna u borbi protiv SARS COVID-19 virusa jer pripada obitelji omotanih virusa s jednim lancem pozitivne RNA molekule (73, 74).

U oživljavanju hemoragičnog ili kardiogenog šoka te u traumi glave valproična kiselina je pokazala izvrsne učinke, jer je produljila vrijeme preživljenja, umanjila upalne procese i smanjila veličinu hipoksične ozljede u SŽS-u (11, 75-77). Istraživanja u svinja pokazala su da smanjuje upale povezane sa sekundarnom ozljedom mozga nakon traume glave, te a promovira diferencijaciju i rast neurita (11, 75-76). Valproična kiselina je smanjila regiju cerebralnog infarkta u modelu glodavaca s hipoksičnom, ishemičnom ozljedom cerebruma (76). Nakon tretmana istim je dozama produljila preživljenje hipotenzivnih štakora pet puta, u modelu hemoragijskog šoka (77). Najvjerojatniji mehanizam je inhibicija histonske deacetilaze proteina histona u miokardu štakora (77).

2.2 Štetni učinci valproata

S obzirom na veliku uporabu valproične kiseline, prijavljene su određene nuspojave. U najtežem akutnom otrovanju, u kojem je koncentracija valproične kiseline bila iznad 200 mg/L krvi, prijavljeni štetni učinci su bili: hiper ili hipotermija, tahikardija, hipotenzija, kod još većih koncentracija koma, respiracijski zastoj, asistolija, te pri teškom predoziranju smrt. U SŽS-u predoziranje može uzrokovati komu, zbunjenost, pospanost, pogoršanu kontrolu epileptičkih napadaja, vrtoglavicu, halucinacije, razdražljivost, glavobolju, ataksiju, poremećenu koordinaciju i oštećenje respiracijskog centra u dijelovima mozga zvanim medula i pons, te cerebralni edem (5, 7).

2.2.1 Hepatotoksični učinci valproata

U manjim, terapeutskim dozama i čestoj farmakološkoj uporabi ili u kroničnoj svakodnevnoj izloženosti, u nekih pacijenata uočeni su toksični učinci na jetru i metabolizam.

U jetri valproat dovodi do oksidacijskog stresa koji bi mogao biti glavni uzročnik oštećenja jetre. Metaboliti 4-en-valproat i 2,4-dien-valproat povezani su s neželjenim učincima u jetri kao što je pojačana lipidna peroksidacija s posljedičnim oštećenjem raznih dijelova stanca, naročito mitohondrija (5, 7, 11, 14). Prekursori ovih metabolita su nestablini slobodni radikali valproične kiseline koji također značajno oštećuju mitohondrije (11). U pokusima na HepG2 staničnim linijama tretman valproatom smanjio je i ekspresiju gena za superoksid dismutazu (SOD). Tako su se smanjile i razine mitohondrijskog SOD-a, a to je dovelo do porasta mitohondrijskih kisikovih slobodnih radikala, što je rezultiralo smanjenim razinama ATP-a te povećane smrti stanica (5, 7, 78). Valproat je uzrokovao propuštanje AST-a, ALT-a, LDH-a iz HepG2 stanica ovisno o dozi valproata (5, 7, 78). Drugi radovi također su potvrdili povećano stvaranje slobodnih kisikovih radikala uz bubrenje mitohondrija, kolaps mitohondrijske omotnice, te otpuštanja citokroma C, što je izravno aktiviralo apoptozu (79). Od ranije je poznato da valproat može stvoriti tiolne konjugate, posebno s glutationom (14, 78). Ovakav mehanizam koji uzrokuje smanjene razine glutationa doprinosi jačem oksidacijskom stresu u stanicama i tkivima (5, 7, 14, 78, 80).

Štetni učinci valproata na jetri izraženiji su kod ljudi s bolestima mitohondrija (7, 81). Mutacija POLG gena koja kodira za mitohondrijsku DNA polimerazu gama, može dovesti do ozbiljnog neurometaboličkog poremećaja zvanog Alpers-Huttenlocher sindrom (7, 81, 82). U eksperimentu na ljudskim staničnim linijama s mutacijom POLG gena (p.Q1236H) visoke koncentracije valproata uzrokuju staničnu smrt jer se zaustavlja regeneracija oštećenih stanica jetre (5, 7, 81, 82).

Od svih CYP enzima u jetri, samo je polimorfizam CYP2A6 u jetri povezan s povišenim razinama 4-en-valproata i 2,4-dien-valproata (7, 80-83). Rizični čimbenici za oštećenje jetre mutacije su CYP2A6 i CYP2C9 enzima i visoke koncentracije valproata (5, 7, 84).

Valproat inducira i razvoj hepatične steatoze i nealkoholne masne jetre (NAFLD, od engl. "non alcoholic fatty liver disease") (5,7). Ovakav učinak najvjerojatnije je rezultat valproičnog ometanja transporta lipida (5,7).

2.2.2 Štetni učinci valproata na metabolizam, dislipidemiju i pretilost

Kronično uzimanje valproata povezano je s nastankom pretilosti u nekih pacijenata. Terapija valproatom pozitivno je korelirana s povišenim krvnim tlakom, centralnom masnoćom, rezistencijom na inzulin, hiperleptinemijom, hiperinzulinemijom i rezistencijom na leptin (5, 7).

U pacijenata koji su kronično uzimali valproat postojala je veća vjerojatnost da će razviti metabolički sindrom, dislipidemiju te dugoročne komplikacije tih stanja kao što su ateroskleroza i hipertenzija (7). Kombinacija oksidacijskog stresa s akumuliranjem mokraćne kiseline i homocisteina također povećava mogućnost razvoja ateroskleroze (5, 7). Valproat inducira i razvoj hepatične steatoze i nealkoholne masne jetre (NAFLD, od engl. "Non alcoholic fatty liver disease") (5,7). Takav učinak najvjerojatnije je rezultat ometanja transporta lipida valproatom (5,7). Jedno istraživanje dokazalo je da je sekrecija triacilglicerola i drugih masnih kiselina smanjena na sinusoidalnoj polutki hepatocita, što bi moglo uzrokovati hepatičnu steatozu (5, 7, 85).

Od velike je važnosti spoznaja da valproat umanjuje i povećava ekspresiju 1156 gena u hepatocitima, od kojih je 60 gena za metabolizam lipida, a povezani su s biološkim putevima za sintezu triglicerida i kolesterola, katabolizam masnih kiselina i transport lipida (5, 7, 86). Naprimjer, povećava ekspresiju proteina *Pltp*, koji unosi fosfolipide i estere kolesterola u hepatocite, i gene koje služe za sintezu triglicerida i kolesterola. Dakle, pojačana sinteza i unos lipida u hepatocite su jedan od načina kako valproična kiselina dovodi do hepatične steatoze, povećane centralne masnoće i pretilosti. Ova stanja sama po sebi dovode do rezistencije tkiva na inzulin i hiperinzulinemije, ali se vjeruje i da valproična kiselina zaustavlja ekspresiju proteina GLUT-1, i tako ometa signaliziranje inzulina (87). Vjeruje se i da valproatom uzrokovan oksidacijski stres dovodi do disfunkcije β stanica gušterače (5, 7, 86, 87).

Razine grelina znatno su se povisile kod pacijenata predpubertetske dobi koji su koristili valproat, dok su se razine inzulinu sličnog faktora rasta (IGF-1) i inzulin vezujućeg proteina 3 snizile (IVP3) (7, 88). To znači da bi inicijalni porast tjelesne mase mogao biti povezan s povišenim razinama grelina (7, 88). Grelin također regulira lučenje inzulina, pa se misli da povišene razine dovode do hiperinzulinemije i rezistencije tkiva na inzulin (87). Druge studije pokazale su da bolesnici liječeni valproatom imaju više razine visfatina, apelina i triglicerida, a manje razine adiponektina i HDL kolesterola od kontrolnih skupina te je zaključeno da visfatin,

adiponektin i apelin imaju ulogu u regulaciji metabolizma glukoze i masnoća tijekom liječenja valproatom (7, 89).

2.2.3 Nefrotoksičnost valproata

Fankonijev sindrom poremećaj je nedovoljne reapsorpcije elektrolita, proteina i drugih molekula u proksimalnim kanalićima bubrega, a uključuje poremećaj reapsorpcije natrija, kalija, bikarbonata, fosfata glukoze, aminokiselina, mokraćne kiseline, proteina i peptida male molekulske mase, kao i drugih topljivih organskih metabolita. Glavni uzroci su nepravilnosti u korištenju energije putem natrijeve i kalijeve adenosine trifosfataze koja je locirana na bazolateralnoj membrani stanica proksimalnih tubula. Smanjene razine ATP-a javljaju se kod toksičnih učinaka lijekova ili otrova te tako dolazi do smanjene ili nepostojeće funkcije transportera gore navedenih tvari (90, 91). Takva patofiziologija rezultira kliničkom slikom poliurije, polidipsije, dehidracijom, hipofosfatemičnom riketsijom ili osteomalacijom u odraslih ljudi, neuspjehom rasta, renalno-tubularnim acidozama, hipokalemijom, hiperkloremijom, glukosurijom, hiperfosfaturijom, hipofosfatemijom, proteinurijom, aminoacidurijom i hiperurikosurijom.

Uzroci Fanconijevog sindroma mogu biti razne bolesti poput cistinoze, galaktosemije, nasljedne intolerancije fruktoze, tirosinemije, glikogenoze, Wilsonove bolesti, i druge (90). Oštećenje može nastati uslijed upotrebe lijekova kao što su antiviralni lijekovi (inhibitori reverzne transkriptaze), kemoterapeutici (cisplatina), imunosupresivi (azatioprin), antibiotici (gentamicin) i drugi lijekovi, a može biti uzrokovano i nenasljednim bolestima poput monoklonalne gamopatije, trovanjem olovom te renalnom transplantacijom, nefrotičkim sindromom, akutnom tubularnom nekrozom te infekcijom bakterijom *Legionela* (90-93).

U literaturi postoje podaci da je valproična kiselina jedan od lijekova koji može izazvati Fankonijev sindrom. Valproična kiselina je u stanicama proksimalnih kanalića izazvala povećanu lipidnu peroksidaciju, te povećanje koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta i depleciju bubrežnog glutationa, te je znatno narušila mitohondrijsku funkciju (92). Valproična kiselina u bubregu izaziva smanjenu aktivnost sukcinat dehidrogenaze (kompleksa II u respiracijskom lancu), čime se smanjuje koncentracija ATP-a, što dovodi do disfunkcije transportnih proteina u proksimalnim bubrežnim kanalićima (90, 92). Uz povišene razine reaktivnih kiskovih vrsta, nakon izrazite lipidne peroksidacije dolazi do deplecije glutationa (92). Sve to zajedno može izazvati bubrenje mitohondrija te apoptozu stanica. Najviše slučajeva Fankonijevog sindroma zabilježeno je u djece s epilepsijom koja se liječe valproičnom

kiselinom, a najčešće u subpopulaciji s mentalnom i motornom retardacijom (93). Valproična kiselina može inducirati Fankonijev sindrom i u odrasloj populaciji (91, 94). Jedan od najčešćih markera Fankonijevog sindroma je N-acetil-β-D-glukozaminidaza (NAG) (90, 95). NAG se nalazi u velikim količinama u stanicama proksimalnih kanalića, a po funkciji je lizosomska hidrolaza. Metabolizira glikoproteine, glikozaminoglikane te glikozide (95). NAG je indikator oštećenja stanica proksimalnih kanalića (95). Kod djece s epilepsijom koja se liječe natrijevim valproatom primjećuje se drastično povećanje koncentracije NAG-a u urinu kada dođe do indukcije Fankonijevog sindroma (95). Osim NAG-a, u dijagnostici Fankonijevog sindroma koriste se i sljedeći markeri: urinarni beta 2 mikroglobulin te povišene razine aminokiselina, bikarbonata, fosfata i glukoze u urinu tijekom 24h (90). U krvi se istodobno prati hipofosfatemija, hipokalemija i hiperkloremična (non-anion-gap) metabolička acidoza (90). Neki rezultati pokazali su značajno povišene serumske koncentracije alkalne fosfataze, kreatinina, γ-glutamin transferaze te dušika iz ureje u krvi zajedno s hipokalemijom, hipofosfatemijom te smanjenom koncentracijom mokraćne kiseline u serumu u štakora koji su tretirani valproatom (91, 92).

2.2.4 Sindrom policističnih jajnika i hormonalni poremećaji uzrokovani valproatom

Iako u ovom radu eksperimentalno nisu analizirani spolni sustavi ili hormoni, poremećaji vezani uz nepravilnu funkciju jajnika i ženskih spolnih hormona su jedni od glavnih nepovoljnih učinaka koji se mogu razviti u određenih pacijenata nakon dugotrajne uporabe valproata ili valproične kiseline, stoga ih treba ukratko spomenuti u pregledu literature.

Uočeno je de žene češće obolijevaju od sindroma policističnih jajnika kada uzimaju valproat (7, 96). Valproat je povezan s hiperandrogenemijom, hiperandrogenizmom, oligoovulacijom, pojavom policističnih jajnika na ultra-sonogramu, povećanim razinama testosterona te nepravilnim mensturalnim ciklusima (7, 96). Incidencija je 1,95 puta veća u žena koje su tretirane valproatom u odnosu na druge antiepileptike (7, 96). Značajan rizik pojave teratogenih učinaka u trudnoći od 6,6 % pokazao se u žena koje koriste valproat (7, 97). Druge studije pokazale su slične rezultate, primjerice da je rizik malformacija najveći tijekom prvog tromjesečja kada valproat kao inhibitor HDAC-a igra važnu ulogu u ometanju normalne DNA transkripcije i translacije tijekom organogeneze fetusa (98, 99). Oksidacijski stres uzrokovan valproatom također inducira teratogenezu fetusa (98).

Vjeruje se da su amenoreja te policistične promjene u ovarijima inducirane povišenim razinama testosterona i sniženim razinama estradiola i progesterona. Takve promjene kasnije

vode ka sindromu policističnih jajnika (100). Neki autori smatraju da valproat uzrokuje abnormalne ekspresije CYP enzima koji pospješuju sintezu hormona te tako dovodi do abnormalnih razina hormona, što izravno može oštetiti jajnike te inducirati razvoj sindroma policističnih jajnika (7, 101). Drugi autori pokazali su da valproat široko inhibira glukuronidaciju i citokrome te tako uzrokuje visoke koncentracije testosterona, androstenediona i dehidroepiandrosteron sulfata u žena s bipolarnom depresijom koje se liječe valproatom (7). Što tretman valproatom dulje traje, to su razine testosterona veće (7). One također razvijaju abnormalne mensturacije, te dolazi do smanjenja razina mRNA lanaca koji kodiraju za receptor alfa (ERα) estrogena. To uzrokuje manjak ERα u stanicama ovarija i dojci (7). Nedostatak signaliziranja estrogena osim što dovodi do reproduktivnih abnormalnosti, uzrokuje i osteoporozu te povećanje tjelesne mase (7). Nadalje, valproat smanjuje lučenje LH-a (luteinizacijskog hormona), FSH-a (folikostimulirajućih hormona) i prolaktina. Disbalans steroidnih spolnih hormona, adipozitet i hiperinzulinemija zbog tretmana valproatom dovode do spolne disfunkcije (7, 101). Brion i sur. misle da valproat povisuje kolesterol u mitohondrijima na način koji nije vezan uz steroidni regulatorni protein (7, 102). Inducirana je i supresija aromataze u granuloza stanicama kao odgovor na tretmane valproatom, a zaustavljena je rana ekspresija gena koje kodiraju za enzime u sintezi steroida (103, 104). Korištenjem drugih antiepileptika takve promjene nisu se dogodile (7, 104-105). Postoje pretpostavke da valproična kiselina ima izravne učinke na proizvodnju androgena u teka stanicama putem HDAC inhibicije (7, 106).

2.3 Polifenolne i druge bioaktivne molekule prirodnog porijekla kojima se preveniraju štetni učinci valproata

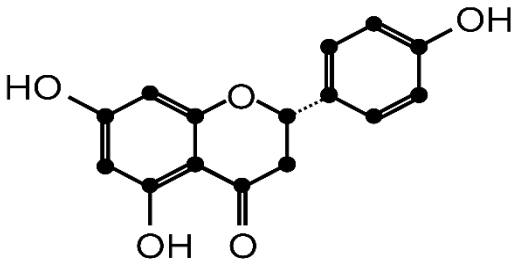
Zbog brojnih zabilježenih fizioloških nuspojava koje su povezane s uporabom valproata, postoje istraživanja kojima se želi utvrditi postoji li mogućnost paralelne terapije nekim spojevima koji bi ublažili negativne učinke uzimanja valproata. U istraživanjima suzbijanja valproatnog oksidacijskog stresa koristile su se različite prirodne bioaktivne molekule, primjerice S-metilmetionin, L-cistein i prirodni polifenol flavonoid kvercetin kao protektivne molekule (107-112). Glavni cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji bio je istražiti može li uporaba prirodnog polifenola naringina ublažiti negativne učinke valproata.

2.3.1 Naringin i naringenin

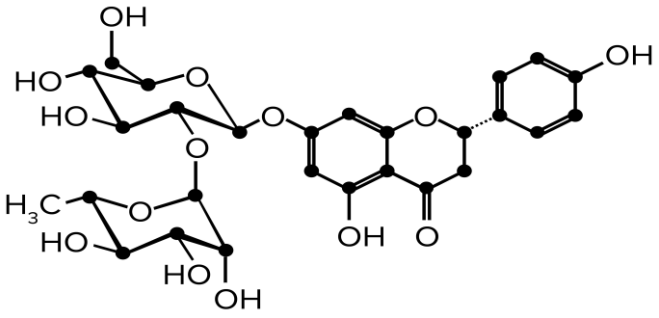
Naringin (slika 6) je flavonoid koji se u prirodi najčešće može naći u citrusima, najviše u grejpu i narančama, ali i u nekim drugim biljkama (113, 114). U prirodi najčešće postoji kao naringin u glikoliziranoj formi (slika 7) (113). De Vry je prvi znanstvenik koji je otkrio naringin (113). Otkriven je u stablima grejpa na Javi 1857. godine. Pripada podskupini flavanona. U soku od grejpa može se naći u koncentracijama do 800 mg/L (113). Nakon oralnog unosa u organizam, enzimi u ljudskom crijevu djelomično pretvaraju naringin u naringenin odcjepljivanjem glikokonjugata s glavnog djela molekule. Većina se naringina metabolizira u jetri (113, 114). Enzim CYP2C9 u jetri se pokazao kao glavni u metabolizmu naringina, koji zajedno s CYP2C19 i CYP2D6 hidrolizira naringin i stvara naringenin (114). Uz pomoć drugih jetrenih enzima, kao što su CYP3A4/5 i CYP1A2, stvaraju se i drugi metaboliti naringina i naringenina (114).

U ljudi se manje od 20% naringina eliminira u nepromijenjenom obliku ili u obliku naringenina putem urina ili fecesa (114, 115). U pasa je više od 60% aplicirane doze nađeno u obliku metabolita u urinu i fekalijama (114). Najčešće se eliminacija vrši putem bubrega u urin i putem jetre te se onda luči u žuč. U probavilu uobičajeno dolazi do parcijalnog bakterijskog cijepanja C-prstena (114).

Naringin se najviše akumulira u plućima i jetri, a naringenin u jetri i bubregu (115). Zeng i sur. (115) zabilježili su da se i naringin i naringenin najmanje akumuliraju u mozgu. Zbog toga bi se moglo pomisliti da naringin i naringenin teško prolaze kroz moždano-krvnu barijeru, ali Youdim i sur. (116) su zabilježeli značajnu akumulaciju naringenina u mozgu čak i kada su se aplicirali inhibitori Pgp pumpe (116). Prema tome, naringenin je lipofilična polifenolna molekula koja uredno prolazi kroz moždano-krvnu barijeru (116).



Slika 6. Strukturna formula naringenina



Slika 7. Strukturna formula naringina

Eksperimentalno se na *in vivo* i *in vitro* modelima istražuju djelovanja naringina i njegovog deglikoziliranog metabolita naringenina uključujući antivirusna, antitumorska, protuupalna, antioksidacijska, antibakterijska, antiadipozna, anti-dijabetska, imunomodulatorna i kardioprotektivna djelovanja (111).

Naringin se istražuje kao mogući lijek za sprječavanje nastanka Alzheimerove bolesti te postoje indicije da bi mogao biti učinkovit u dozama od 4,5 mg/kg (111). Neka istraživanja pokazala su da naringin štiti neurone od oksidacijskog stresa i upale. Aplikacija naringina dovela je do značajne inhibicije oksidacijskog stresa i peroksidacije lipida, te do porasta aktivnosti glutationa i katalaze u mozgu štakora podvrgnutim ishemiji (117, 118). Doza od 100 mg/kg naringina dovela je do značajnog oporavaka redoks ravnoteže, povrata normalnih vrijednosti glutationa-S-transferaze, i poboljšanja funkcije citokrom C oksidaze i sukcinat dehidrogenaze u mitohondrijskom lancu respiracije (117). Obje doze djelovale su citoprotektivno na neurone (117). Chen i sur. (118) su pokazali da je aplikacija naringina očuvala krvno-moždanu barijeru, smanjila učinke infarkta mozga, i poboljšala ponašanje štakora nakon ishemijsko reperfuzijske ozljede velikog mozga (118). Naringin smanjuje stvaranje superoxida (O^{2-}), dušikovog monoksida (NO), i ekspresiju NADPH oksidaze, te sinteze NO (118, 117). Yang i sur. (119) pokazali su da naringin umanjuje ekspresiju proupalnih citokina IL-6, i TNF-alfa. Također inhibira ekspresiju proteina za apoptozu kao što je Bax, a povisuje ekspresiju antiapoptotskog Bcl-2 proteina koji smanjuje apoptozu (119). Nadalje, aktivirao je put P13/AKT u neuronima, važan za angiogenezu, metabolizam, rast i preživljenje neurona (120, 121). Naringin je smanjio cerebralni edem, volumen cerebralnog infarkta i neurološki deficit nakon ishemijsko reperfuzijske ozljede štakora (121). Han i sur. su pokazali u štakorskom modelu subarahnoidalnog krvarenja (SAH) da aplikacija naringina značajno

smanjuje oksidacijski stres neurona (121). Peroksidacija lipida bila je značajno povišena u SAH modelu u kojem štakori nisu bili tretirani naringinom, dok je u skupini tretiranoj naringinom doze 80 mg/kg došlo do značajnog oporavka funkcije SOD-a. (121). Nakon tretmana tom dozom povećala se aktivnost katalaze (CAT), te glutation peroksidaze (GSH-Px). Omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) također se značajno povećao ($p<0.01$). U ovoj je skupini, u odnosu na skupinu koja je tretirana s 40 mg/kg, omjer GSH/GSSG bio statistički značajno viši ($p<0.05$) (121). Omjer GSH/GSSG u skupini tretiranoj s 40 mg/kg naringina nije se značajno promijenio u odnosu na kontrolnu skupinu (121).

Naringin djeluje hepatoprotektivno, jer može smanjiti pro-upalne citokine uz svoja antioksidacijska svojstva, te modulira prijenos lipida i masnih kiselina iz seruma u hepatocite. Primjerice, Syed i sur. (122) pokazali su da je naringin doze 100 mg/kg značajno smanjio ekspresiju transkripcijskog faktora NF-κB u jetri štakora koji su hranjeni hranom s visokim udjelom masnoće. Također je smanjio ekspresiju drugih proupalnih citokina kao što su interleukini IL-6, IL-1β, te tumor nekrozis faktor alfa (TNF-α) (122). Značajno je smanjio razine malondialdehida, a povisio razine glutationa (122). Zhang i sur. (123) pokazali su, *in vitro,* da naringin smanjuje ekspresiju proteina CD36 i proteina koji vežu masne kiseline (FABP1), a to su ključne molekule za brz i učinkovit transport masnih kiselina u stanice jetre (123). Uz to, smanjio je i ekspresiju acetil CoA karboksilaze i sintetaze masnih kiselina. Na taj se način može smanjiti ponovna sinteza masnih kiselina i lipida, i tako se značajno smanjila akumulacija intracelularnih triglicerida (123). Shirani i sur. (124) navode brojne radove u kojima naringin djeluje hepatoprotektivno protiv raznih toksina kroz antioksidacijsko i protuupalno djelovanje (124).

Naringin djeluje i nefroprotektivno, u protuupalnim i antioksidacijskim procesima. Wang i sur. (125) su zabilježili smanjenje fibroze bubrega. Naringin je značajno smanjio ekspresiju aktina, kolagena, tumor nekrozis faktora alfa (TNF-α), interleukina 1β i IL-6 (125). Smanjena je i ekspresija NF- κB (125). Isto tako Elsawy i sur. (126) zabilježili su pad proupalnih citokina IL-6, TNF-α, malondialdehida, porast antioksidacijskih parametara GSH, te sniženje koncentracije ureje i kreatinina u serumu nakon primjene naringina protiv toksičnog učinka metotreksata (126). Utvrdili su protekciju glomerula i renalnih proksimalnih kanalića (126). Amini i sur. (127) su nakon aplikacije naringina u ishemijsko reperfuzijskoj ozljedi štakora zabilježili pad oksidacijske, te porast antioksidacijske aktivnosti, uz poboljšanje bubrežnih funkcija, i protoka krvi kroz bubrege (127). U štakorima je naringin odgodio visoki sistolički tlak povezan sa starenjem te inducirao proizvodnju dušikovog monooksida, što je

dovelo do poboljšane funkcije endotelnih stanica, jer su bolje mogle regulirati krvotok i krvni tlak (128). Park i sur. (129) su demonstrirali da povisuje antioksidacijsku obranu i poboljšava funkciju mitohondrija u miokardu te tako sprječava hipertrofiju miokarda (129). Kod štakora kojima je induciran infarkt miokarda izoprenalinom, naringin je spriječio pojavu oksidacijskog stresa (130). U pokusu u kojem su stanice tretirane naringinom tijekom 24h (do 80 mM/L), oštećenje DNA smanjeno je za 24% (130). Može utjecati na promet masti i ugljikohidrata. Većina studija o djelovanju naringina izvedena je *in vivo* ili *in vitro*, a većina kliničkih studija bavila se kardioprotektivnim učincima i bioraspoloživosti (111). Veliki problem je relativno slaba absorpcija naringina u tijelu jer se u najboljem slučaju samo 15 % naringina apsobira kroz probavilo (130).

3 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je istražiti može li primjena polifenola naringina *in vivo*, zajedno s valproatom, umanjiti povećanu proizvodnju slobodnih kisikovih radikala u mozgu, jetri i bubrezima, odnosno može li spriječiti povećanu lipidnu peroksidaciju, te može li takva združena primjena aktivirati sustav antioksidacijske obrane (mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), aktivnosti katalaze (CAT) i koncentracije ukupnog reduciranog glutationa (GSH)). Također, je cilj istražiti istu primjenu u *in vitro* pokusu na stanicama jetre (HepG2) i bubrega (PK15) i usporediti razine antioksidativnih parametara nakon tretmana antiepileptikom valproatom, naringinom i njihovim kombinacijama, kako bi se usporedilo do koje mjere stanični model *in vitro* odgovara antioksidacijskom učinku u organizmu *in vivo*. Hipoteza rada je da će naringin umanjiti oksidacijski stres *in vivo* i *in vitro,* te da će smanjiti steatohepatozu i hiperlipidemiju kroz moduliranje transkripcije ključnih faktora.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Eksperimentalne životinje

Istraživanje je provedeno na ukupno 48 miševa visokosrodnog soja C57BL/6, oba spola. Životinje su raspoređene u 4 skupine s obzirom na tretman, od kojih je svaka sadržavala 6 životinja oba spola.

Miševi su uzgojeni u jedinici za uzgoj laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U pokusu su se koristili miševi starosti 3 mjeseca, prosječne mase 25 (ženke) do 30 g (mužjaci). Prema skupinama i spolu životinje su smještene u kavezima dimenzija 20 cm x 30 cm x 20 cm na temperaturi od 25°C uz neograničen pristup hrani i vodi *ad libitum*. U kavezima su bili ovi uvjeti: 12 sati svjetla, 12 sati tame i 60 % vlažnosti. Hranjeni su standardnom hranom za miševe 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik pelete 12).

Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #102, 2017 i Pravilnik o zaštiti životinja koji se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe NN #47, 2011, a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja DHHS publ.#((NH)86-123). Pokus je odobren od strane Etičkog povjerenstva Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i Uprave za veterinarstvo Ministarstva poljoprivrede RH (Odobrenje broj No: 251-5810617-17-7). Pokuse i druge radove na laboratorijskim životinjama izvodile su isključivo osobe s licencom za rad s laboratorijskim životinjama.

4.2 Plan pokusa i pokusne skupine

Životinje su nasumično podijeljene prema tretmanu u četiri odvojene skupine (6 po skupini i po spolu), odnosno kontrolnu skupinu (6♂+6♀), skupinu koja je primala valproat (6♂+6♀), skupinu koja je primala naringin (6♂+6♀) i skupinu koja je kombinirano primala valproat i naringin (6♂+6♀).

Životinje su usmrćene 10. dan nakon primanja 10 dnevnih doza svakog spoja, dok je kontrolna skupina primala dnevne oralne doze 0,2 mL fiziološke otopine.

Skupina koja je primala valproat, dobila je dozu od 150 mg otopine valproata/kg tjelesne mase životinje. Naringin je apliciran u dozi od 25 mg/kg tjelesne mase. Skupina koja je istovremeno primala i valproat i naringin, primila je iste doze svakog spoja. Doze su izvedene

iz prethodnih pilot eksperimenata. Razlog navedenih doza je simulacija trostruko veće propisane terapijske doze valproata i moguće doze naringina ako bi se primjenjivala kao dodatak prehrani u koncentriranom pripravku kao nutraceutski dodatak prehrani.

Valproat je bio komercijalna mješavina lijeka Depakine, proizvođač Sanofi (mješavina valproata/valproične kiseline 50:50), a naringin je Sigmin proizvod. Svaki spoj apliciran je, putem oralne sonde, u volumenu od 0,2 mL vodene otopine po životinji. Tretman svih životinja odvijao se između 8-10 sati ujutro kako bi se izjednačile cirkadijane razlike između tretmana i izbjegle razlike u metabolizmu.

4.3 Priprema tkiva

Nakon 10-dnevnog oralnog tretmana, a 24 sata nakon zadnje dane doze, životinje su anestezirane hlapljivim anestetikom izofluranom i injekcijom mješavine Xylapana i Narketana (intraperitonealno, 25 mg/kg tjelesne mase), prema referencama (131-133). Krv je prikupljena kardijalnom punkcijom i životinje su usmrćene cervikalnom dislokacijom. Prikupljena krv centrifugirana je da se izolira serum. Prikupljeni su organi mozak, jetra i bubreg.

Izolirani organi izvagani su analitičkom vagom. Da bi se odredili biomarkeri oksidacijskog stresa u mozgu, jetri i bubregu i transkripcijski faktori u jetri, dijelove tkiva homogeniziralo se u 50 mM fosfatnom puderu pH 7 u omjeru 1:10 (w/v). Fosfatni pufer (50 mM, pH7): pripremi se otopina (a) 0,2 M NaH_2PO_4 x H_2O i otopina (b) 0,2 M Na_2HPO_4 x 7 H_2O; 17 mL otopine (a) pomiješa se s 183 mL otopine (b), potom se podesi pH i doda se H_2O do 800 mL (131-133).

Organi su homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD270 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka) snage od 10%, u 3 ciklusa od 30 sekundi. Između svakog ciklusa potrebna je stanka. Za vrijeme rada uzorci su bili pothlađivani ledom. Homogenati koji se dobiju centrifugirani su centrifugom Mikro 200 R (Hettich, Njemačka) na 2000 x g 15 minuta uz hlađenje na +4 °C (131-133).

Dobiveni supernatanti poslužili su za određivanje biomarkera oksidacijskog stresa, razine transkripcijskih faktora i enzima. Tako pripremljeni uzorci pohranili su se na -80 °C do analize (131-133).

4.4 Određivanje parametara oksidacijskog stresa u tkivima

4.4.1 Koncentracija proteina u tkivima

Koncentracija proteina u pripremljenim homgenatima tkiva mozga, jetre i bubrega određena je metodom po Lowryju (134). Metoda se temelji na kemijskoj reakciji između dvovalentnih iona bakra, u lužnatim uvjetima, i amino skupine iz peptidne veze, a uslijed koje onda dolazi do redukcije Cu^{2+} u Cu^{+} i nastanka kompleksa Cu^{+}-protein. Dodatkom Folin-Ciocalteau reagensa (fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina) dolazi do redukcije fosfomolibdena i fosfovolframove kiseline u molibden i fosfovolfram plavilo zbog Cu^{+}-proteinskog kompleksa i bočnih ogranaka aminokiselina. Nastali kompleks je plavoljubičaste boje te je kao takav mjerljiv s maksimalnom apsorbancijom od λ=600 nm. Intenzitet nastalog obojenja je izravno proporcionalan koncentraciji proteina u pripremljenim uzorcima. Prije određivanja koncentracije proteina potrebno je, pomoću standarda goveđeg seruma, (Bovine serum albumin, BSA), izraditi baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji proteina. Iz početne koncentracije BSA koja iznosi 20 mg/mL treba pripremiti raspon koncentracija od 0 do 100 mg/mL, te slijepu probu koja sadrži destiliranu vodu umjesto otopine proteina.

Otopine za određivanje proteina:

Otopina A:	2 % Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH
Otopina B:	0,5 % $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
Otopina C:	1 % NaK-tartarat
Otopina D:	48 mL otopine A + 1 mL otopine B + 1 mL otopine C
Otopina E:	Folin-Ciocalteu reagens, komercijalni reagens razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:2

U epruvete se dodaje 100 µL uzorka i 2 mL otopine D. Zatim se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak rađen je u triplikatu. Kada završi propisana inkubacija, potrebno je odmah dodati 200 µL otopine E uz snažno vorteksiranje. Nakon toga slijedi ponovno inkubacija na sobnoj temperaturi 30 minuta. Istom procedurom potrebno je izraditi i baždarni dijagram. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA odredi se

nagib pravca i odsječak na y-osi, preko čega se onda izračuna nepoznata koncentracija proteina u uzorcima, kako slijedi u formuli:

$$\gamma = \frac{A_{uzorka} - b}{a} \cdot d$$

b= odsječak na y-osi standardne krivulje
a= nagib standardne krivulje
d= faktor razrijeđenja uzorka
Koncentracija proteina izražena je u mg/mL.

Izmjerena koncentracija proteina korištena je za izražavanje izmjerenih parametara u uzorcima tkiva (primjerice: aktivnost SOD-a izražena kao U/mg proteina).

4.4.2 Koncentracija malondialdehida (MDA) u tkivima

Lipidna peroksidacija temeljena je na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA), glavnog produkta lipidne peroksidacije, metodom opisanom prema (131-133, 135). Reakcijom malondialdehida i tiobarbituratne kiseline dolazi do nastanka ružičastog obojenja koje je mjerljivo spektrofotometrijski.

Odvaganim tkivima mozga, jetre i bubrega (100 mg) dodaje se 1 mL 50 mM fosfatnog pufera pH 7 te se homogenizira 15 minuta na brzini od 10000 rpm. U Eppendorf epruveti pomiješa se 200 µL nerazrijeđenog supernatanta prethodno pripremljenih tkiva jetre i bubrega sa 100 µL 8,1 %-tne vodene otopine natrijeva dodecil sulfata (SDS-a), 750 µL 20%-tne vodene otopine octene kiseline (pH 3,5) i 750 µL 0,8%-tne vodene otopine tiobarbituratne kiseline. Tako pripremljena smjesa inkubira se 60 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 95°C. Nakon inkubacije smjesu je potrebno ledom naglo ohladiti, a zatim centrifugirati 15 minuta na 5000 rpm pri +4°C.

Nakon provedenog centrifugiranja potrebno je odvojiti supernatant te se mjeri apsorbancija pri λ=532 nm i 600 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Ukupna apsorbancija određuje se formulom:

$$A = A_{532nm} - A_{600nm}$$

Koncentracija MDA izračunata je prema formuli:

$$c(MDA) = \frac{\Delta A \cdot V_{reakcijske\ smjese}\,(mL)}{\varepsilon \cdot V_{uzorka}(mL) \cdot c_{proteina}(\frac{mg}{mL})}$$

Gdje je:

$\varepsilon = 1.56 \times 10^5\ M^{-1}\ cm^{-1}$
l (duljina kivete) = 1 cm
Koncentracija produkata lipidne peroksidacije izražava se kao nmol MDA/mg proteina.

4.4.3 Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u tkivima

Aktivnost SOD-a određena je u supernatantima homogenata mozga, jetre i bubrega inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi (131-133), prvotno opisanoj 1971. godine u Flohé i sur. (136). U staklenu kivetu s 1.45 ml otopine A doda se 25 µl uzorka (po potrebi razrijeđenog fosfatnim puferom pH 7.8 bez EDTA-a) i reakcija se započne dodatkom 25 µl otopine B.

Vrijeme reakcije mjeri se 3 minute na valnoj duljini 550 nm, pri temperaturi od 25ºC. Kako aktivnost ksantin-oksidaze može varirati od pokusa do pokusa, nužno je uskladiti koncentraciju tog enzima tako da brzina redukcije citokroma C bude analogna porastu apsorbancije od 0,025 po minuti u kontrolnoj reakciji bez superoksid dismutaze.

Priprema otopina za određivanje SOD-a:

1. Otopina A: 1,5 mg 1 mM ksantina otopljen je u 9,86 mL 1 mM NaOH i tome je dodano 12,96 mg 0,05 mM citokroma C otopljenog u 85 mL 50 mM fosfatnog pufera pH 7,8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e.
2. Otopina B: 1500 µl otopine svježe pripremljene ksantin oksidaze u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e, konačne aktivnosti od 0,2 U/ml.
3. Osnovna otopina SOD-a iz goveđih eritrocita u koncentraciji 1 mg/mL razrjeđuje se do koncentracije 1000 ng u 100 µl; ta se koncentracija namjesti na koncentraciju 500 ng u 50 µl kojom se rade serije razrjeđenja u rasponu od 100 ng - 500 ng u 50 µl.

Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a. Aktivnost SOD-a izražena je kao U/mg proteina.

4.4.4 Aktivnost katalaze (CAT) u tkivima

Aktivnost CAT-a određuje se spektrofotometrijskom metodom prema (131-133, 137). U kiveti se pripremi najprije slijepa proba koju čine pomiješanih 20 µL fosfatnog pufera i 980 µL 10 mM H_2O_2. U ostalim kivetama potom se priprema 20 µL uzoraka tkiva jetre i bubrega koje pripremimo razrjeđivanjem i dodamo 980 µL 10 mM H_2O_2. Tim korakom započinje enzimska reakcija.

Spektrofotometrijski izmjeri se aktivnost enzima na valnoj duljini λ = 240 nm pri temperaturi od 25°C, tijekom jedne minute. CAT aktivnost mjeri se padom apsorbancije u jedinici vremena, a izražena je kao količina enzima koji razgrađuje 1 µmol H_2O_2 u minuti kod pH 7,0 pri 25 °C gdje koncentracija H_2O_2 pada od 10,3 do 9,2 mM.

Koncentracija CAT-a izračunata je prema formuli:

$$c(KAT) = \frac{\Delta A \cdot V_{reakcijske\ smjese}(\mathrm{mL})}{\varepsilon \cdot V_{uzorka}(\mathrm{mL}) \cdot c_{proteina}(\mathrm{mg/mL})} \cdot d$$

Gdje je:

$\varepsilon(H_2O_2)$ = 43,6 M^{-1} cm^{-1},

l (duljina kivete) = 1 cm

d - faktor razrjeđenja uzorka.

Aktivnost CAT-a u uzrocima tkiva mozga, bubrega i jetre izražena je u µmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina (µmol H_2O_2/min mg proteina), a to je jednako jedinicama CAT-a po miligramu proteina.

4.4.5 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u tkivima

Postupak određivanja koncentracije reduciranog glutationa (GSH) temelji se na reakciji GSH-a i DNTB-a (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) (131-133, 138). DNTB je poznat i kao Ellmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih skupina u biološkim uzorcima. Ellmanov reagens uzrokuje oksidaciju GSH pri čemu dolazi do stvaranja veće količine 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (NTB) i male količine glutation disulfida (GSSG). NTB je žuto obojeni produkt koji se mjeri na Plate Readeru pri 412 nm, na temelju čega dobivamo podatak o koncentraciji GSH-a prema radu Eyer i sur. iz 2003. g. (138).

Ukupna koncentracija GSH-a izračunata je prema formuli:

$$c(GSH)\frac{\Delta A_{uzorak}\cdot V_{reakcijske\ smjese}(mL)}{\varepsilon\cdot V_{uzorka}(mL)\cdot C_{proteina}(\frac{mg}{mL})}\cdot d$$

$\varepsilon(DNTB)$= 8,22 mM^{-1}

l = 0,6 cm

d = faktor razrijeđena uzorka

Aktivnost enzima reduciranog glutationa (GSH) izrazili smo kao nmol/mg proteina (nmol/min/mg proteina).

4.4.6 Koncentracija karboniliranih proteina u jetri

Za utvrđivanje količine oštećenja proteina korištena je metoda prema (131-133, 139), a određuje se kao sadržaj karbonilnih skupina u proteinskom uzorku. Karbonilne skupine proteinskog lanca reagiraju s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) otopljenim u HCl-u te daju 2,4-dinitrofenilhidrazon.

Volumenu od 200 µL homogenata uzorka dodano je 300 µL 10 mM DNPH u 2M HCl. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su pri sobnoj temperaturi tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Proteini su precipitirani s 10% (w/v) trikloroctenom kiselinom (TCA) na -20 °C tijekom 5 minuta te nakon toga centrifugirani na +4 °C pri 12000 g 10 minuta. Supernatant je uklonjen, a precipitat resuspendiran u mješavini etanola i etil acetata u omjeru 1:1 i centrifugiran pri istim uvjetima. Postupak ispiranja taloga ponovljen je sve dok se sav nevezani DNPH nije isprao. Nakon toga precipitat je otopljen u 6 M gvanidin HCl u kupelji na 35 °C. Dobivena otopina korištena je za mjerenje apsorbancije pri λ = 370 nm. Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je izračunata korištenjem molarnog ekstincijskog koeficijenta prema formuli:

$$c(\mathrm{PC}) = \frac{A_{uzorak}}{\varepsilon \cdot c_{\mathrm{proteina}}\,(\mathrm{mg/mL})}$$

gdje ε iznosi $0{,}022\ \mu\mathrm{M}^{-1}\ \mathrm{cm}^{-1}$, a duljina kivete l iznosi 1 cm. Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina prikazana je kao omjer količine karbonila i koncentracije proteina te je izražena kao nmol/mg proteina.

4.5 Lipidni parametri u serumu

4.5.1 Ukupni trigliceridi u serumu

Trigliceridi su analizirani setom BeckmanCoulter OSR61118. Trigliceridi iz uzoraka seruma hidrolizirani su kombinacijom mikrobnih lipaza kako bi se dobili glicerol i masne kiseline. Glicerol je fosforiliran dodatkom adenozin trifosfata (ATP) kataliziranog glicerol kinazom kako bi se dobio glicerol-3-fosfat. Glicerol-3-fosfat je zatim oksidiran molekulom kisika u prisutnosti glicerol fosfat oksidaze u vodikov peroksid i dihidroksiaceton fosfat. Nastali vodikov peroksid reagira s 4-aminofenazonom i N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilin dinatrijevom soli (MADB) u prisutnosti peroksidaze (POD) kako bi se formirao kromofor koji se očitava na 660/800 nm na čitaču mikrotitarskih ploča Infinite 200 (Tecan). Povećanje apsorpcije na 660/800 nm proporcionalno je sadržaju triglicerida u uzorku.

4.5.3 Ukupni kolesterol u serumu

Beckman Coulterov set za kolesterol OSR6216 koristi kolesterol esteraze koje hidroliziraju estere kolesterola u uzorku seruma EDTA. Zatim, dodavanjem kolesterol oksidaze, nastali slobodni kolesterol oksidira se u kolesten-3-on uz istovremeno stvaranje vodikovog peroksida, koji se oksidira u 4-aminoantipirin i fenol u prisutnosti peroksidaze i time nastaje crvena kinonimska boja koja je mjerena spektrofotometrijski na 540/600 nm kao povećanje apsorpcije na čitaču Infinite 200 (Tecan).

4.5.4 HDL kolesterol u serumu

HDL kolesterol analiziran je u uzorcima seruma EDTA pomoću Beckman Coulter OSR6195. Analiza se sastoji od dvije različite faze. U prvoj fazi, slobodni kolesterol u ne-HDL lipoproteinima otapa se i troši od strane kolesterol oksidaze, peroksidaze i DSBmT i time se stvara bezbojni krajnji proizvod. U drugoj fazi jedinstveni deterdžent selektivno otapa HDL lipoproteine. HDL kolesterol oslobađa se za reakciju s kolesterol esterazom, kolesterol oksidazom i kromogenskim sustavom kako bi se dobio kompleks plave boje koji se može izmjeriti bikromatski na 600/700 nm na čitaču Infinite 200 (Tecan). Povećanje apsorpcije izravno je proporcionalno HDL koncentraciji u uzorku seruma.

4.5.5 LDL kolesterol u serumu

Koncentracije LDL-c izračunate su pomoću Friedewaldove jednadžbe:

LDL-kolesterol: [LDL-c] = [Ukupni kolesterol] − [HDL-c] − [Ukupni trigliceridi / 5]

4.6 Histologija lipidnih naslaga u tkivu jetre metodom Oil Red O

Oil Red O (CAS 1320-06-5) histološka boja dobivena je od Sigme Aldrich. Protokol za bojenje lipida i masti proveden je na smrznutim dijelovima jetre (12 um) izrezanim na Cryostatu. Radna otopina pripremljena je kao 0,5% uljna Oil Red O radna otopina Sigma u propilen glikolu (Sigma). Stakalca s dijelovima jetre sušena su na zraku 30 minuta na sobnoj temperaturi i zatim fiksirana u ledeno hladnom 10% formalinu (Kemika) 3 minute. Nakon daljnjeg sušenja na zraku tijekom sljedećih 15 minuta, stakalca su stavljena u uljno crvenu O radnu otopinu na 7 minuta. Stakalca su dvaput isprana u promijenjenoj destiliranoj vodi i obojena u Mayerovom hematoksilinu (Biognost) 30 sekundi, temeljito isprana u tekućoj vodi iz slavine 3 minute i pripremljena glicerinskim želeom, a nakon toga mikroskopirani na mikroskopu Olympus.

5 TRANSKRIPCIJSKI FAKTORI I ENZIMI LIPIDNE OKSIDACIJE U JETRI

5.1.1 Receptor aktivacije proliferacije peroksisoma-alfa (PPARα)

Set za mikrotitarske ploče ELISA (enzimski povezani imunosorbentni test) MyBioSource MBS2502542 korišten je za analizu razine mišjeg alfa receptora aktiviranog proliferatorom peroksisoma (PPAR alfa, PPARα) u homogenatima jetrenog tkiva. Ova analiza koristi tehniku imunoanalize kvantitativnog sendvič ELISA analitičke biokemijske tehnike koja se temelji na interakcijama PPARα antigena s antitijelom PPARα (imunosorbencija) i enzima horse radish peroxidase (HRP) kolorimetrijskog detekcijskog sustava za otkrivanje PPAR alfa antigena u uzorcima. Intenzitet boje mjeri se kolorimetrijski na čitaču mikroploča Infinite 200 (Tecan). Raspon iznosi 0,78-50 ng/mL, osjetljivost 0,47 ng/mL.

5.1.2 Koaktivator receptora aktivacije proliferacije peroksisoma gama 1-alfa (PPARG1α)

Set za mikrotitarske ploče ELISA (enzimski povezani imunosorbentni test) MyBioSource MBS707053 korišten je za analizu razina mišjeg gama koaktivatora 1 alfa receptora aktiviranog proliferatorom peroksisoma (PPARGC1α, sinonim PGC1α) u homogenatima jetrenog tkiva. Ova analiza koristi tehniku kvantitativne sendvič enzim imunoanalize koja se temelji na interakcijama PPARGC1α antitijela i PPARGC1α antigena (A) (imunosorbencija), i enzima horse radish peroxidase (HRP) kolorimetrijskog detekcijskog sustava za otkrivanje PPAR-α

antigena u uzorcima. Intenzitet boje mjeri se kolorimetrijski na čitaču mikroploča Infinite 200 (Tecan). Raspon mjerenja bio je između 0,156 ng/mL – 10 ng/mL, osjetljivost 0,039 ng/ml.

5.1.3 Acil-koenzim A oksidaza1 (ACOX1)

Set mikrotitarske ploče ELISA (enzimski povezani imunosorbentni test) MyBioSource MBS931669 korišten je za analizu razina acil-koenzima A oksidaze 1 (ACOX1) u tkivu jetre miša. Analitička biokemijska tehnika seta MBS9316691 temelji se na interakcijama protutijela i ACOX1 i HRP kolorimetrijskom detekcijskom sustavu za otkrivanje ACOX1 u uzorcima. Intenzitet boje se mjeri kolorimetrijski na čitaču mikroploča Infinite 200 (Tekan). Osjetljivost seta je 0,1 ng/ml. Raspon detekcije ovog seta je 0,5 ng/ml-16 ng/ml.

5.1.4 Nuklearni faktor NFE2R2

Set za mikrotitarske ploče ELISA (enzimski povezani imunosorbentni test) MyBioSource MBS744301 za analizu prisutnosti faktora 2 povezanog s nuklearnim faktorom eritroida 2 (Nrf2) u homogenatima jetre miša, temelji se na vezanju protutijela za Nrf2 i HRP u kolorimetrijskom detekcijskom sustavu za otkrivanje Nrf2 antigena. Intenzitet boje mjeri se kolorimetrijski na čitaču mikroploča Infinite 200 (Tecan). Osjetljivost je do 0,1 ng/ml.

5.1.5 Biokemijski parametri u serumu

Razine serumskih biokemijskih parametara (osim lipida) izmjerene su aparatom VetScanTM s pripadajućim komercijalnim kitovima. Za potrebe ovog pokusa korišten je Vetscan cjeloviti dijagnostički profil rotor reagensa za dobivanje *in vitro* kvantitativnih podataka za alaninaminotransferazu (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 heparinizirano cjelovitoj krvi, plazmi ili serumu.

5.3 In vitro učinci valproata i naringina u jetrenim HepG2 stanicama i PK15 stanicama bubrega

Eksperimentalni dio rada *in vitro* koji se odnosi na uzgajane stanične linije napravljen je na Zavodu za animalnu fiziologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. U istraživanjima su korištene PK15 (iz engl. "Porcine Kidney-15") i HepG2 (iz engl. "Liver Hepatocellular") stanice. Stanice su uzgajane u uvjetima *in vitro*. PK stanice uzgojene su u hranjivom mediju RPMI (iz engl. "Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI Medij)") s dodatkom 10% FBS-a, a HepG2 u hranjivom mediju EMEM (iz engl. "Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)") s dodatkom 10% seruma (fetal bovine serum, FBS). Stanice su rasle u sterilnim plastičnim petrijevim zdjelicama promjera 100 mm te održavane u kulturi redovitim presađivanjem nakon odvajanja od podloge pomoću otopine 0,05% tripsina s dodatkom 0,02% EDTA. Za brojanje stanica korišten je automatski brojač stanica Countess (ThermoFisher Scientific) ili Bürker-Türkova komorica, te invertni svjetlosni mikroskop. Za pokus MTT testa (Proomega komercijalni MTT kit), prema priloženom protokolu proizvođača za određivanja postotka vijabilnosti stanica, nasađeno je 10^4 stanica/mL na 96 mikrotitarske pločice, a stanicama su dodavane različite koncentracije (0, 0,1, 1, 5 i 10 mMol/mL) valproata i/ili naringina i njihovih kombinacija kojima su stanice bile izložene 24 sata. Nakon toga je izmjerena vijabilnost MTT testom komercijalnim kitom. Za određivanje antioksidacijskih enzima korišteni su isti protokoli, ali su stanice nasađene u Petrijevim zdjelicama promjera 100 mm u kojima su tretirane nakon što su postigle brojnost od 10^6 stanica /mL. Stanice su bile izložene navedenim koncentracijama valpraota i naringina i njihovim kombinacijama tijekom 24 sata u inkubatoru pri 37°C i 5% CO_2. Nakon 24 sata stanice su centrifugirane i resuspendirane u 400 µL pufera PBS, homogenizirane, a antioskidacijski parametri (MDA, CAT, GSH) koji su određeni u homogenatu napravljeni su prema istim protokolima koji su opisani u pokusu *in vivo*, osim SOD enzima. Svaka analiza po tretmanima s navedenim koncentracijama napravljena je u triplikatu.

5.4 Statistička obrada podataka

Podatci o koncentraciji i aktivnosti pojedinih parametara koji sudjeluju u antioksidacijskoj obrani organizma u tkivima mozga, jetre, bubrega i serumu prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (± SD) i uspoređeni su Kruskal Wallis neparametrijskim ANOVA i LSD-post hoc testom s razinom statističke značajnosti od $p \leq 0,05$

između skupina. Za kulture stanica rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (± standard error, SE), jer je svako mjerenje napravljeno u triplikatu, a statističko testiranje u pokusu *in vitro* provedeno je t-testom između kontrolne skupine i pojedinog tretmana s razinom statističke značajnosti od $p \leq 0,05$ između skupina. Statistička analiza provedena je pomoću SPSS 17.0 softvera u kojem su izrađene tablice prikazane u radu ili programom GraphPadPrism u kojem su izrađeni prikazani grafikoni u rezultatima.

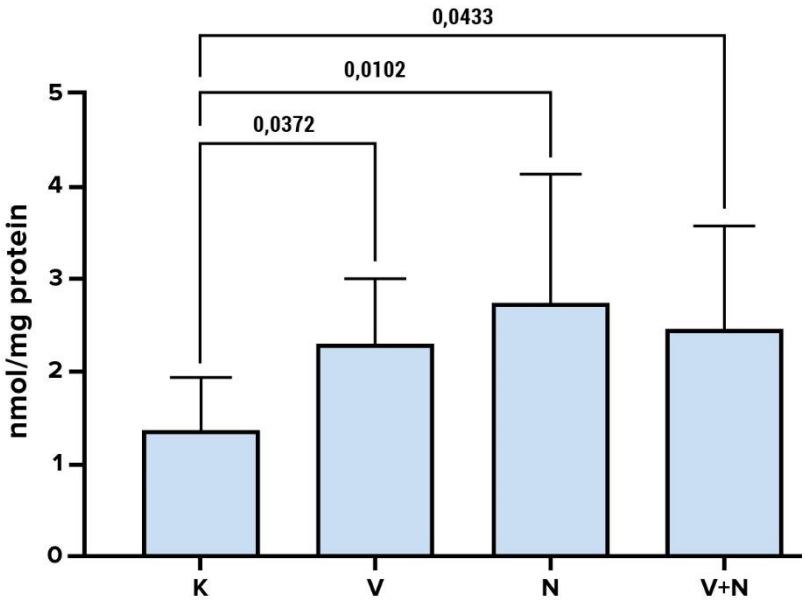
6 REZULTATI

6.1 Pokazatelji oksidacijskog stresa u mozgu

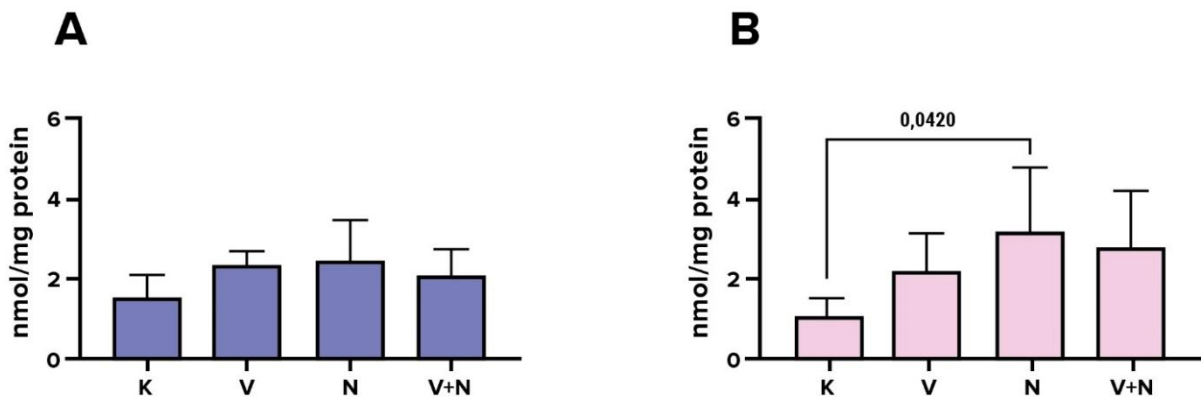
6.1.1 Koncentracija malondialdehida (MDA) u mozgu

Usporedbom skupina mužjaka i ženki zajedno, uočava se da je u kori (korteksu) prednjeg režnja velikog mozga (slika 8) koncentracija malondialdehida bila statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećana u svih tretiranih skupina u odnosu na netretirane (kontrolne) životinje.

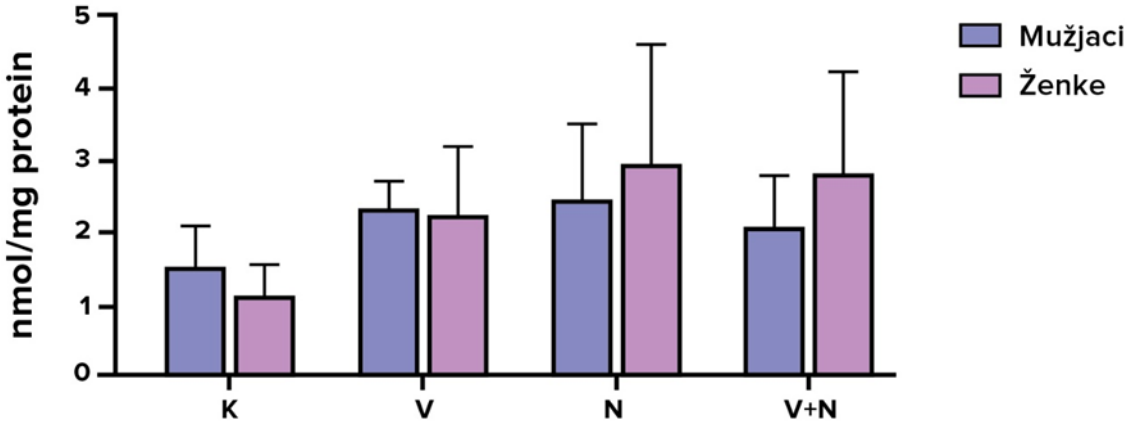
Analizom rezultata posebno po spolovima, zabilježena su značajna ($p \leq 0,05$) povećanja lipidne peroksidacije u prednjem dijelu velikog mozga u ženki tretiranih naringinom (slika 9), a u ostalih skupina, kao i između spolova unutar iste tretirane skupine (slika 10), nije bilo značajnih razlika ($p \leq 0,05$).



Slika 8. Koncentracija MDA u kori prednjeg režnja velikog mozga; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 9. Koncentracija MDA u kori prednjeg režnja velikog mozga mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

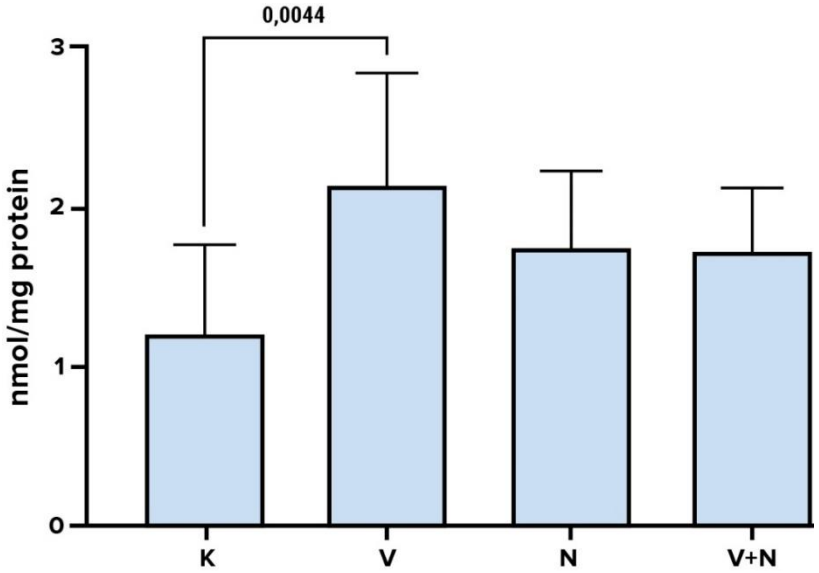


Slika 10. Koncentracija MDA; u kori prednjeg režnja velikog mozga; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

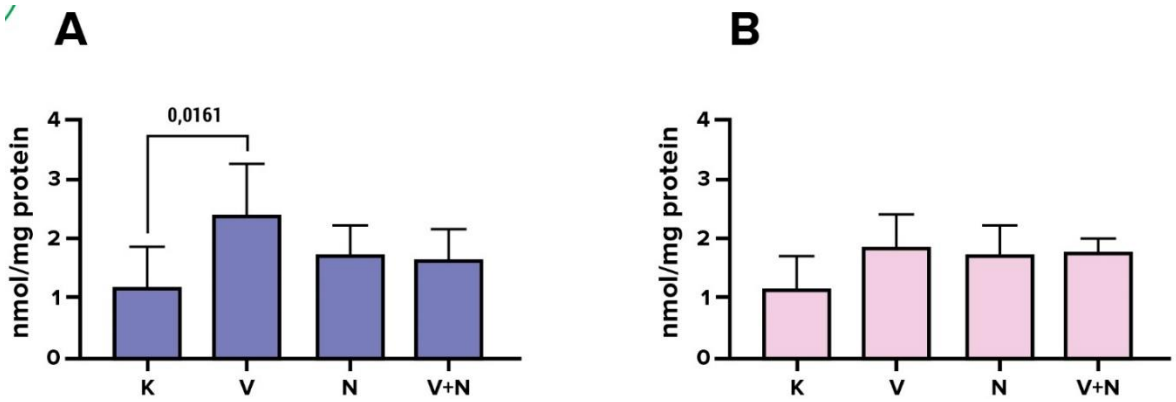
Usporedbom skupina mužjaka i ženki zajedno, uočava se da je u kori središnjeg dijela velikog mozga (slika 11) koncentracija MDA bila statistički značajno povećana ($p \leq 0,05$), samo u skupini tretiranoj valproatom u odnosu na kontrolu.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 14), isti trend statistički značajnog povećanja ($p \leq 0,05$) MDA, odnosno lipidne peroksidacije u središnjem dijelu kore velikog mozga zabilježen je samo kod mužjaka, ali ne i u ženki.

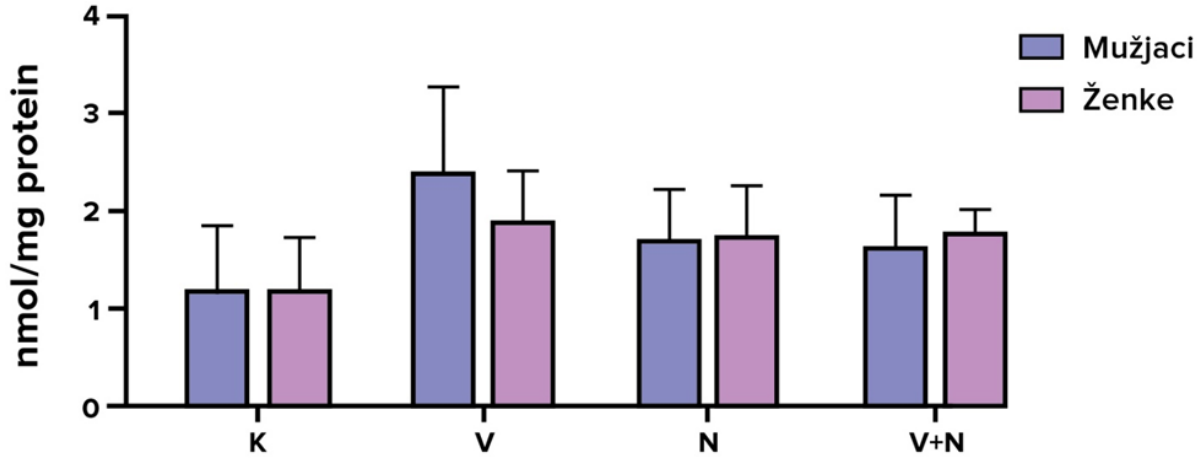
Nisu zabilježene statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike u lipidnoj peroksidaciji između spolova (slika 15) u kori središnjeg dijela velikog mozga.



Slika 11. Koncentracija MDA u kori središnjeg dijela velikog mozga; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg +25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 12. Koncentracija MDA u kori središnjeg dijela velikog mozga mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

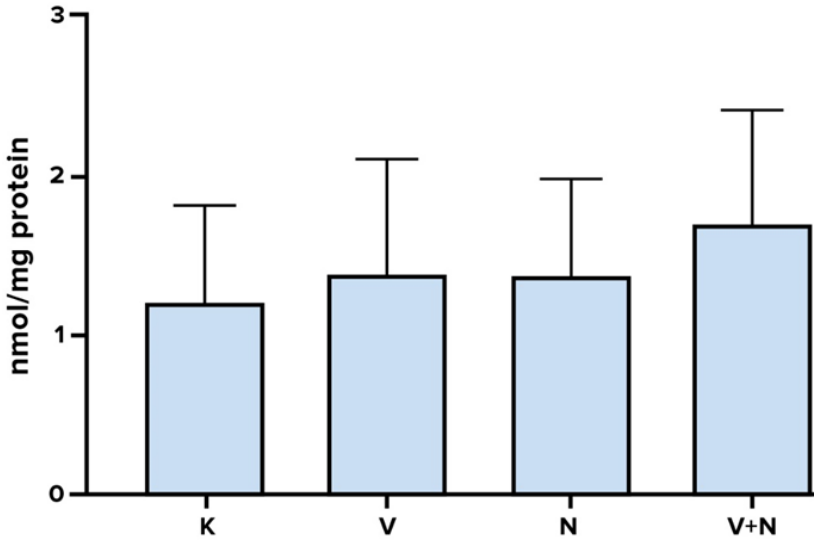


Slika 13. Koncentracija MDA u kori središnjeg dijela velikog mozga; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

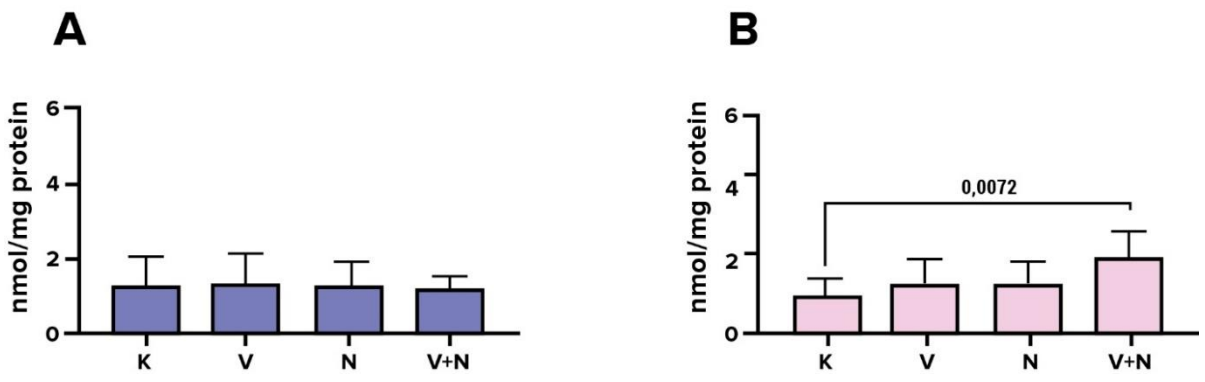
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno, uočava se da nije bilo statistički značajnih ($p \leq 0,05$) promjena u aktivnosti lipidne peroksidacije u malom mozgu (slika 14) svih skupina u odnosu na kontrolu, kao ni među tretiranim skupinama.

Usporedbom rezultata posebno po spolovima (slika 15) uočava se da ženke tretirane kombinacijom valproata i naringina imaju statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje lipidne peroksidacije u malom mozgu u odnosu na netretirane ženke.

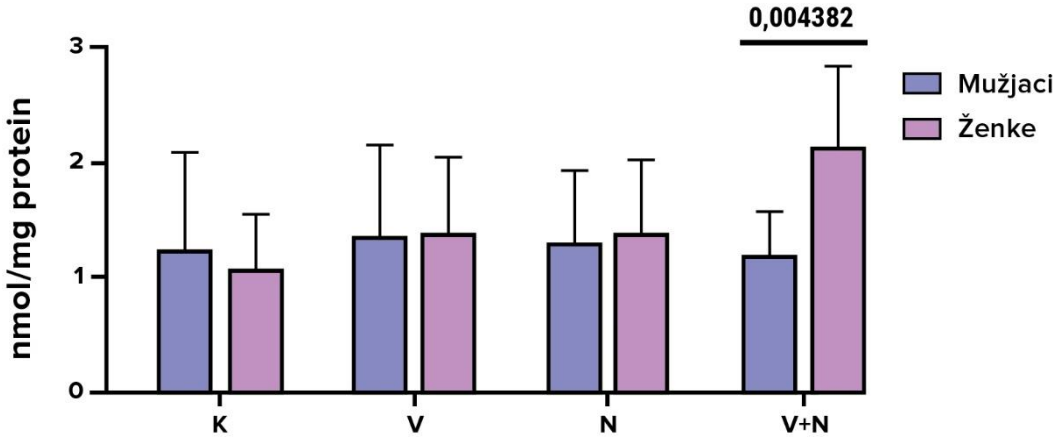
Nije bilo statistički značajnih ($p \leq 0,05$) razlika u lipidnoj peroksidaciji između spolova (slika 16) osim u V + N skupini.



Slika 14 . Koncentracija MDA u malom mozgu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 15. Koncentracija MDA u malom mozgu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



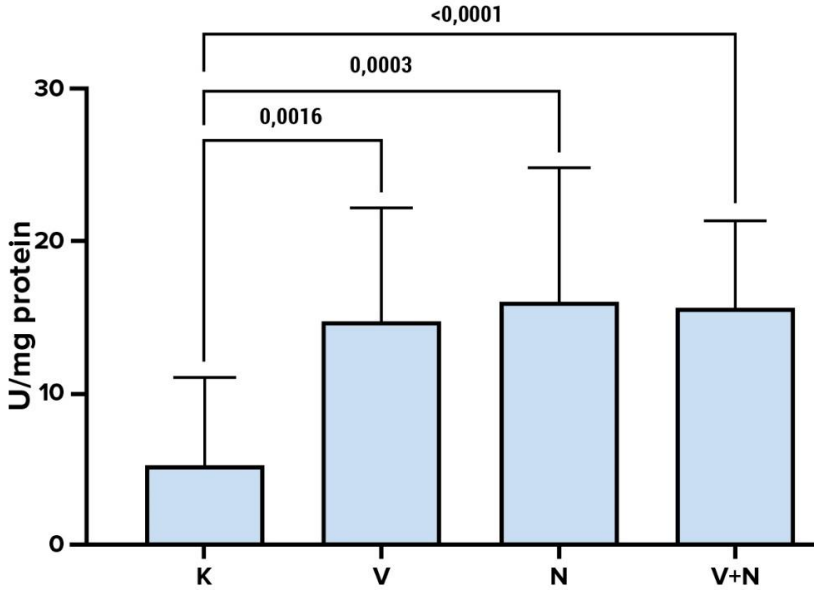
Slika 16. Koncentracija MDA u malom mozgu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.1.2 Aktivnost superoksid disimutaze (SOD) u mozgu

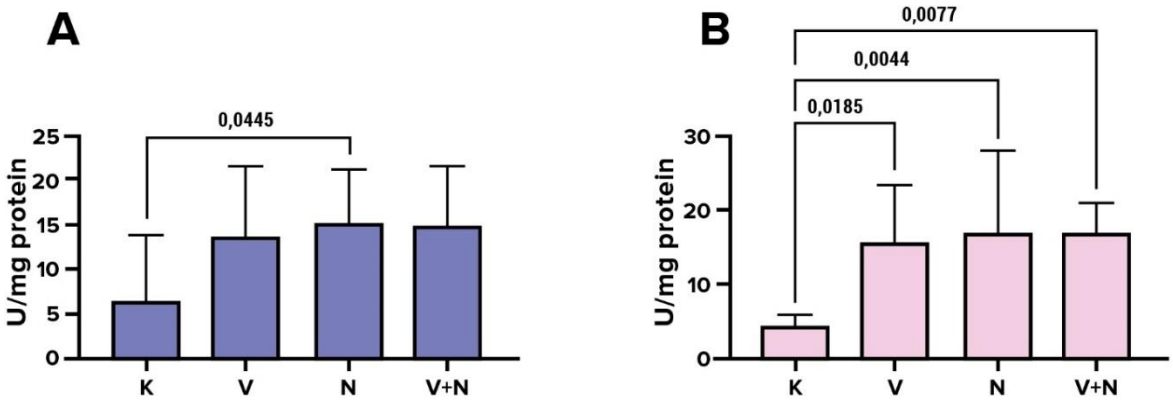
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno, uočava se da je u prednjoj kori velikog mozga statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje aktivnosti SOD-a utvrđeno u svim tretiranim skupinama u odnosu na kontrolu (slika 17).

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 18) uočava se da je statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje SOD-a nastupilo u mužjaka tretiranih naringinom u odnosu na kontrolu i u svih skupina ženki u odnosu na kontrolu.

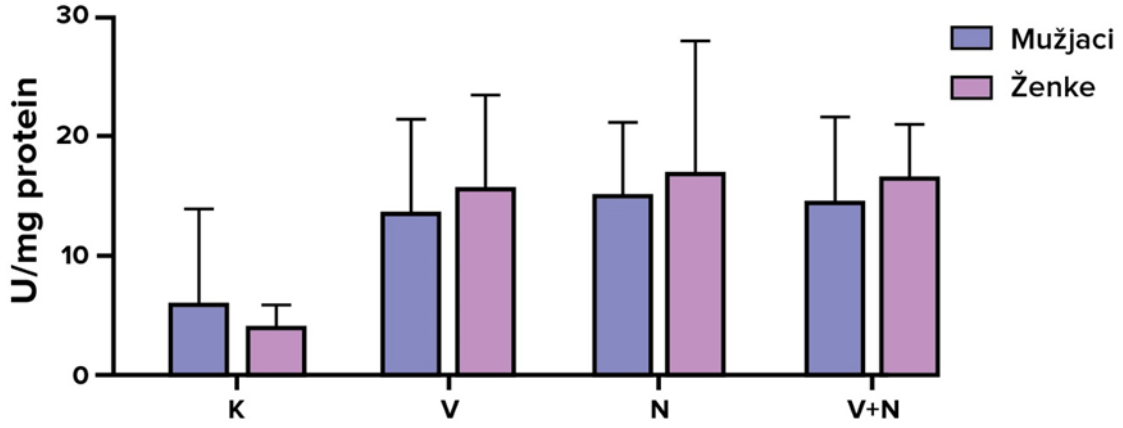
Usporedbom pojedinih skupina između mužjaka i ženki, zbog varijabilnosti i raspona izmjerenih vrijednosti, nisu utvrđene statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike u aktivnosti SOD-a u kori prednjeg dijela velikog mozga između spolova niti u jednoj tretiranoj skupini (slika 19).



Slika 17. Aktivnost SOD-a u kori prednjeg dijela velikog mozga; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



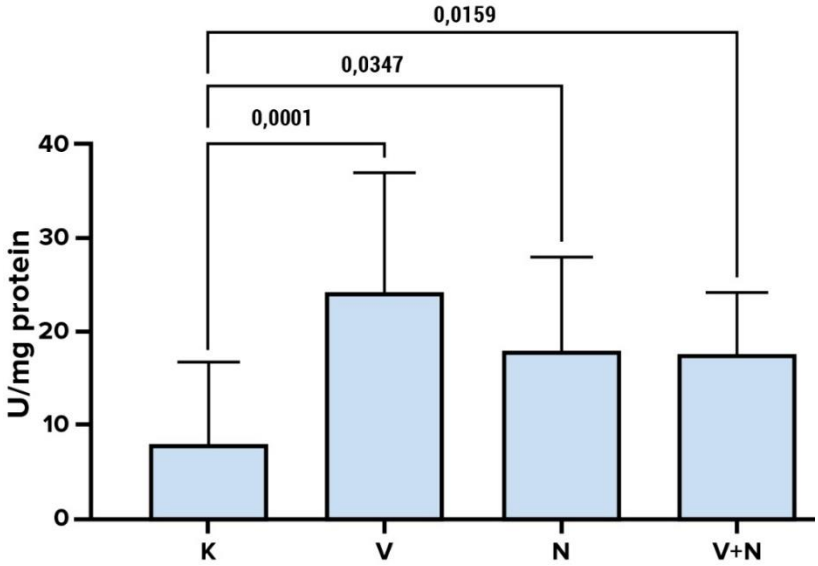
Slika 18. Aktivnost SOD-a u kori prednjeg režnja velikog mozga mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N (150 mg/kg + 25 mg/kg) – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina. Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



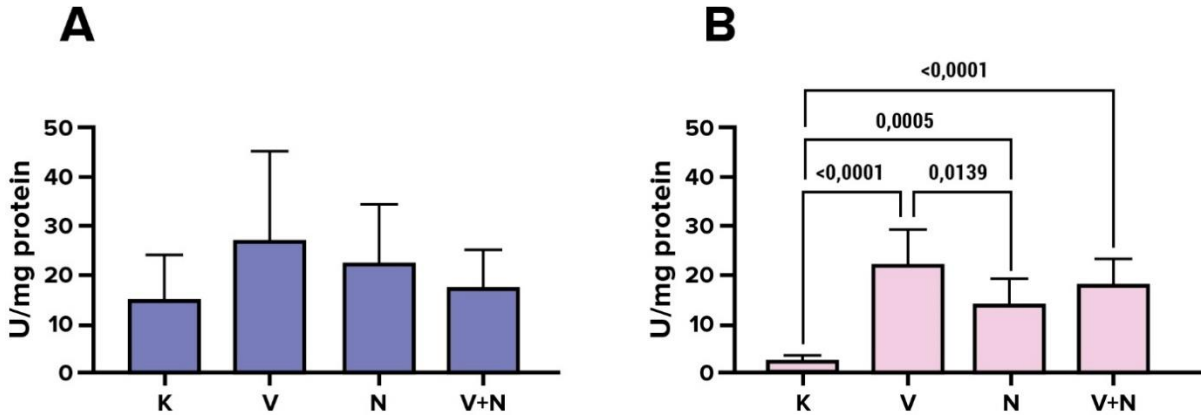
Slika 19. Aktivnost SOD-a u kori prednjeg režnja velikog mozga; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućim p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno, uočava se da je u kori središnjeg djela velikog mozga došlo do statistički značajnih ($p \leq 0,05$) povećanja aktivnosti SOD-a (slika 20) u svim tretiranim skupinama u odnosu na kontrolu, pritom najviše u skupini tretiranoj valproatom.

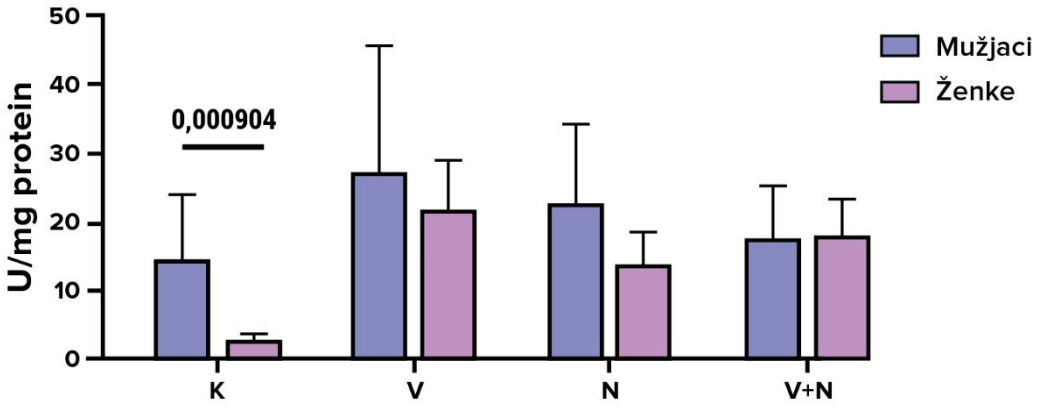
Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 21), uočava se da jedino u ženki postoji isti trend povećanja aktivnosti SOD-a u kori središnjeg dijela velikog mozga u svim tretiranim skupinama u odnosu na kontrolu, pritom najviše u skupini tretiranoj valproatom. U kontrolnoj skupini utvrđeno je da mužjaci imaju statistički značajno ($p \leq 0,05$) višu aktivnost SOD-a u kori središnjeg dijela velikog mozga u odnosu na ženke (slika 22).



Slika 20. Aktivnost SOD-a u kori središnjeg dijela velikog mozga; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 21. Aktivnost SOD-a u kori središnjeg dijela velikog mozga mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

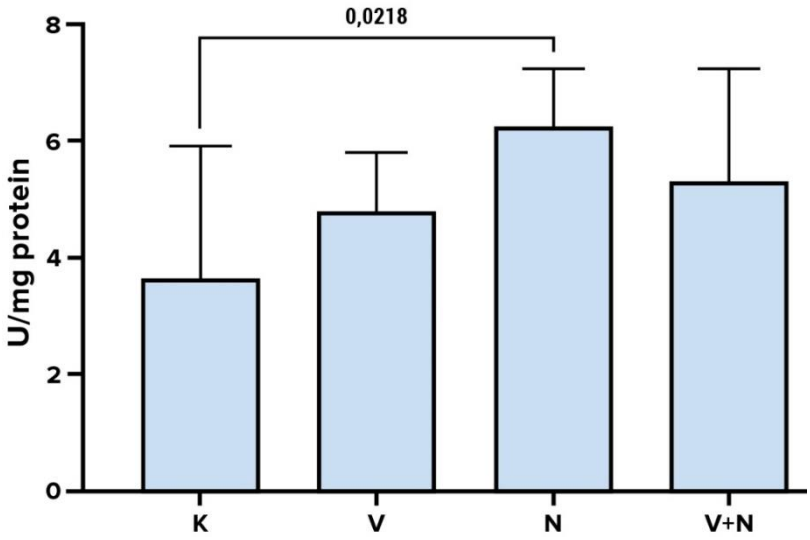


Slika 22. Aktivnost SOD-a u kori središnjeg dijela velikog mozga razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

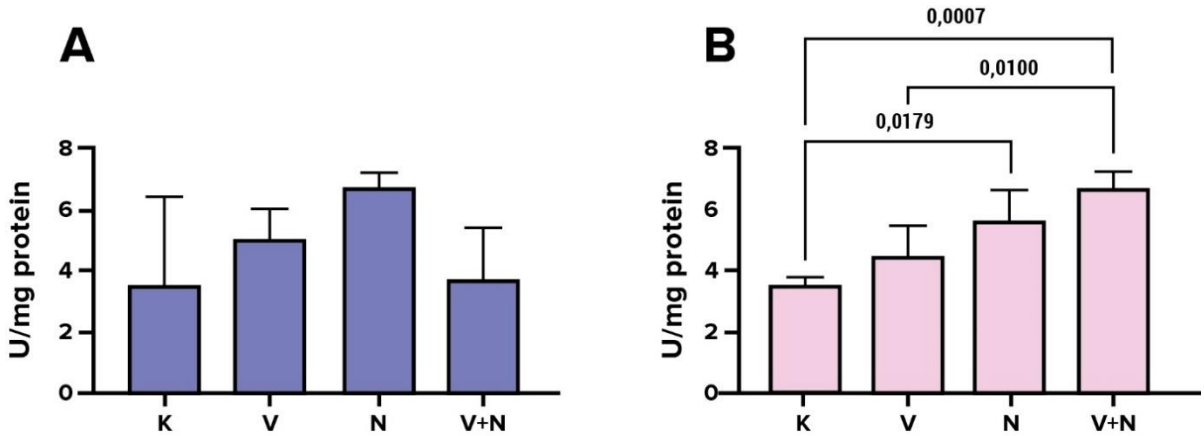
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 23), uočava se da je skupina tretirana naringinom imala statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje aktivnosti SOD-a u malom mozgu u odnosu na kontrolu. Nije bilo statistički značajnih ($p \leq 0,05$) povećanja u aktivnosti SOD-a između drugih tretiranih skupina i kontrole. Nije bilo statistički značajnih ($p \leq 0,05$) razlika u aktivnosti SOD-a između tretiranih skupina.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 24), ženke u skupini tretiranom naringinom i kombinacijom valproata i naringina imale su statistički značajno povećanje ($p \leq 0,05$) u aktivnosti SOD-a u malom mozgu.

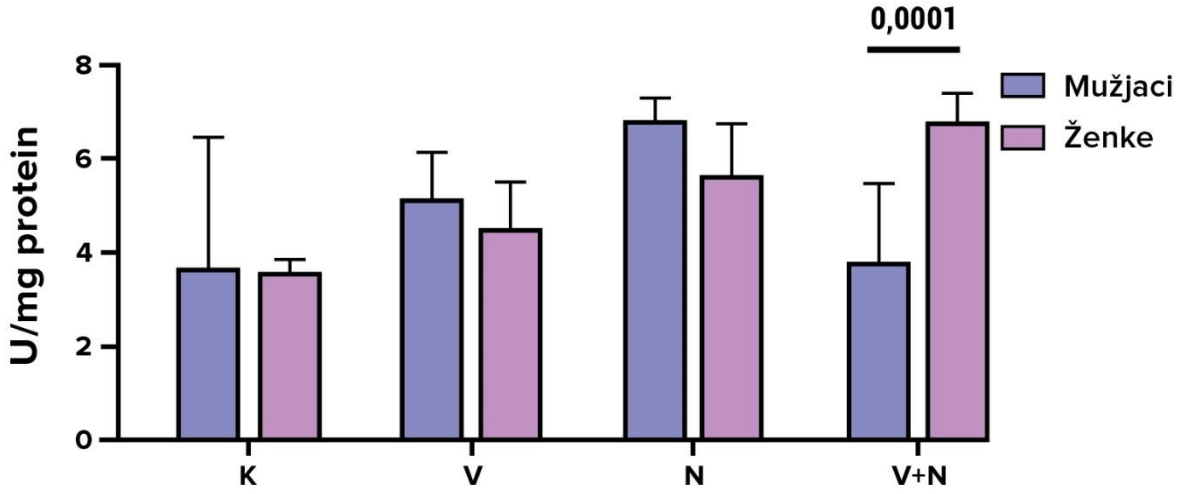
Usporedbom između spolova (slika 25), ženke u skupini tretirane kombinacijom valproata i naringina imale su statistički značajno povećanje ($p \leq 0,05$) u aktivnosti SOD-a u malom mozgu u odnosu na mužjake u istoj skupini.



Slika 23. Aktivnost SOD-a u malom mozgu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 24. Aktivnost SOD-a u malom mozgu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

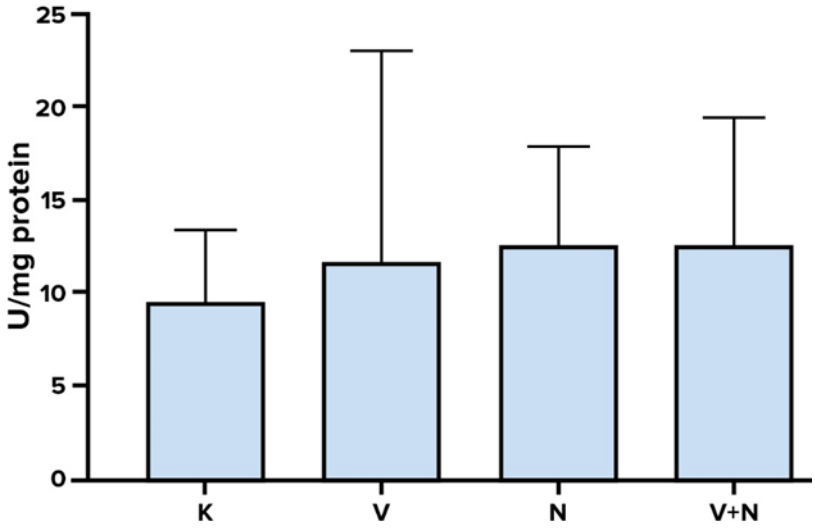


Slika 25. Aktivnost SOD-a u malom mozgu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

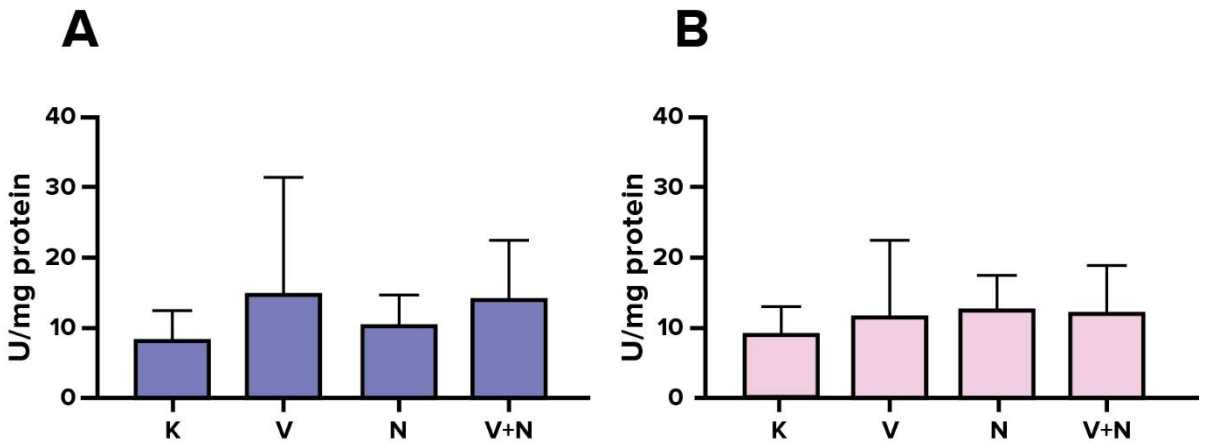
6.1.3 Aktivnost katalaze (CAT) u mozgu

Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 26), uočava se da nije bilo statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike u aktivnosti CAT-a u kori prednjeg režnja velikog mozga u svim tretiranim skupinama u odnosu na kontrolu, niti između tretiranih skupina.

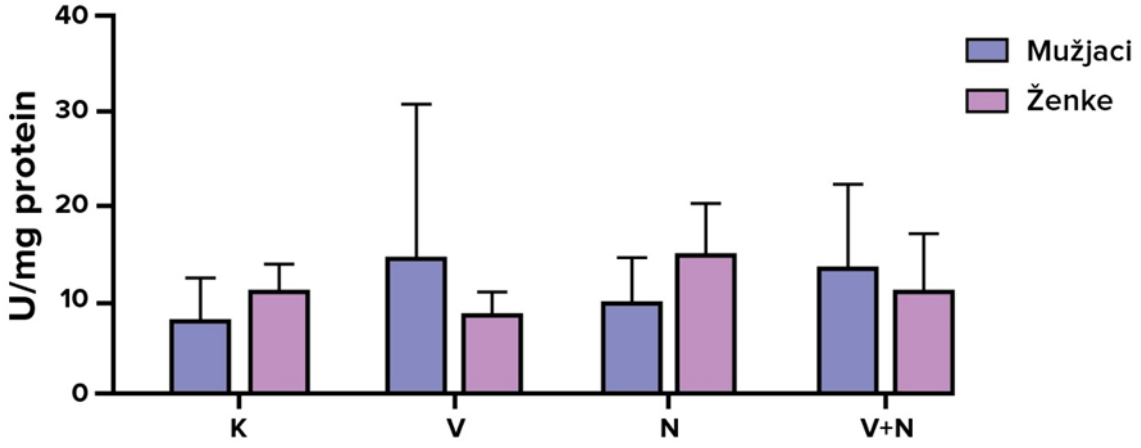
Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 27) i između spolova u svakoj tretiranoj skupini (slika 30) nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretiranih skupina, niti u mužjaka niti u ženki.



Slika 26. Aktivnost CAT-a u kori prednjeg režnja velikog mozga; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



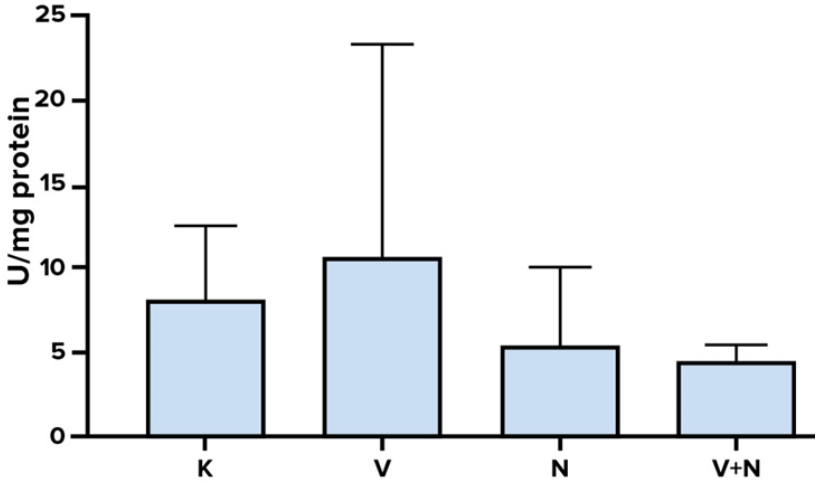
Slika 27. Aktivnost CAT-a u kori prednjeg režnja velikog mozga mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



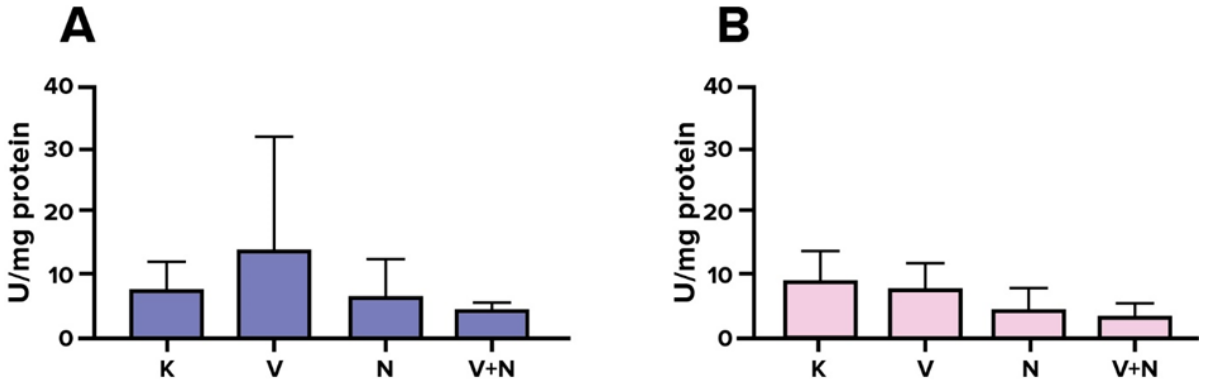
Slika 28. Aktivnost CAT-a u kori prednjeg režnja velikog mozga; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite

Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 29), uočava se da nije bilo statistički značajnog ($p \leq 0,05$) povećanja aktivnosti CAT-a u kori središnjeg dijela velikog mozga u odnosu na kontrolu, niti između tretiranih skupina.

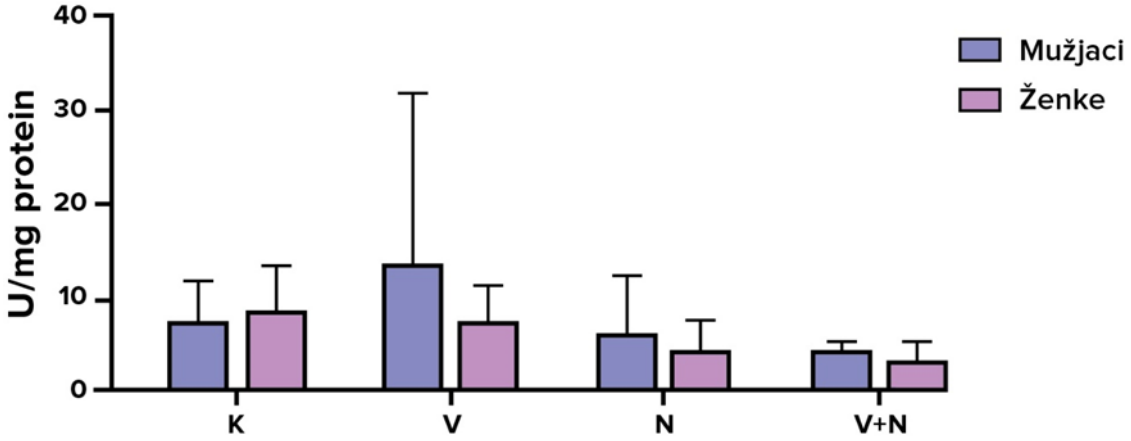
Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 30), i između spolova u svakoj tretiranoj skupini (slika 31), uočava se da nije bilo statistički značajnog ($p \leq 0,05$) povećanja aktivnosti CAT-a u kori središnjeg dijela velikog mozga u odnosu na spol životinja u svim tretiranim skupinama.



Slika 29. Aktivnost CAT-a u kori središnjeg dijela velikog mozga; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 30. Aktivnost CAT-a u kori središnjeg dijela velikog mozga mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

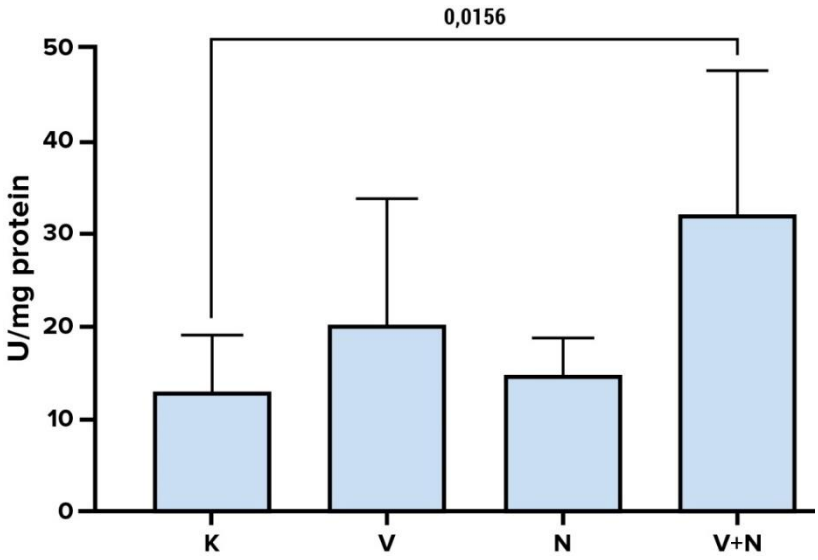


Slika 31. Aktivnost CAT-a u kori središnjeg dijela velikog mozga; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

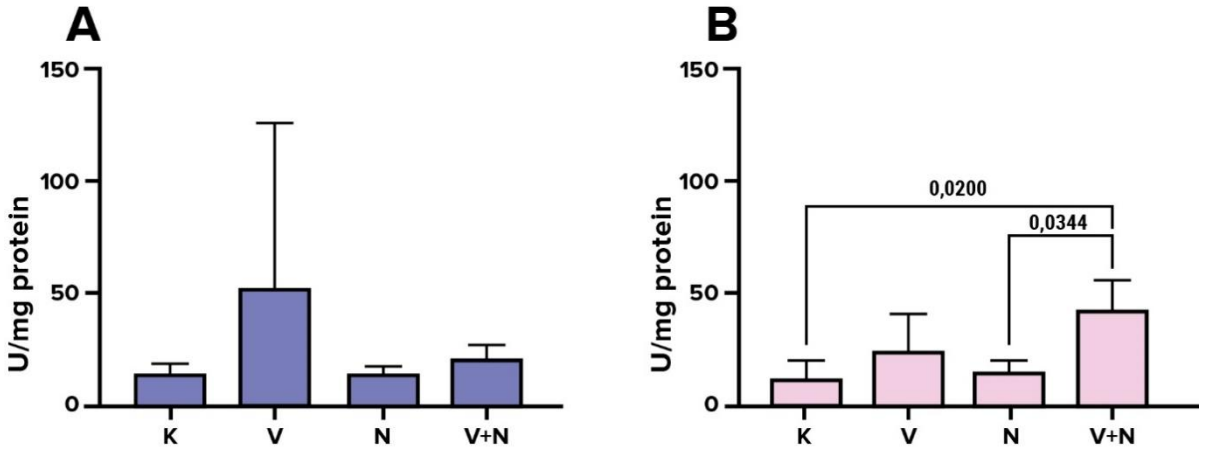
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno u malom mozgu pokusnih životinja (slika 32), uočava se da je aktivnost katalaze bila statistički značajno ($p \leq 0,05$) povišena u skupini tretiranoj kombinacijom valproata i naringina u odnosu na zaseban tretman valproatom.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 33), uočava se da ovaj trend statistički značajnog povećanja ($p \leq 0,05$) katalaze uslijed združenog djelovanja valproata i naringina samo u malom mozgu ženki.

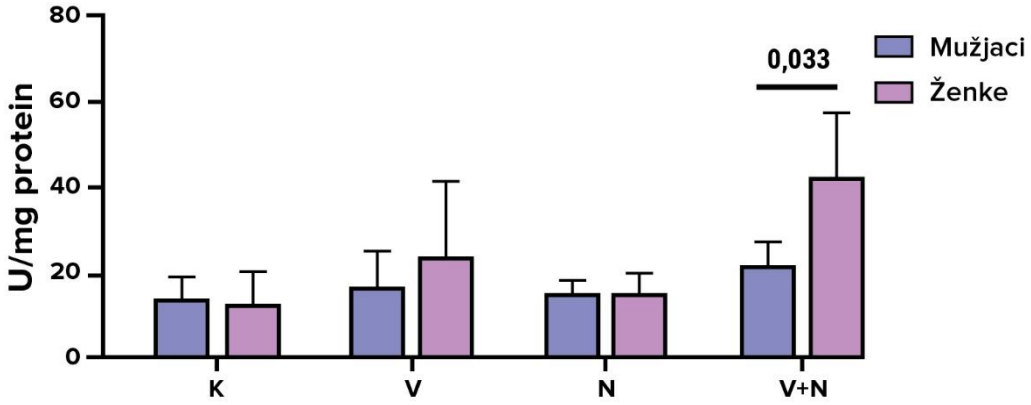
Analizom između spolova u svakoj tretiranoj skupini (slika 34), uočava se da je aktivnost katalaze u malom mozgu bila statistički značajno ($p \leq 0,05$) povišena u ženki tretiranih kombinacijom valproata i naringina u usporedbi s mužjacima iste skupine. U drugim skupinama uključujući i kontrolnu nije bilo statistički značajne razlike.



Slika 32. Aktivnost CAT-a u malom mozgu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



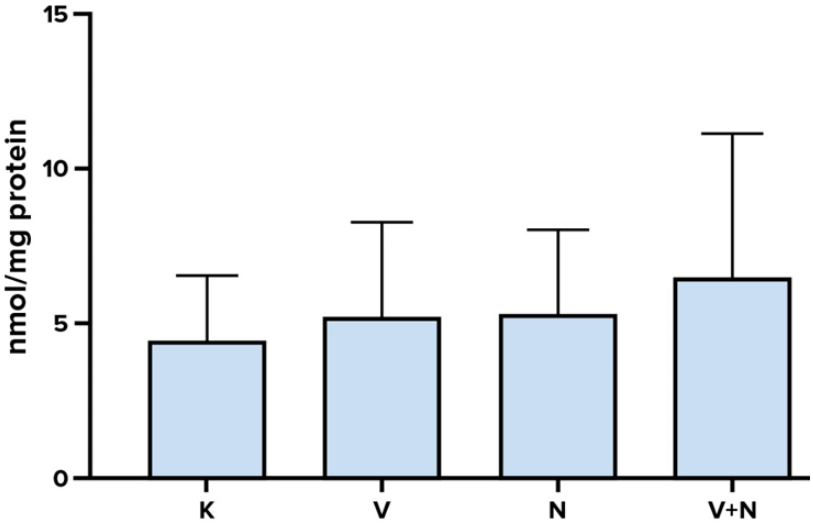
Slika 33. Aktivnost CAT-a u malom mozgu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 34. Aktivnost CAT-a u malom mozgu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

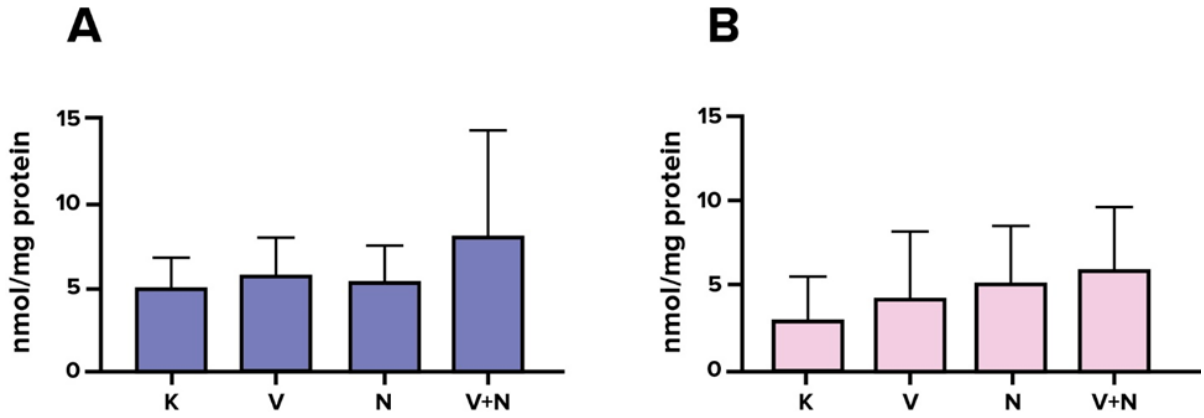
6.1.4 Reducirani glutation (GSH) u mozgu

Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 35), koncentracija GSH-a u kori prednjeg djela velikog mozga nije statistički značajno ($p \leq 0,05$) promijenjena u svim tretiranim skupinama u odnosu na kontrolu, niti između tretiranih skupina. Analizom između spolova u svakoj tretiranoj skupini (slika 36) i između spolova (slika 37), nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) između skupina.

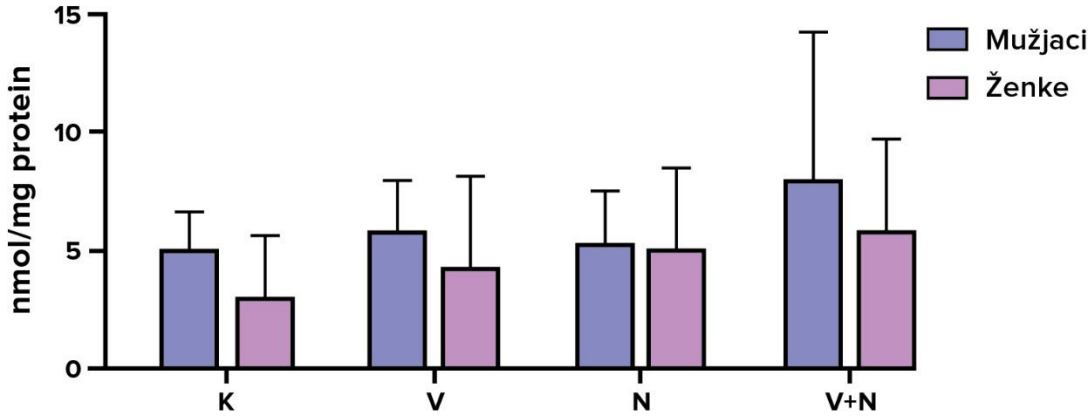


Slika 35. Koncentracija GSH-a u kori prednjeg režnja velikog mozga; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

.



Slika 36. Koncentracija GSH-a u kori prednjeg režnja velikog mozga mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

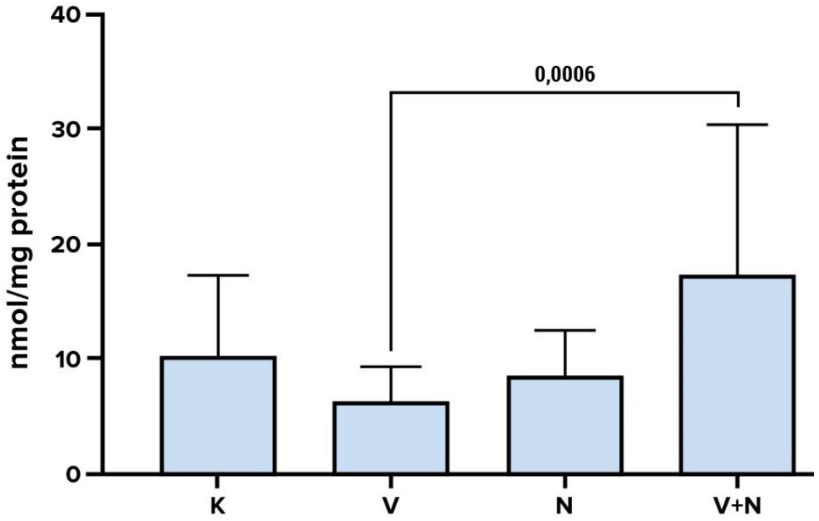


Slika 37. Koncentracija GSH-a u kori prednjeg režnja velikog mozga; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

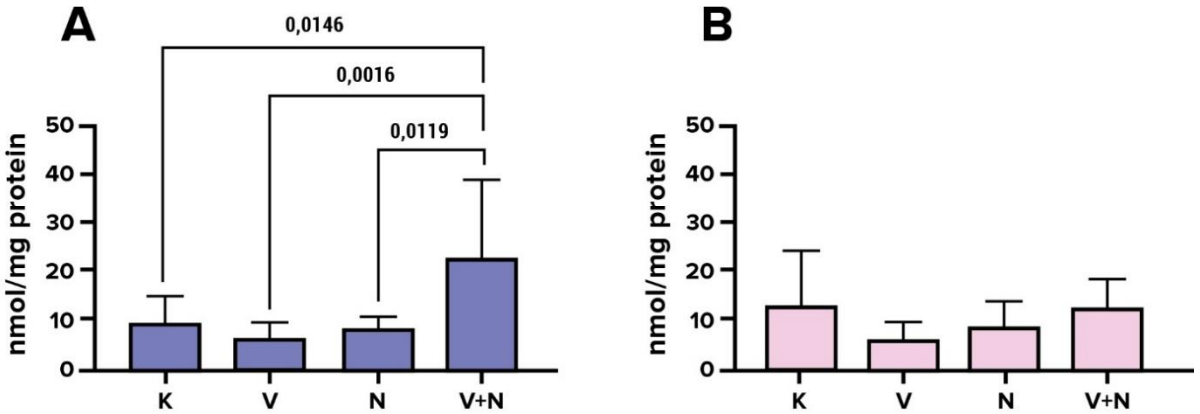
Koncentracija GSH-a u kori središnjeg djela velikog mozga (slika 38) statistički je značajno ($p \leq 0,05$) povišena u skupini združeno tretiranoj valproatom i naringinom u odnosu na skupinu tretiranoj valproatom.

Sličan trend pri kojem je koncentracija GSH-a u kori središnjeg dijela velikog mozga statistički značajno ($p \leq 0,05$) povišena je samo u mužjaka (slika 39), u analizi po spolovima.

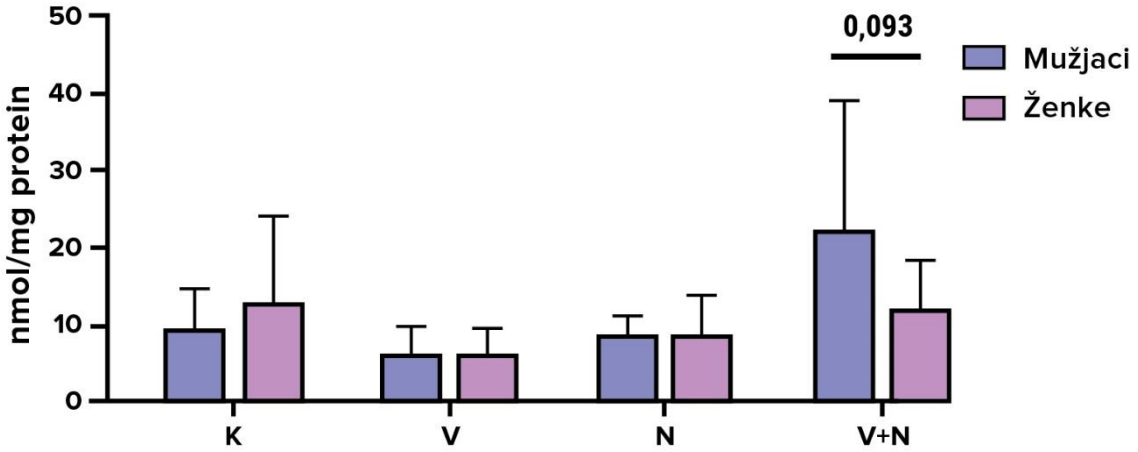
Mužjaci su imali statistički značajno ($p \leq 0,05$) viši GSH-a u odnosu na ženke u skupini tretirano kombinacijom valproata i naringina u analizi između spolova (slika 40). Nije bilo statistički značajnih razlika između spolova u drugim tretiranim skupinama uključujući i kontrolu.



Slika 38. Koncentracija GSH-a u kori središnjeg dijela velikog mozga; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 39. Koncentracija GSH-a u kori središnjeg dijela velikog mozga mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

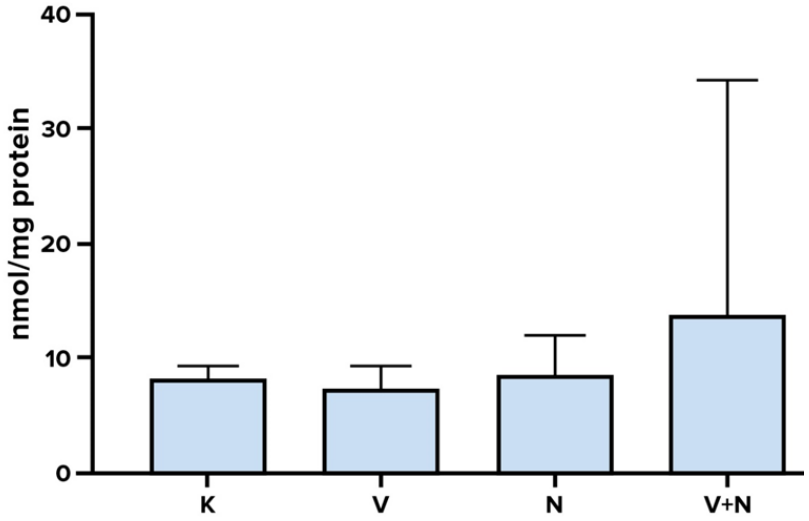


Slika 40. Koncentracija GSH-a u kori središnjeg dijela velikog mozga; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

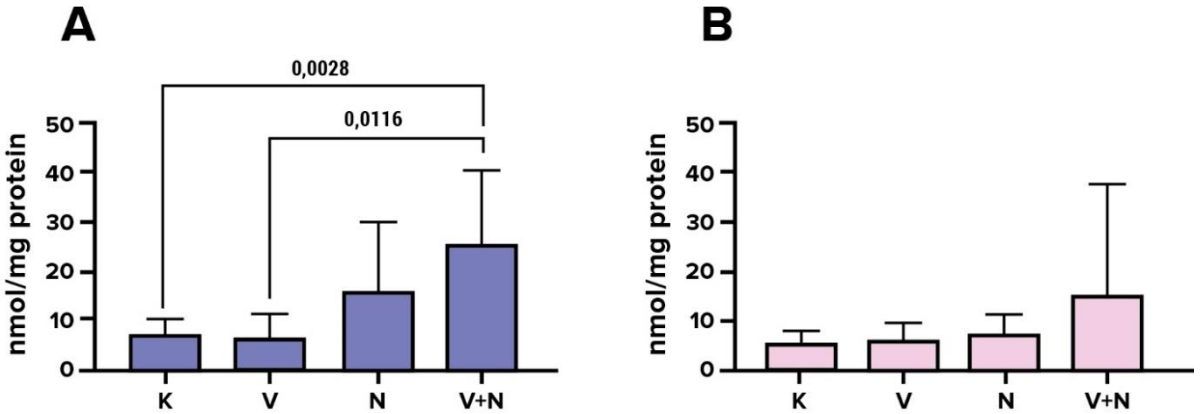
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 41), nisu uočene razlike u koncentraciji GSH-a između skupina u malom mozgu.

Zasebnom analizom po spolovima (slika 42) samo u ženki nisu uočene statističke razlike između skupina, no u mužjaka je skupina tretirana kombinacijom valproata i naringina pokazala statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje GSH-a u malom mozgu u kontrolnoj skupini i u skupini tretiranoj valproatom.

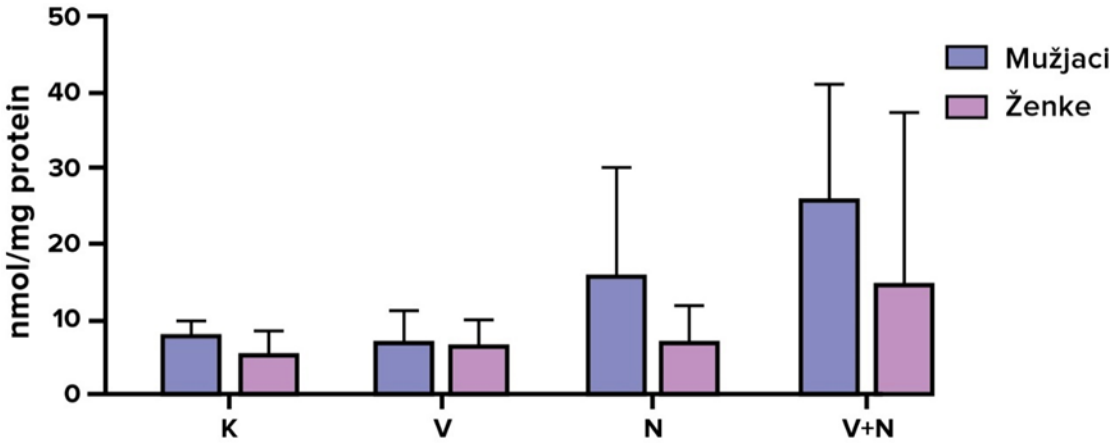
Između mužjaka i ženski (slika 43) nije bilo statistički značajnih ($p \leq 0,05$) razlika u koncentraciji GSH-a malog mozga između spolova u svim tretiranim skupinama uključujući i kontrolnu skupinu.



Slika 41. Koncentracija GSH-a u malom mozgu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 42. Koncentracija GSH-a u malom mozgu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

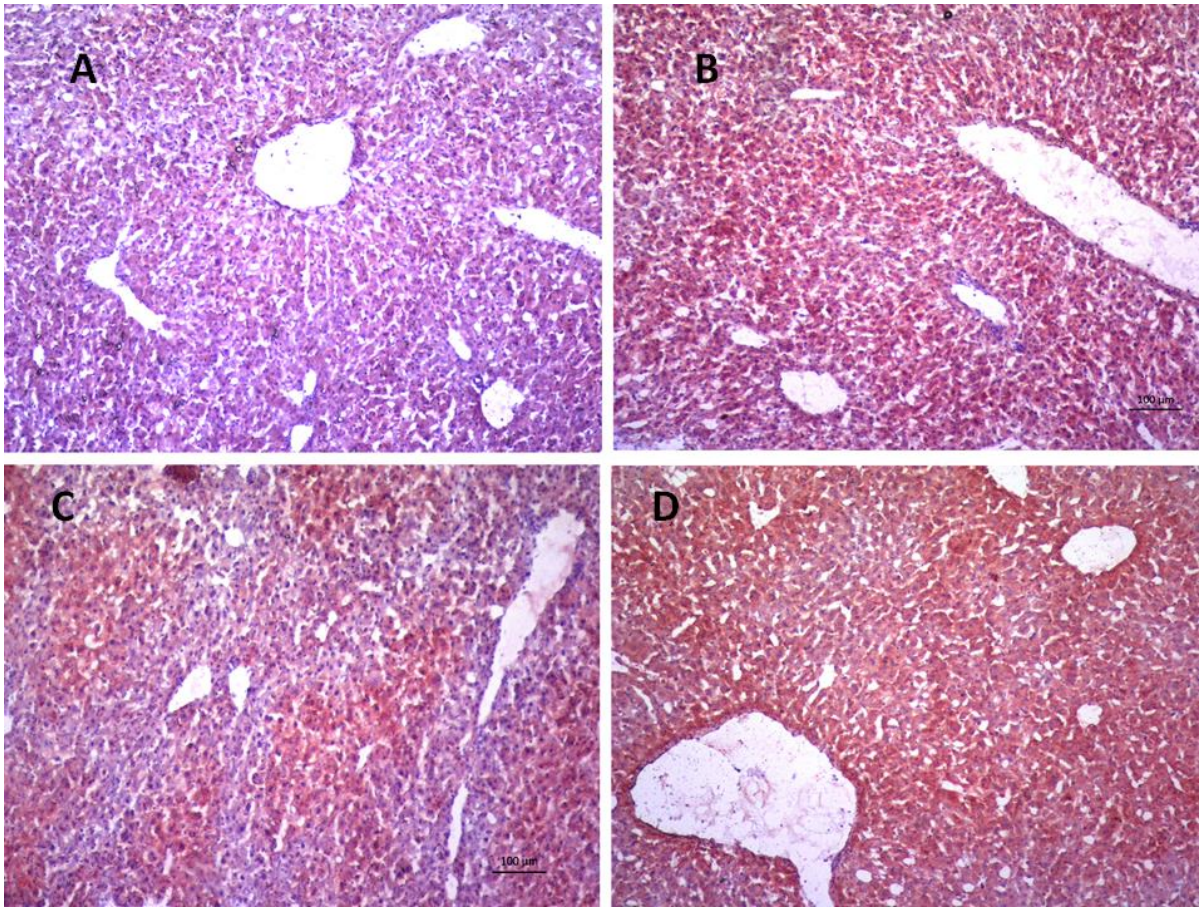


Slika 43. Koncentracija GSH-a u malom mozgu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2 *Promjene u jetri pokusnih životinja*

6.2.1 Nakupljanje lipida u hepatocitima

U tkivu jetre (slika 44), histološka analiza Oil red O bojom, otkrila je da su hepatociti akumulirali lipide. Valproat i naringin uzrokuju mikrovezikularnu steatozu u hepatocitima jetre.



Slika 44. Steatoza u hepatocitima; pokazatelj razina lipidne akumulacije u jetri: A) K – kontrolna skupina, B) V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), C) N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), D) V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana.

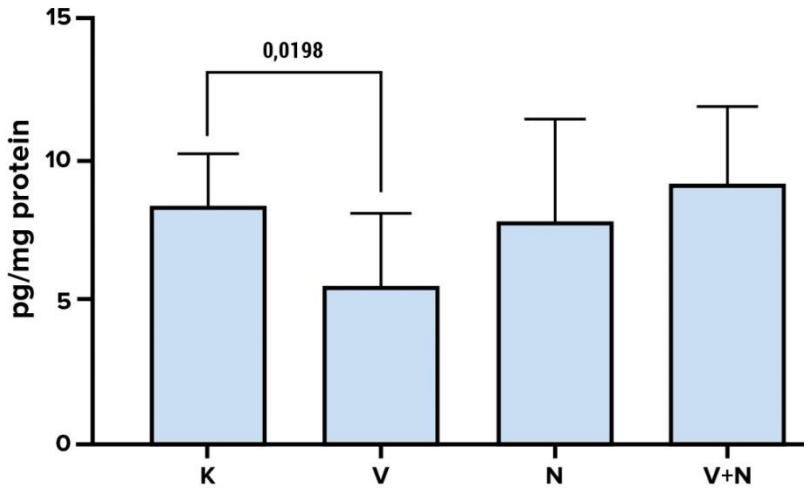
Mikrovezikularna steatoza uočena je u svim pokusnim skupinama. U određenoj mjeri najveća količina crvene boje, koja je indikator nakupljenih lipida, bila je raspoređena u jetri tretiranoj valproatom, dok su u skupini izloženoj naringinu i skupini koja je uzimala valproat i naringin postojala područja i lobuli hepatocita koji nisu obojeni u crveno, što ukazuje na dispergiranu i vjerojatno nižu steatozu u skupinama naringin te valproat i naringin .

6.2.2 Transkripcijski faktor PPARGC1α u jetri

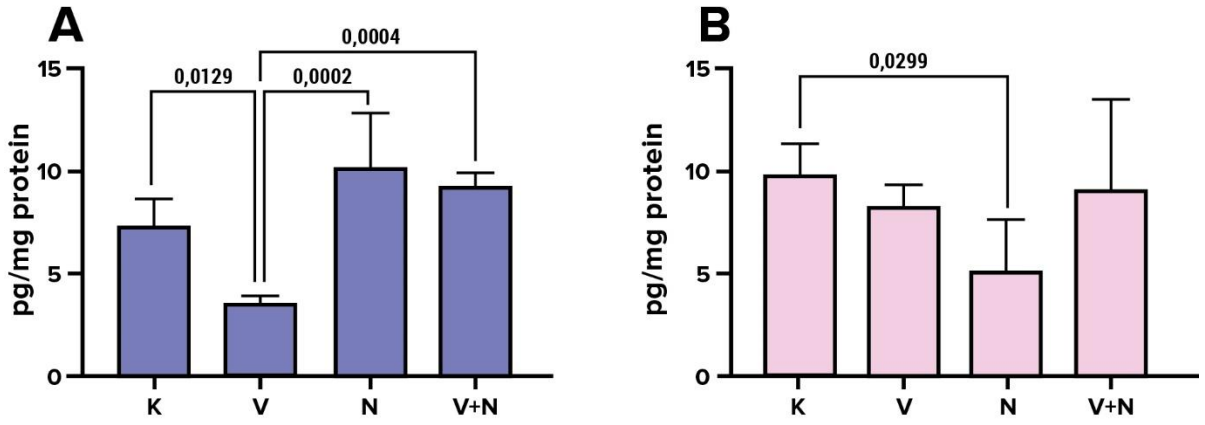
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 45), utvrđeno je da se koncentracija PPARGC1α u jetri, statistički značajno ($p \leq 0,05$) smanjuje nakon tretmana valproatom u odnosu na kontrolu. Drugih statističkih značajnih razlika nije bilo.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 46), uočeno je da se aktivnost PPARGC1α u jetri mužjaka statistički značajno ($p \leq 0,05$) smanjuje u skupini tretiranoj valproatom u odnosu na ostale skupine, dok u ženki naringin, blago ali statistički značajno ($p \leq 0,05$) smanjuje koncentraciju ovog transkripcijskog faktora.

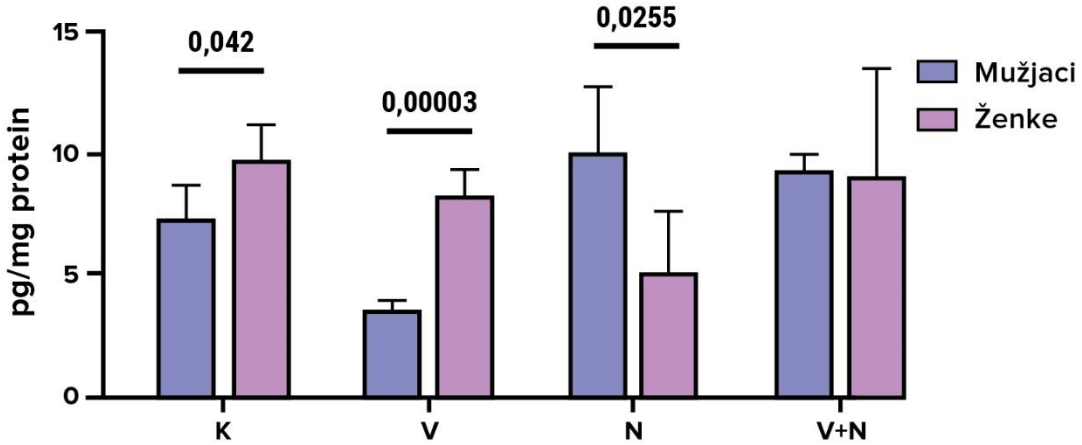
Analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 47), uočena je značajna ($p \leq 0,05$) razlika u skupini tretiranoj valproatom, gdje su mužjaci imali izraženije nižu koncentraciju ovog transkripcijskog faktora, a u skupini tretiranoj naringinom ženke su imale značajnije manju koncentraciju ($p \leq 0,05$) od mužjaka.



Slika 45. Koncentracija transkripcijskog faktora PPARGC1α u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 46. Koncentracija transkripcijskog faktora PPARGC1α u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



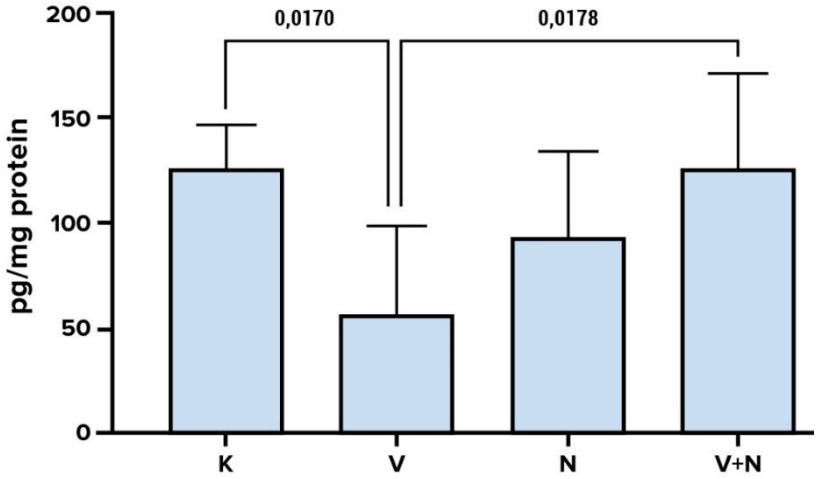
Slika 47. Koncentracija PPARGC1α u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2.3 Transkripcijski faktor PPARα u jetri

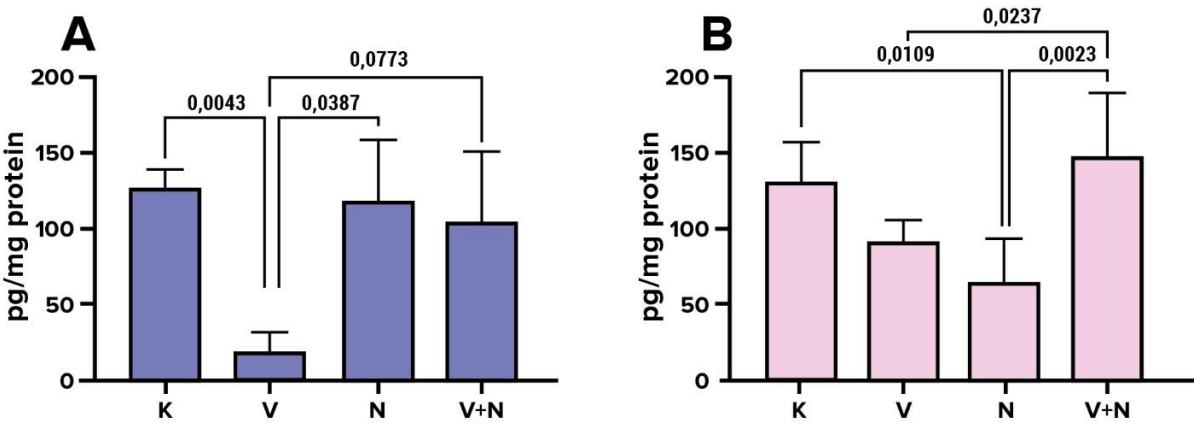
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 48), utvrđeno je da se koncentracija PPARα u jetri statistički značajno ($p \leq 0,05$) smanjuje nakon tretmana valproatom u odnosu na kontrolu i u odnosu na skupinu združeno tretiranu valproatom i naringinom.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 49), uočeno je da se koncentracija PPARα u jetri, u mužjaka statistički značajno ($p \leq 0,05$) smanjuje u skupini tretiranoj valproatom u odnosu na ostale skupine. U ženki se posebice ističe da je naringin u jetri značajno ($p \leq 0,05$) smanjio količinu ovog transkripcijskog faktora.

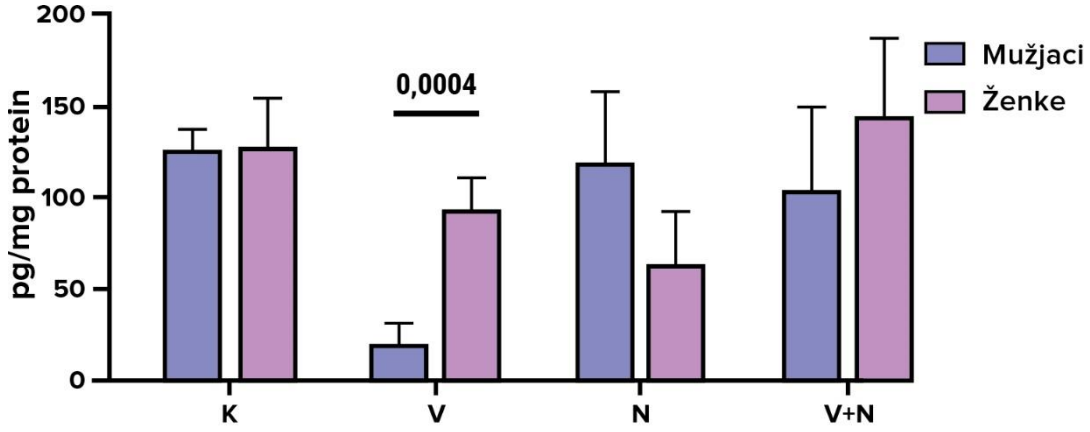
Analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 50), utvrđeno je da između mužjaka i ženki postoji značajna ($p \leq 0,05$) razlika u skupini tretiranoj valproatom, gdje su mužjaci imali izraženije nižu koncentraciju ovog transkripcijskog faktora od ženki. U ostalim skupinama nije bilo značajnih razlika između spolova.



Slika 48. Koncentracija PPARα u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 49. Koncentracija PPARα u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



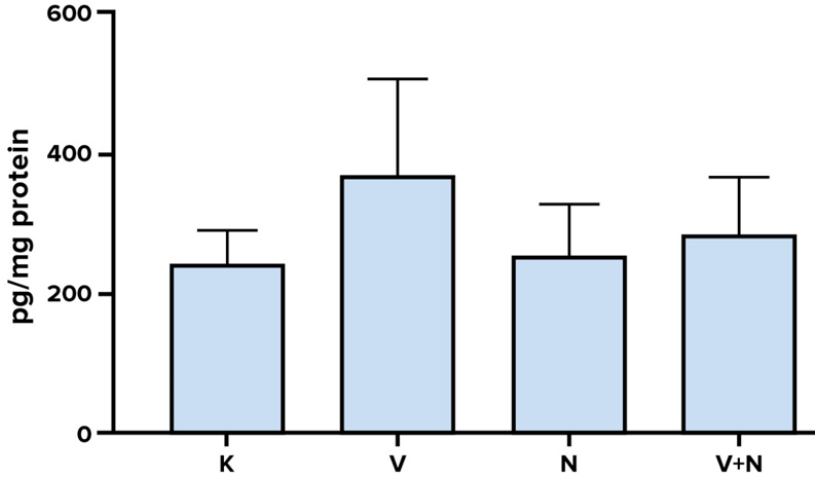
Slika 50. Koncentracija PPARα u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2.4 Enzim ACOX1 u jetri

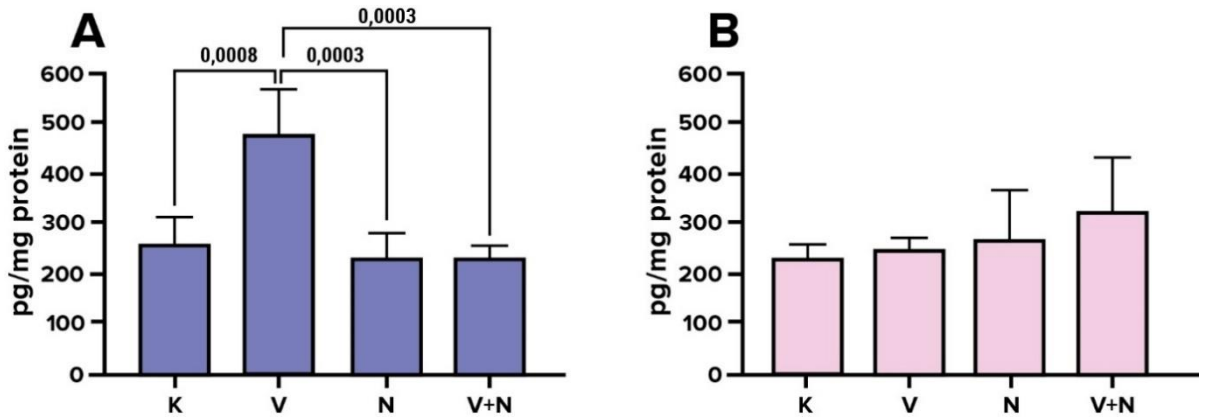
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 51), utvrđeno je da se aktivnost peroksisomalnog enzima acetil CoA oksidaze 1 (ACOX1), koji oksidira lipide u jetri, nije statistički značajno ($p \leq 0,05$) promijenila.

Međutim, detaljnijom analizom rezultata posebno po spolovima (slika 52), uočeno je da se aktivnost ACOX1 enzima u jetri, u mužjaka zasebno, statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećala u mužjaka tretiranih valproatom u odnosu na ostale skupine. U ženki nisu zabilježene značajne promjene ACOX1 enzima u jetri ni u jednoj skupini.

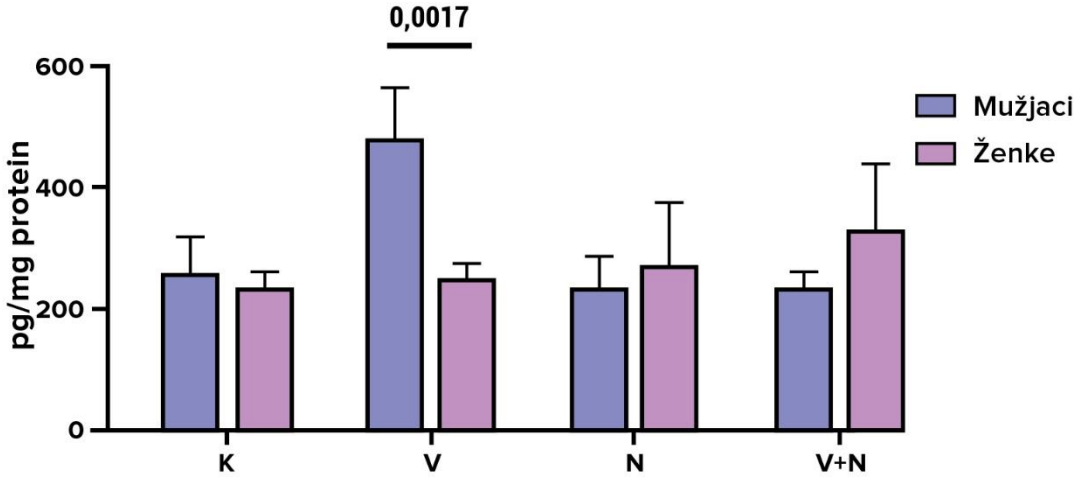
Analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 53), utvrđena je značajna ($p \leq 0,05$) razlika u skupini tretiranoj valproatom, gdje su mužjaci imali izraženije višu koncentraciju ACOX1 enzima od ženki. U ostalim skupinama nije bilo značajnih razlika između spolova.



Slika 51. Koncentracija ACOX1 enzima u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



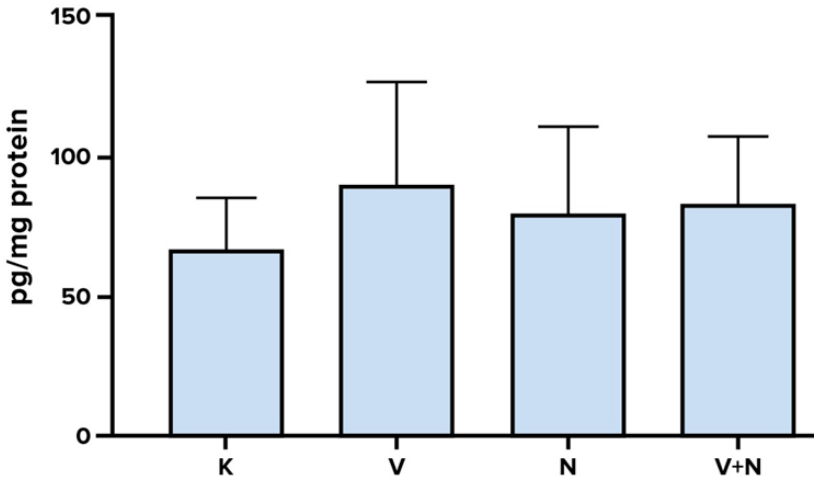
Slika 52. Koncentracija ACOX1 enzima u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



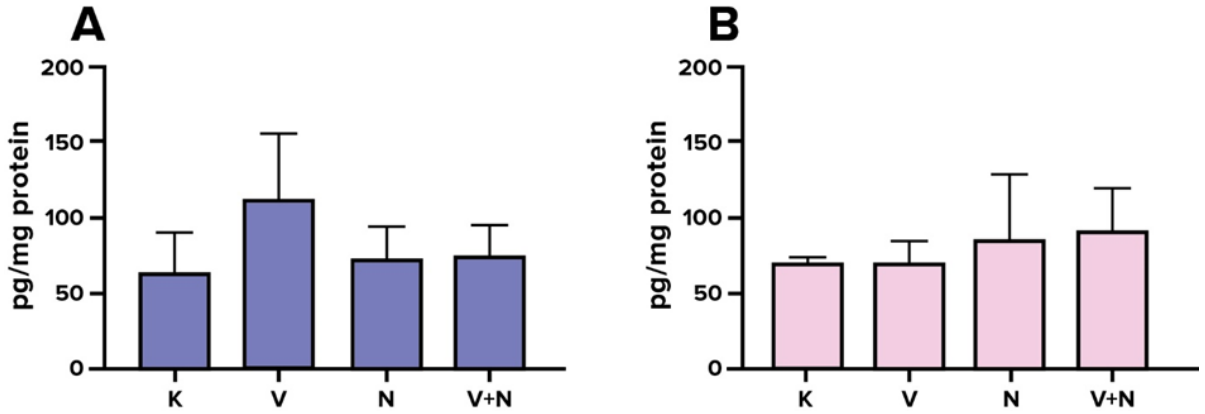
Slika 53. Koncentracija ACOX1 enzima u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2.5 Transkripcijski faktor NFE2R u jetri

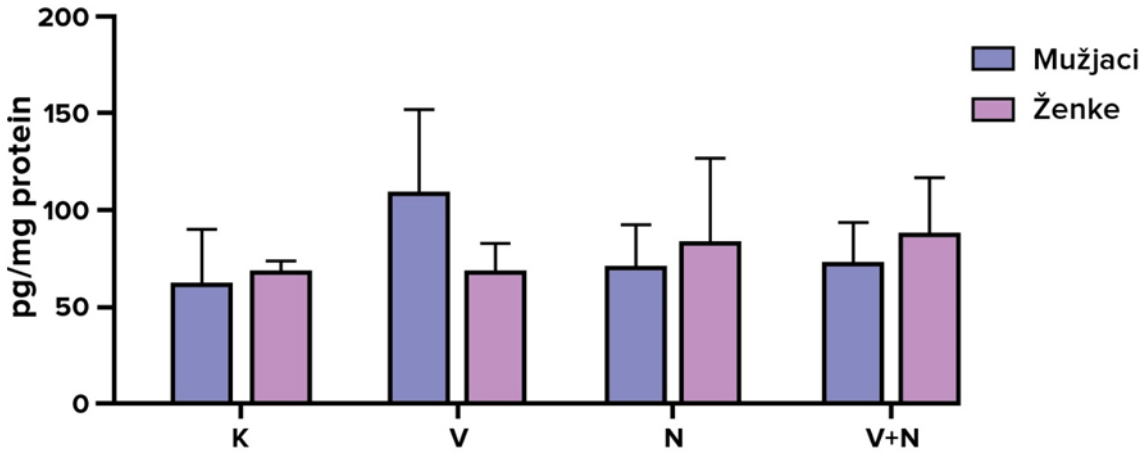
Nisu zabilježene statistički značajne razlike u koncentraciji transkripcijskog faktora NFE2R (slika 54). Nije bilo statistički značajnih razlika ni između spolova (slika 55 i 56).



Slika 54. Transkripcijski faktor NFE2R u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 55. Transkripcijski faktor NFE2R u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



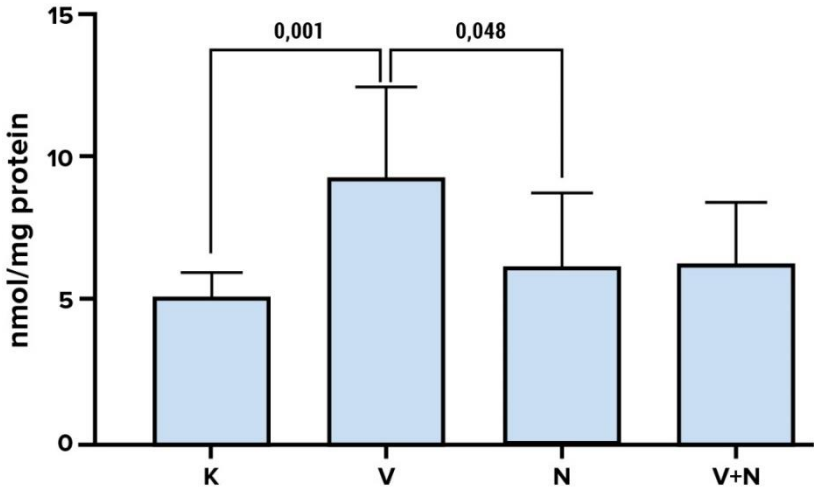
Slika 56. Transkripcijski faktor NFE2R u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2.6 Lipidna peroksidacija (MDA) u jetri

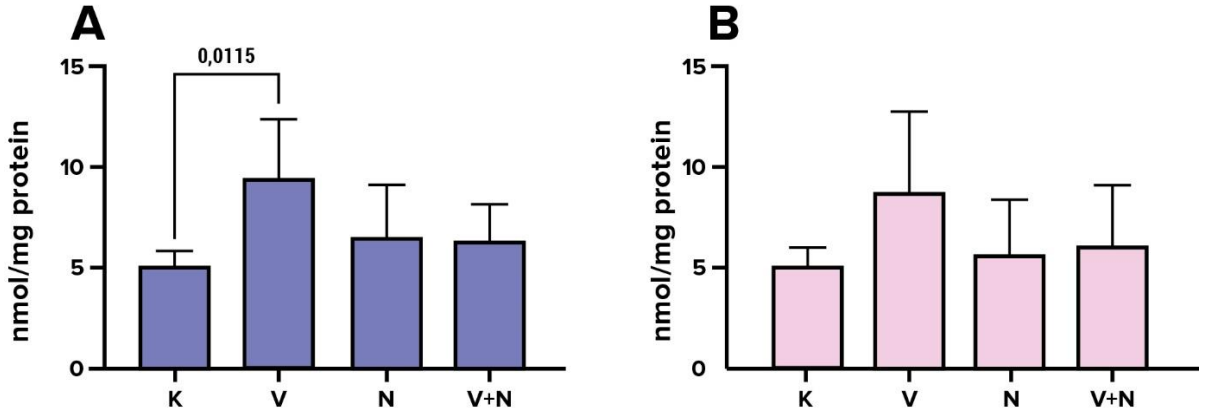
U jetri pokusnih životinja, analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 57), uočava se da je došlo do statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike u povećanju koncentracije MDA između skupine tretirane valproatom i kontrolne skupine te skupine tretirane naringinom. Nije bilo statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike između drugih tretiranih skupina, niti između njih i kontrolne skupine.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 58), ovaj trend se jasno uočava u mužjaka gdje je postojala slična statistički značajna razlika skupine tretirane valproatom u odnosu na netretiranu skupinu. U ženki se uočava sličan trend, ali nije bilo statistički značajnih razlika između skupina zbog raspona i varijabilnosti između jedinki u valproatnoj grupi.

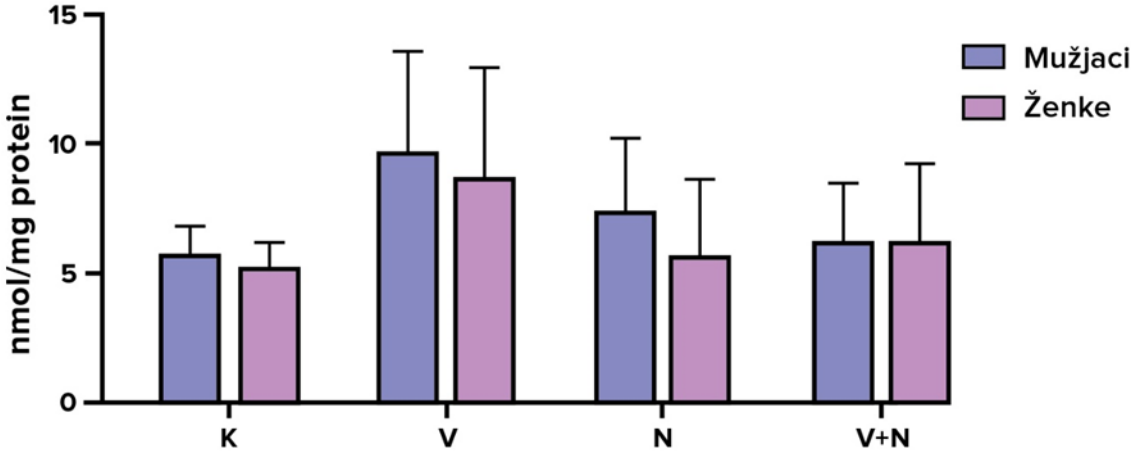
Analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 59), uočava se da nije bilo statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike u peroksidaciji lipida između spolova u svim tretiranim skupinama, uključujući i kontrolu.



Slika 57. Koncentracija MDA u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 58. Koncentracija MDA u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



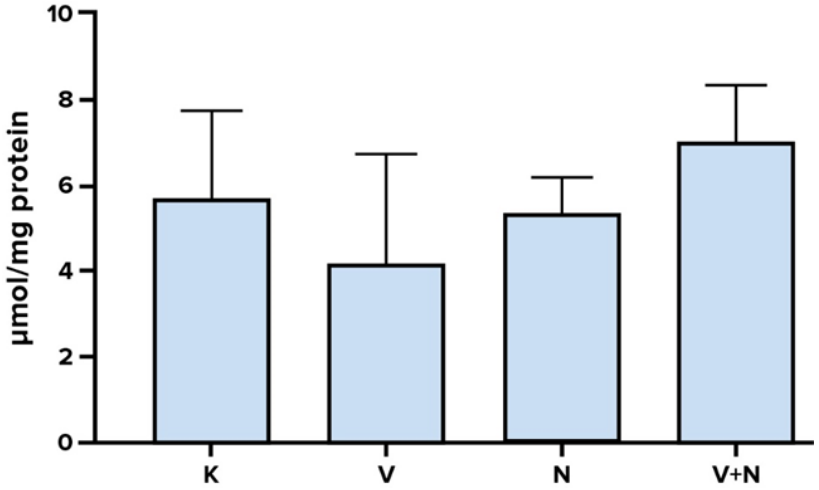
Slika 59. Koncentracija MDA u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2.7 Karbonilirani proteini u jetri

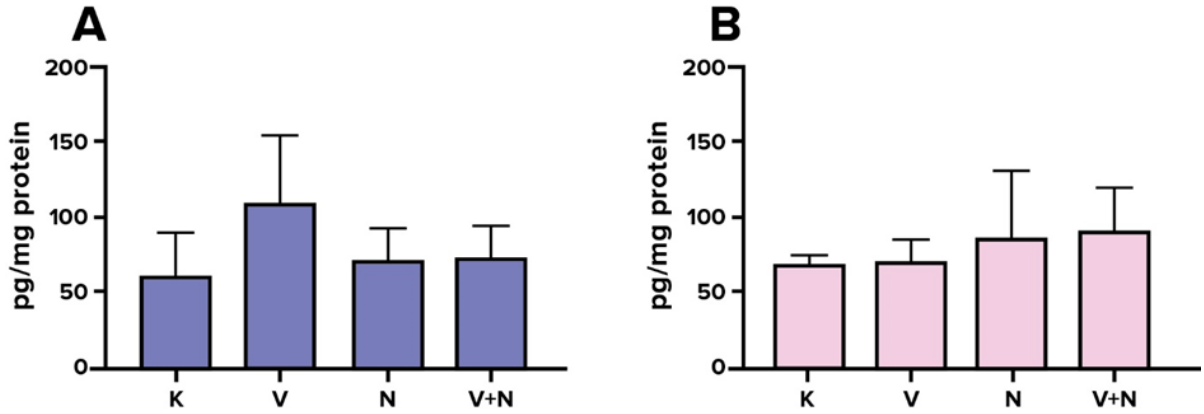
U jetri pokusnih životinja, analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 60), uočava se da nema statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike u oštećenju proteina karbonilacijom između skupina

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 61) nije postojala statistički značajna razlika ni u mužjaka ni u ženki.

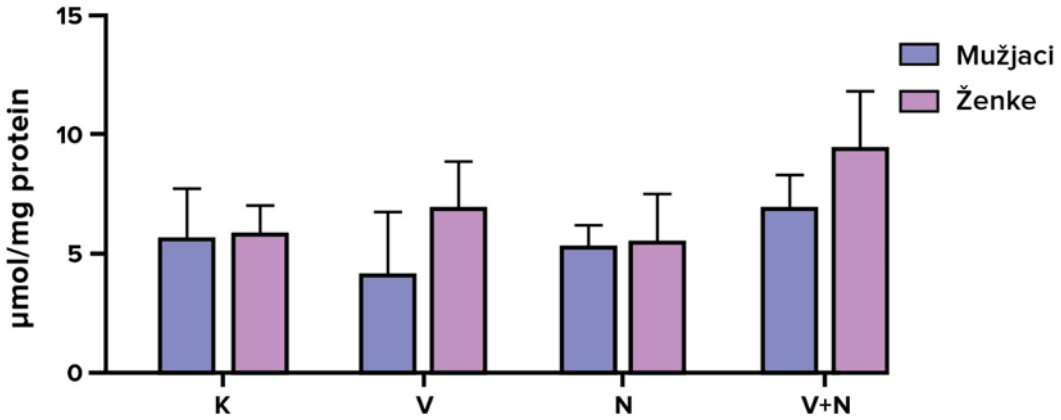
Analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 62), uočava se da nije bilo statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike u karbonilaciji proteina između spolova u svim tretiranim skupinama.



Slika 60. Koncentracija karboniliranih proteina u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 61. Koncentracija karboniliranih proteina u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



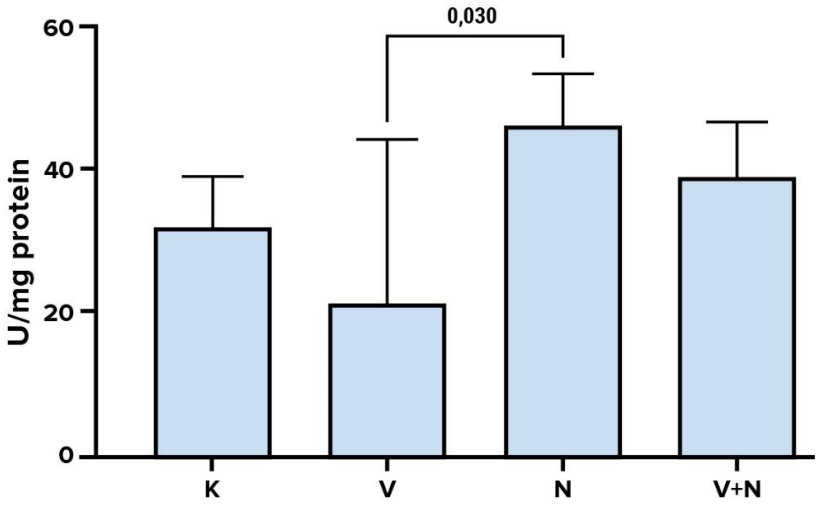
Slika 62. Koncentracija karboniliranih proteina u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2.8 Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u jetri

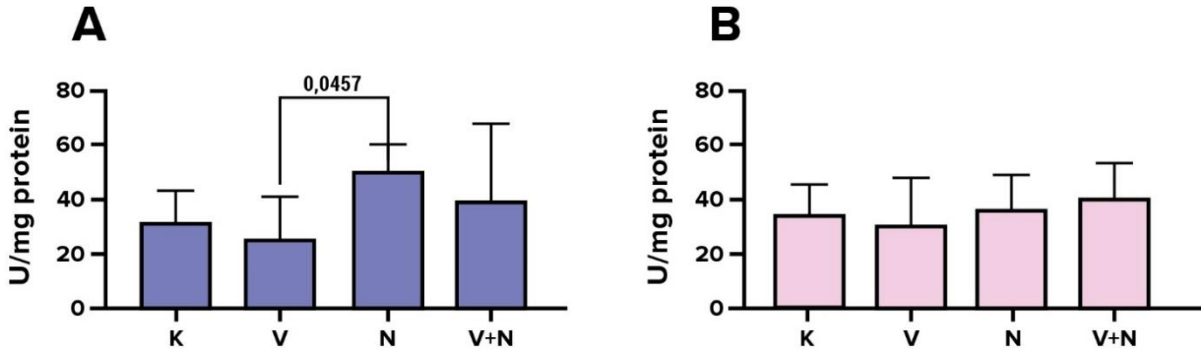
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 63), zabilježena je statistički značajna ($p \leq 0,05$) razlika aktivnosti SOD-a u jetri između skupine tretirane valproatom i skupine tretirane naringinom, gdje naringin značajno povećava aktivnost SOD-a u jetri. Nije bilo drugih statistički značajnih razlika između skupina.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 64), uočava se da samo kod mužjaka naringin značajno povećava aktivnost SOD-a u jetri u odnosu na valproat.

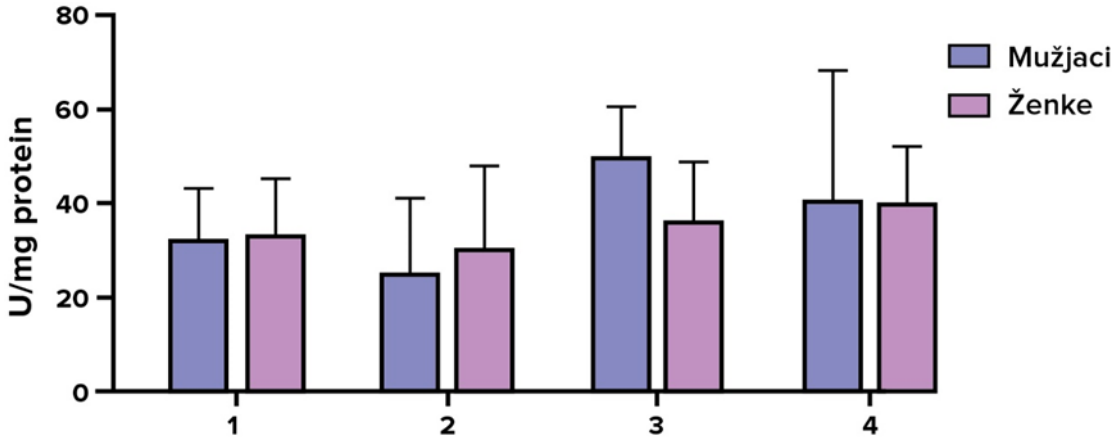
Analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 65), uočava se da nije bilo statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike u aktivnosti SOD-a u jetri između spolova u svim tretiranim skupinama.



Slika 63. Aktivnost SOD-a u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 64. Aktivnost SOD-a u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



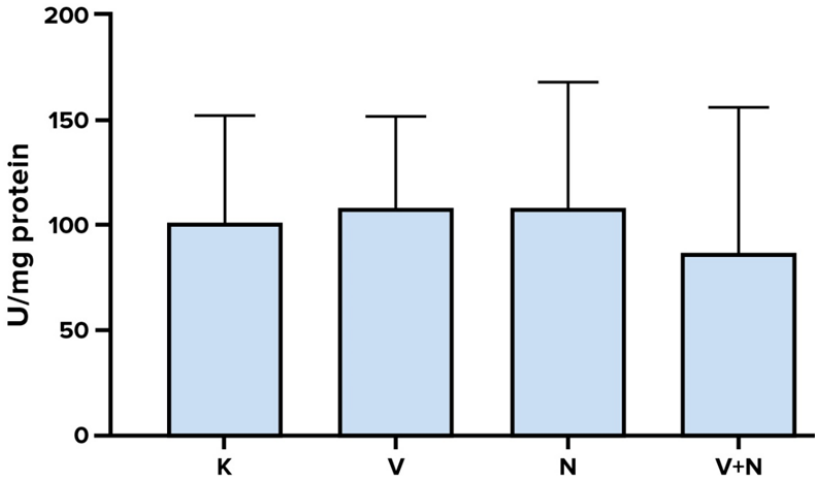
Slika 65. Aktivnost SOD-a u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2.9 Aktivnost katalaze (CAT) u jetri

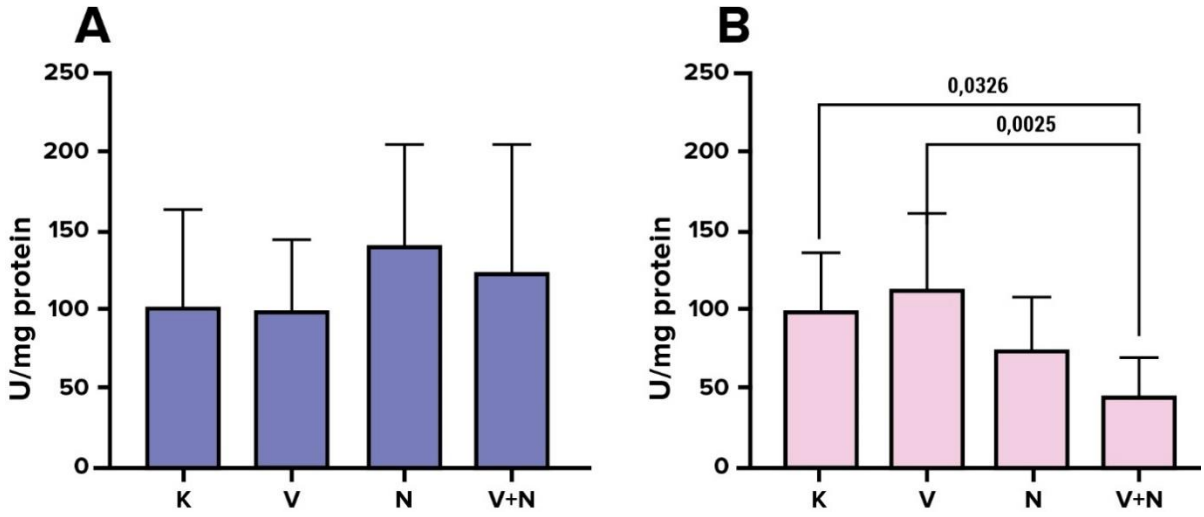
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 66), uočava se da nije bilo statistički značajnih ($p \leq 0,05$) razlika u aktivnosti CAT-a u jetri između skupina ili kontrole.

Međutim, analizom rezultata posebno po spolovima (slika 67), uočava se da je u ženki aktivnost CAT-a u jetri statistički značajno ($p \leq 0,05$) umanjena u skupini koja je dobivala valproat i naringin zajedno u odnosu na tretman valproatom i netretirane životinje.

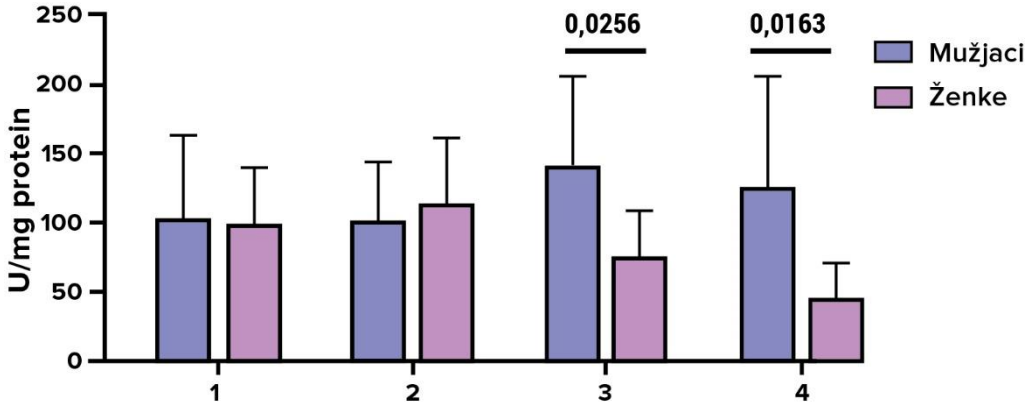
Analizom između skupina mužjaka i ženki (slika 68), zabilježene su statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) u aktivnosti CAT-a u jetri u skupini tretiranoj naringinom i kombinacijom valproata i naringina.



Slika 66. Aktivnost CAT-a u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



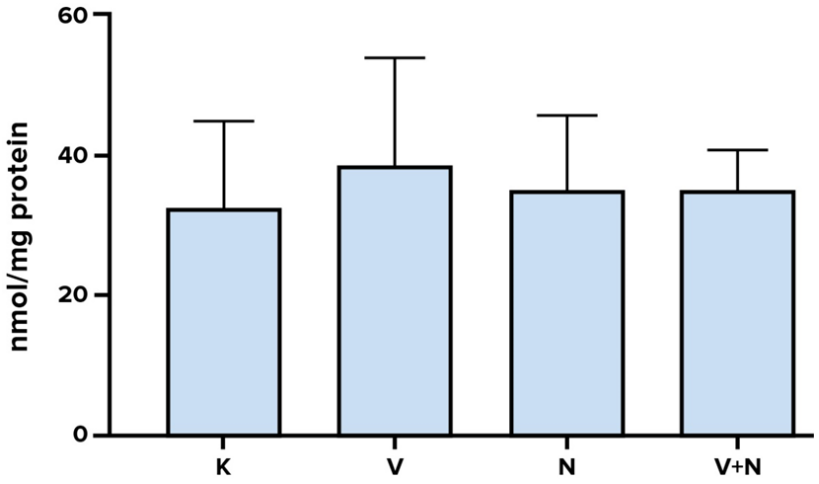
Slika 67. Aktivnost CAT-a u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



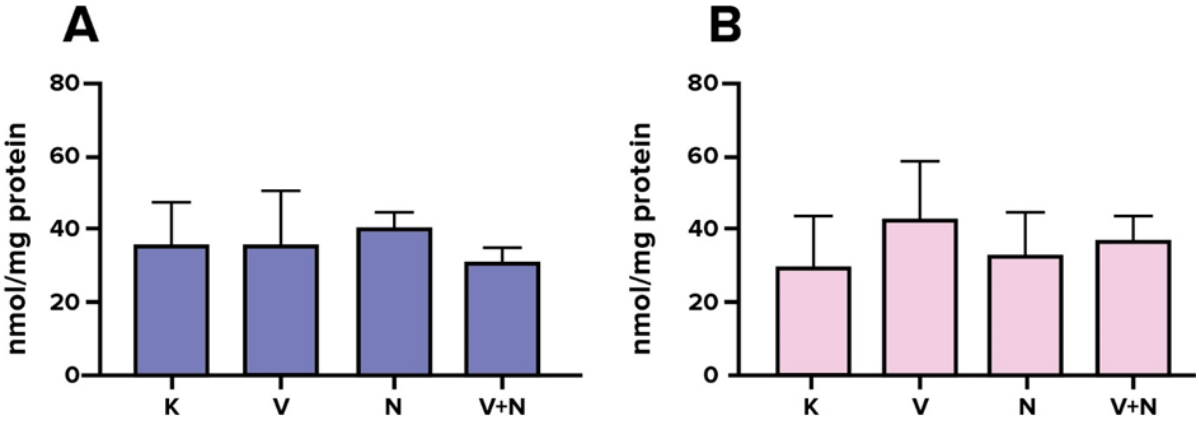
Slika 68. Aktivnost CAT-a u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.2.10 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u jetri

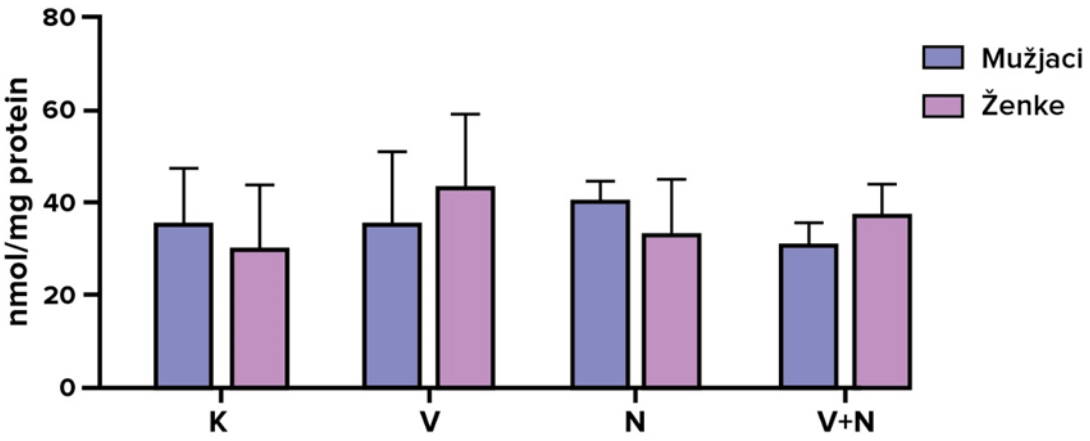
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 69), analizom rezultata posebno po spolovima (slika 70) i analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 71), uočava se da u jetri nije bilo statistički značajnih ($p \leq 0,05$) razlika u koncentraciji GSH-a između tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 69. Koncentracija GSH-a u jetri; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 70. Koncentracija GSH-a u jetri mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 71. Koncentracija GSH-a u jetri; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

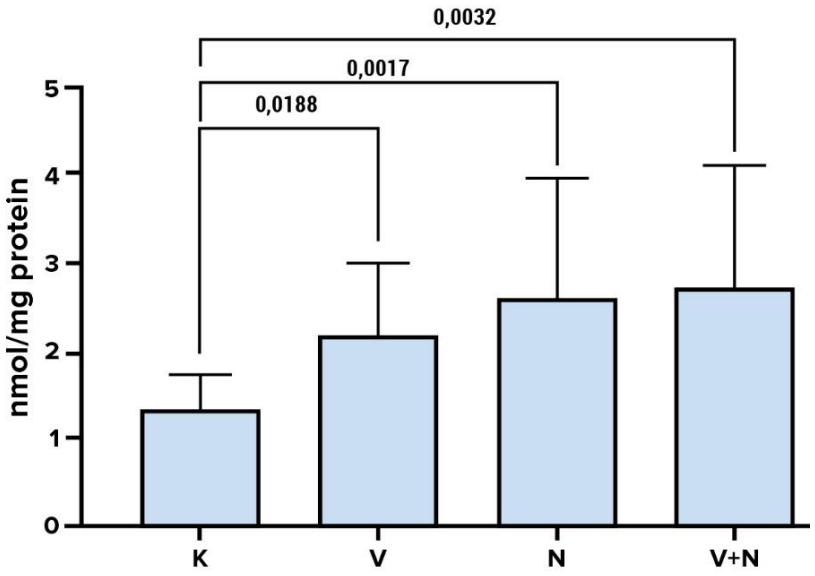
6.3 Pokazatelji oksidacijskog stresa u bubregu pokusnih životinja

6.3.1 Koncentracija malondialdehida (MDA) u bubregu

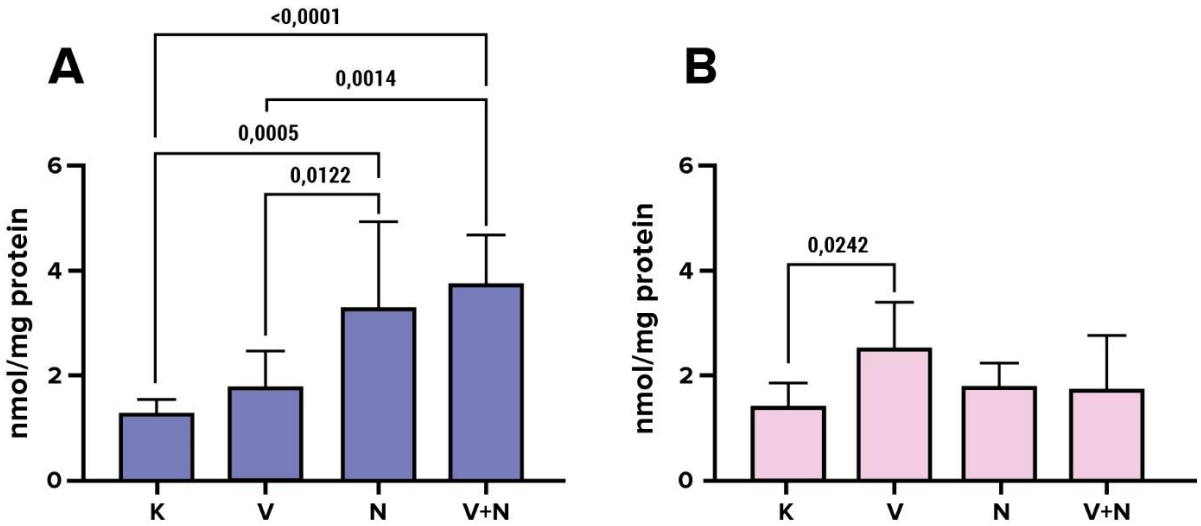
U bubregu, analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 72), zabilježeno je statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje lipidne peroksidacije u svim tretiranim skupinama u odnosu na kontrolu.

Analizom rezultata, posebno po spolovima (slika 73), uočava se da je taj trend prisutan u mužjaka, dok u ženki samo valproat uzrokuje značajno ($p \leq 0,05$) povećanje lipidne peroksidacije u bubregu u odnosu na kontrolu.

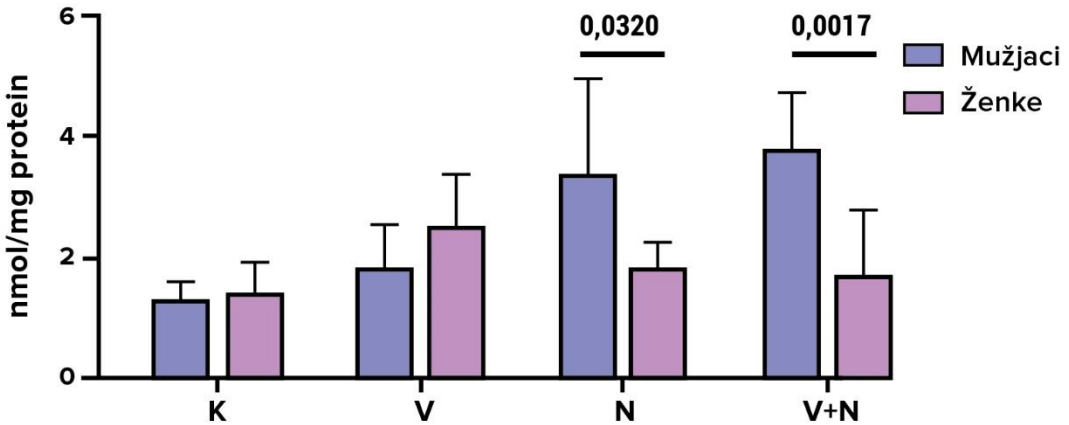
Analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 74), zabilježeno je statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje lipidne peroksidacije u bubregu mužjaka tretiranih naringinom i kombinacijom valproata i naringina u odnosu na ženke.



Slika 72. Koncentracija MDA u bubregu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 73. Koncentracija MDA mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



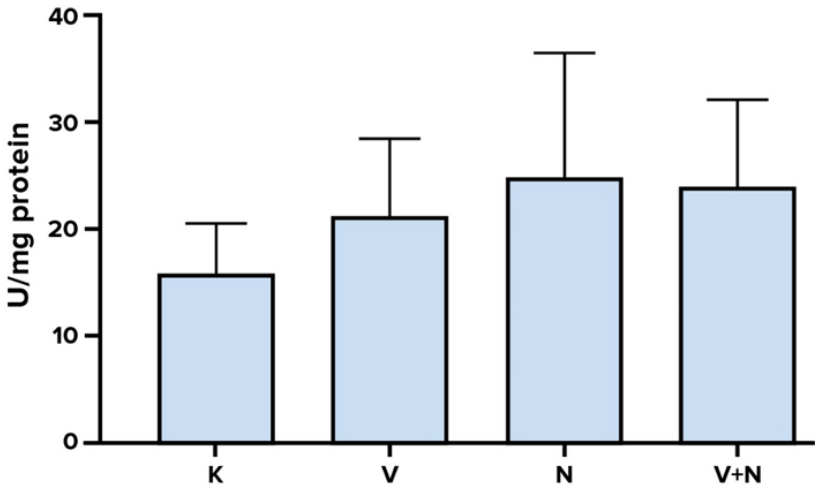
Slika 74. Koncentracija MDA u bubregu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.3.2 Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u bubregu

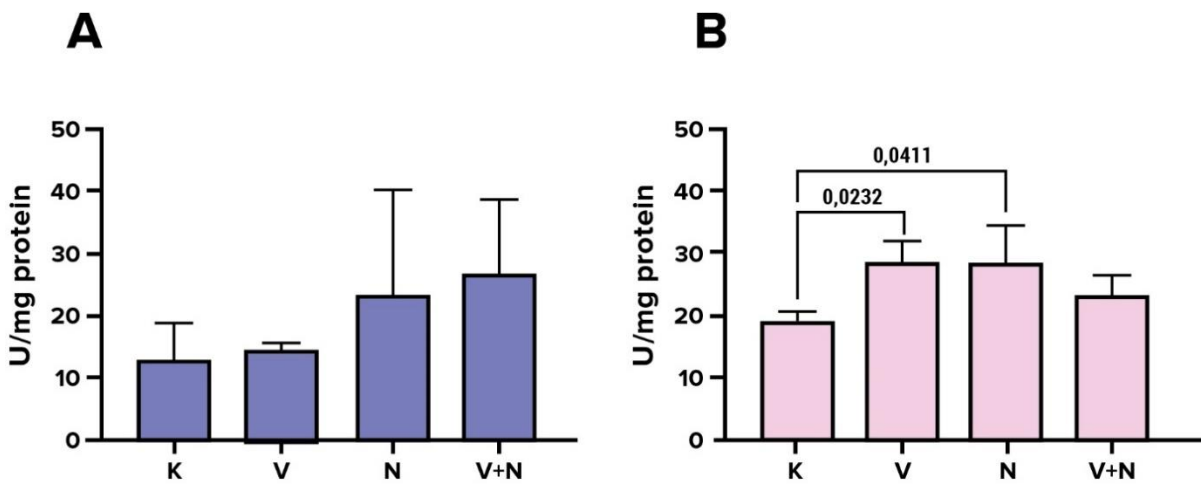
U bubregu, analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 75), nije zabilježeno statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje aktivnosti SOD-a između svih tretiranih skupina.

Usporedbom rezultata posebno po spolovima (slika 76), uočeno je da se u ženki ipak značajno povećava lipidna peroksidacija u bubregu nakon zasebnih tretmana valproatom i naringinom, iako se u združenom tretmanu razina lipidne peroksidacije u bubregu ženki blago snižava i nije značajno različita od kontrolnih životinja.

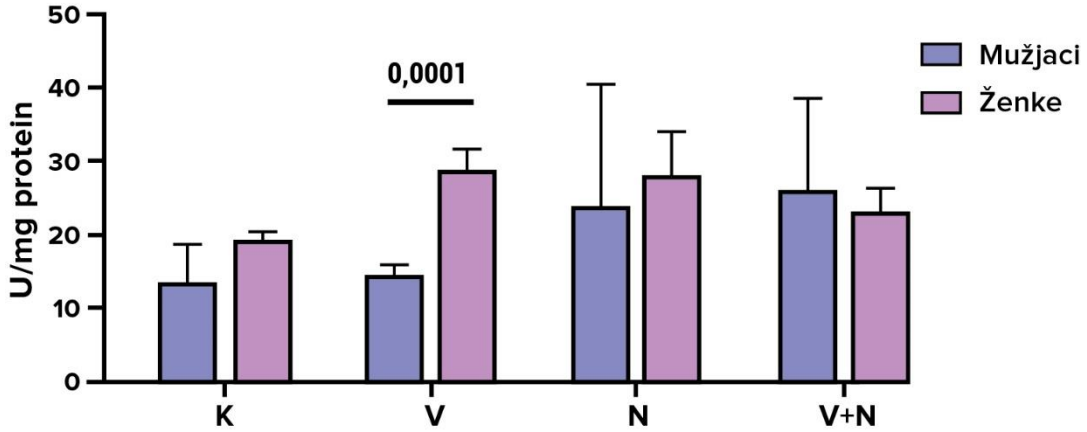
Analizom razlika između mužjaka i ženki (slika 77), zabilježena je statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećanje aktivnosti SOD-a u bubregu ženki u odnosu na mužjake u skupine tretirane valproatom.



Slika 75. Aktivnost SOD-a u bubregu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 76. Aktivnost SOD-a u bubregu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

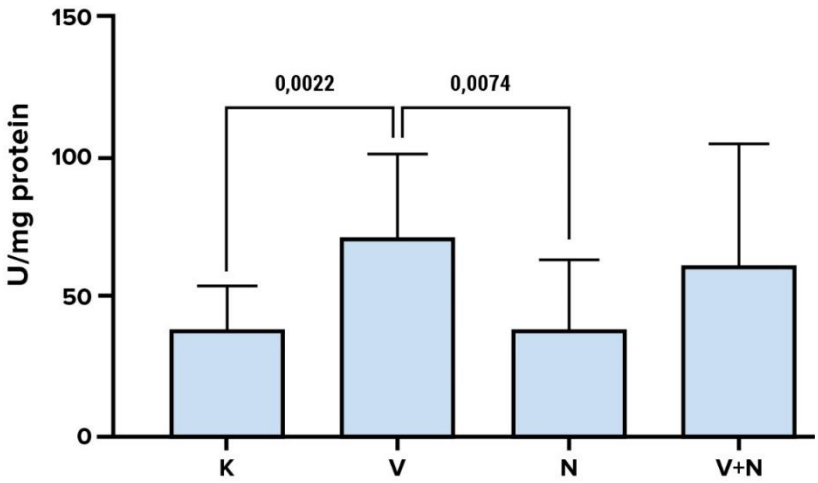


Slika 77. Aktivnost SOD-a u bubregu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

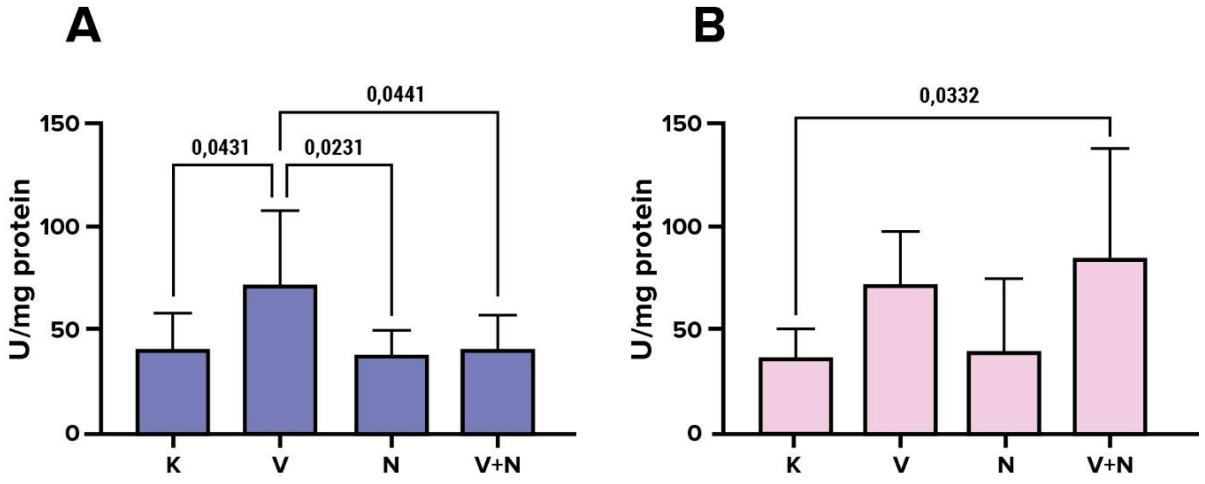
6.3.3 Aktivnost katalaze (CAT) u bubregu

Aktivnost CAT-a u bubregu, ukoliko promatramo skupine mužjaka i ženki zajedno (slika 78), bila je statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećana u skupini izloženoj valproatu u odnosu na kontrolu i u odnosu na skupinu tretiranu naringinom.

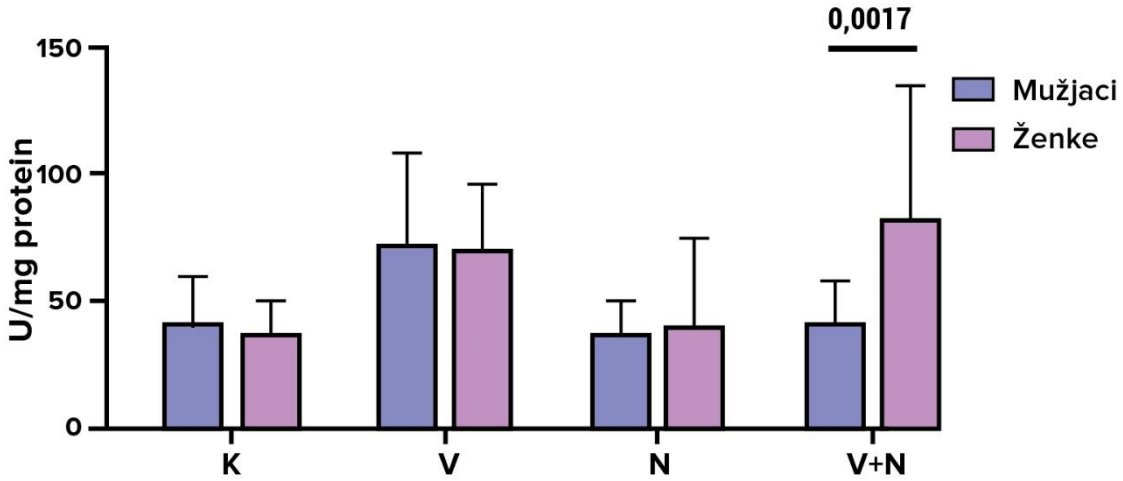
Aktivnost CAT-a u bubregu, analizom skupina mužjaka i ženki zasebno (slika 79), bila je statistički značajno ($p \leq 0,05$) povišena u mužjaka u skupini tretiranoj valproatom, a naringin spušta razinu lipidne peroksidacije bilo zasebno, bilo u združenom tretmanu s valproatom. Jedino je u ženki uočen značajan ($p \leq 0,05$) porast peroksidacije lipida u združenom tretmanu valproatom i naringinom (slike 79 i 80).



Slika 78. Aktivnost CAT-a u bubregu svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 79. Aktivnost CAT-a u bubregu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



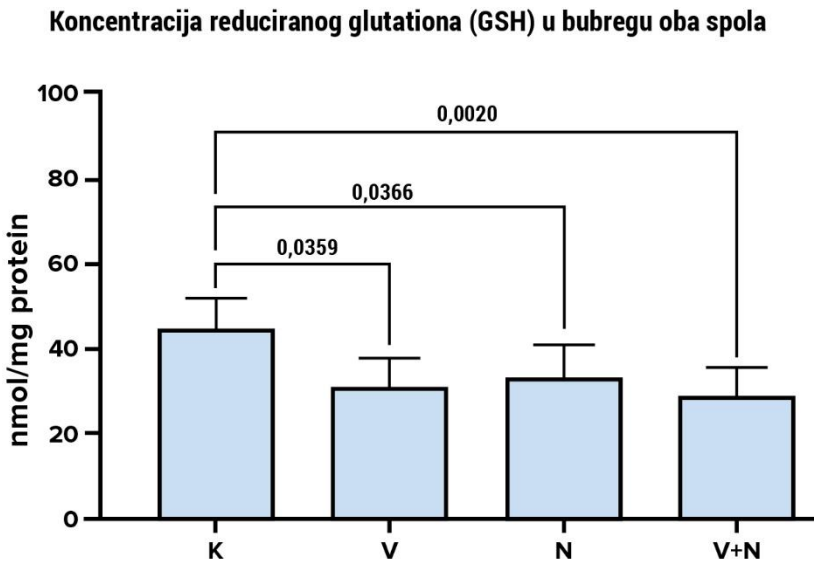
Slika 80. Aktivnost CAT-a u bubregu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.3.4 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u bubregu

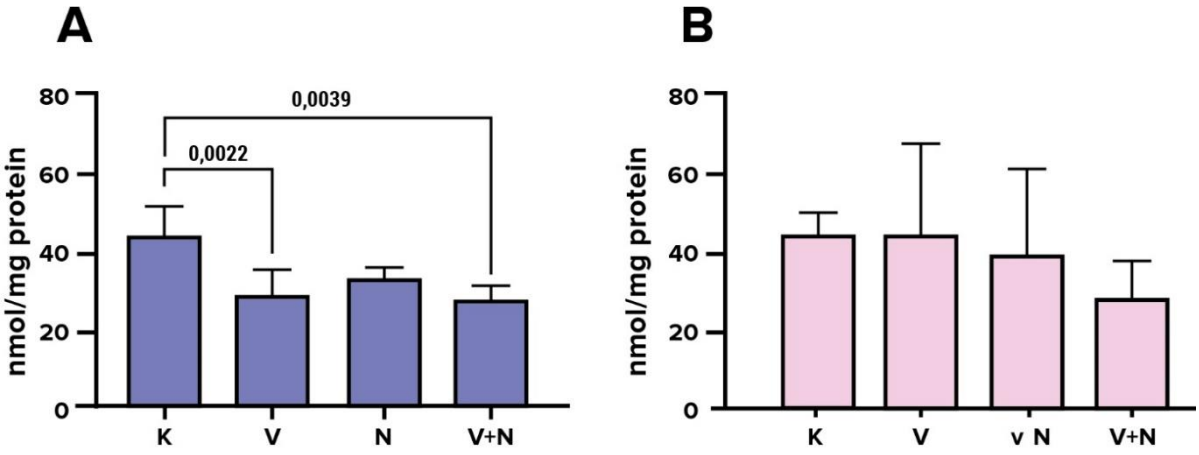
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 81), zabilježene su statistički značajne ($p \leq 0,05$) razlike, odnosno smanjenje koncentracije GSH-a u bubregu svih tretiranih skupina u odnosu na kontrolu.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 82), uočava se da su navedene razlike smanjenja GSH-a karakteristične za mužjake, a da se u bubregu ženki razina GSH-a nije značajno ($p \leq 0,05$) mijenjala ni u jednoj tretiranoj skupini.

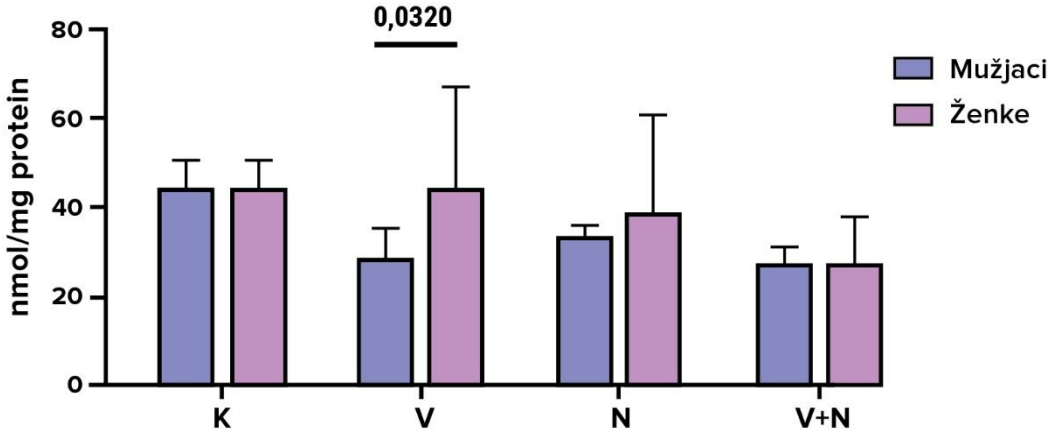
Između tretiranih skupina, usporedbom razlika između mužjaka i ženki (slika 83), pokazalo se da je razina GSH-a statistički značajno ($p \leq 0,05$) viša u ženki u odnosu na mužjake u skupini tretiranoj valproatom.



Slika 81. Koncentracija GSH-a u bubregu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 82. Koncentracija GSH-a u bubregu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



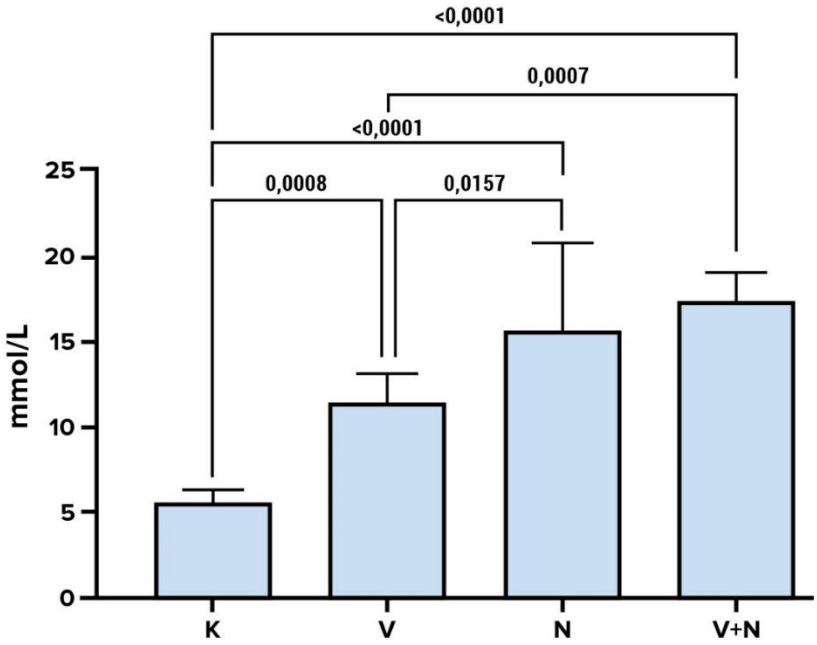
Slika 83. Koncentracija GSH-a u bubregu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.4 *Biokemijski pokazatelji u serumu*

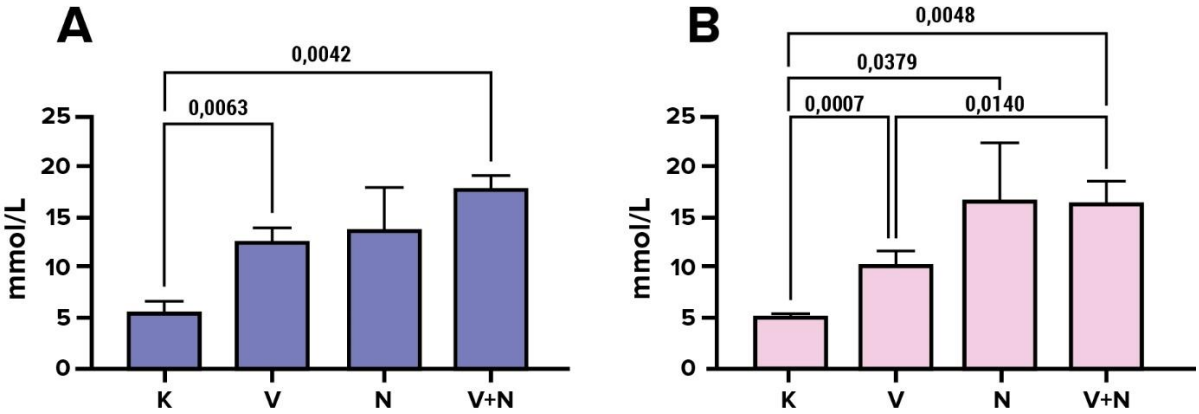
6.4.1 Biokemijski pokazatelji energetskog metabolizma, glukoza i lipidni parametri u serumu

Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 84 i 85), uočene su statistički značajno ($p \leq 0,05$) povišene koncentracije glukoze u serumu svih tretiranih skupina u odnosu na kontrolu. Tretman valproata s naringinom uzrokovao je najveći porast ($p \leq 0,05$) serumske glukoze.

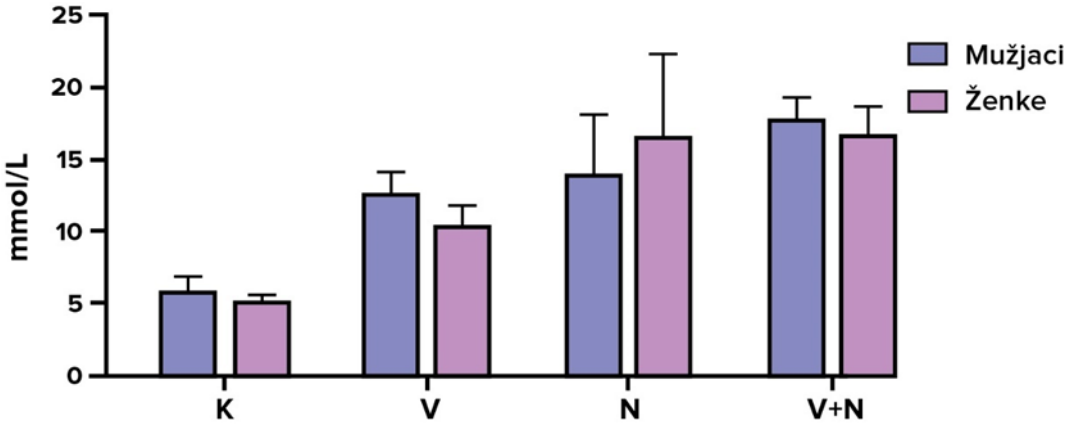
Analizom rezultata posebno po spolovima (slika 86), uočava se da između mužjaka i ženki (slika 86), nisu zabilježene statistički značajne razlike u koncentraciji glukoze u serumu između spolova u svim skupinama.



Slika 84. Koncentracija glukoze u serumu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 85. Koncentracija glukoze u serumu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

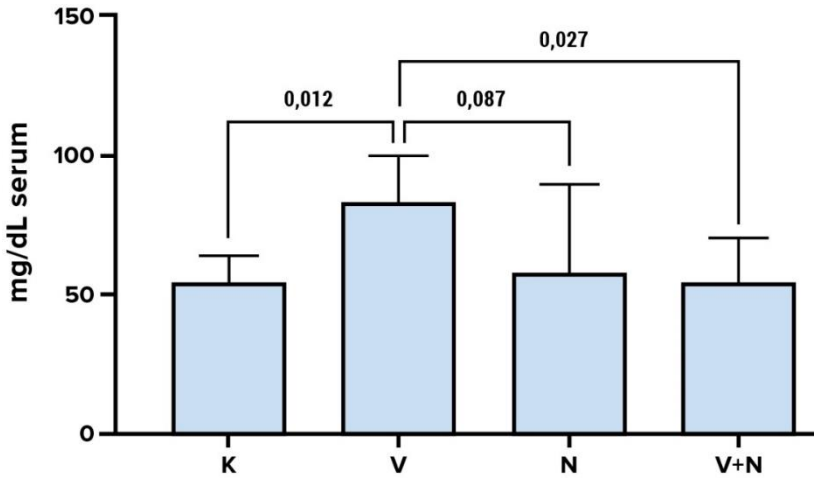


Slika 86. Koncentracija glukoze u serumu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

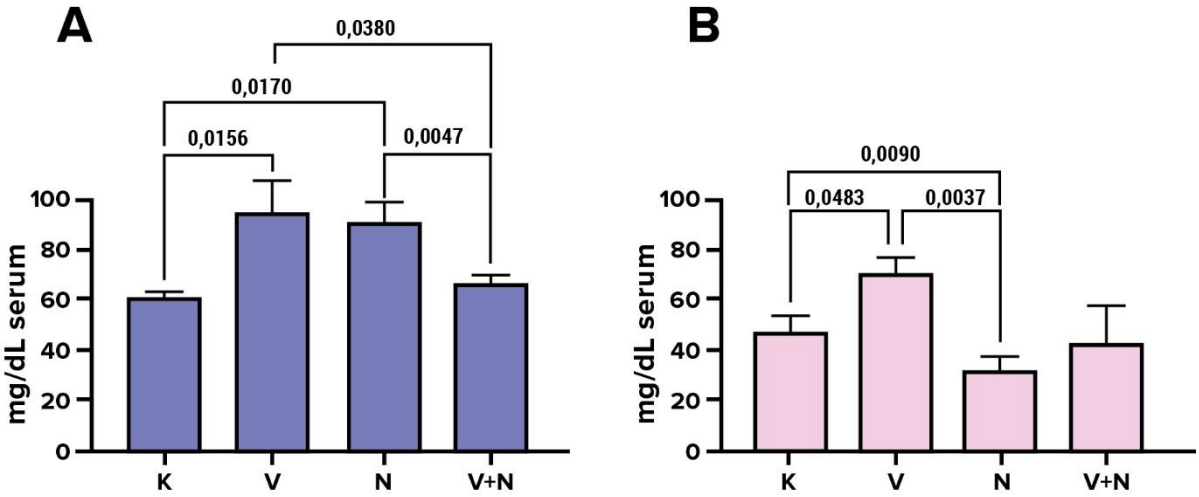
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 87), uočene su statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) serumske koncentracije serumskih triglicerida u odnosu na kontrolu u životinja koje su bile izložene valproatu. Tretman valproata s naringinom uzrokovao je smanjenje ($p \leq 0,05$) serumskih triglicerida ($p \leq 0,05$) u odnosu na valproat i razina je ostala slična netretiranim životinjama.

Analizom rezultata posebno po spolovima (slikem 88, 89), uočava se da je ovaj porast prisutan i u mužjaka i ženki te da kod njih valproat značajno ($p \leq 0,05$) povisuje razinu triglicerida u serumu u odnosu na kontrolu.

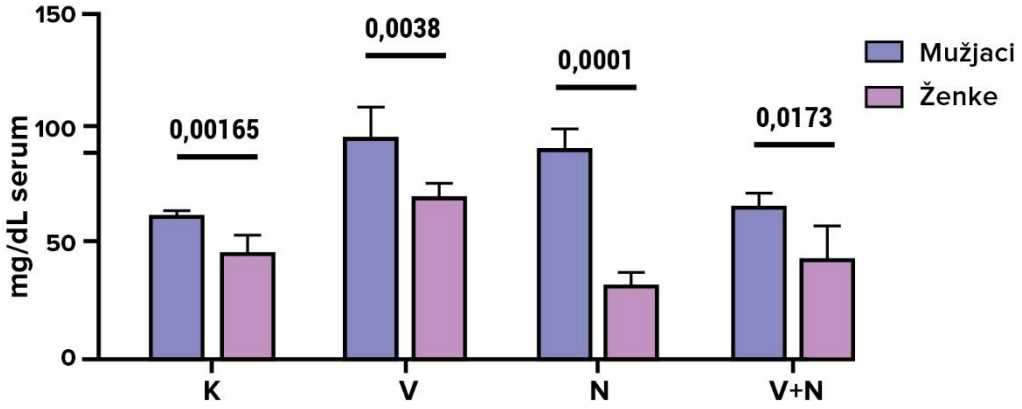
Između mužjaka i ženki postoje značajne razlike u svim skupinama (slika 89). U ženki naringin značajno specifično smanjuje ($p \leq 0,05$) razinu triglicerida (slika 88). U oba spola združeno uzimanje naringina s valproatom vraća vrijednosti serumskih triglicerida na razine slične u normalnih netretiranim životinja.



Slika 87. Koncentracija triglicerida u serumu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



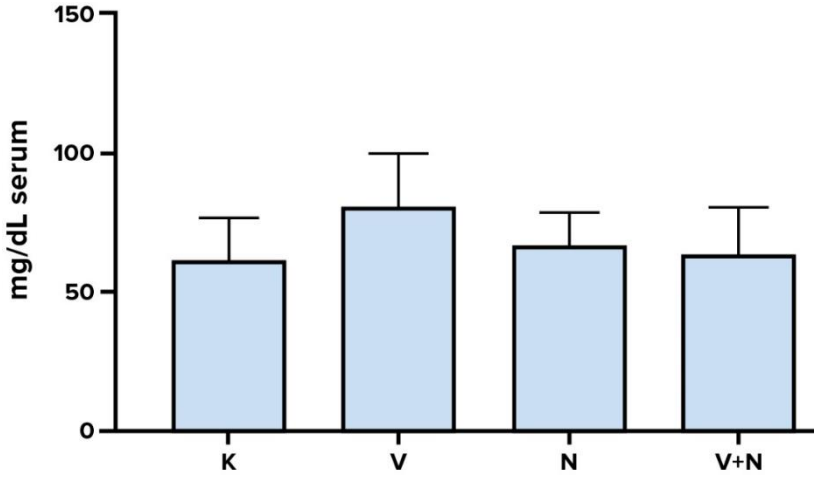
Slika 88. Koncentracija triglicerida u serumu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



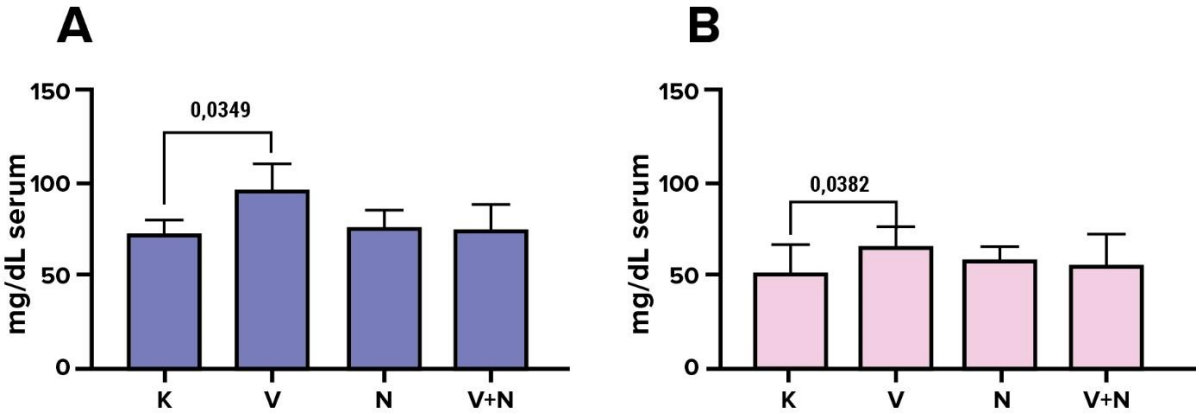
Slika 89. Koncentracija triglicerida u serumu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

Usporedbom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 90), nisu uočene statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) u serumskim koncentracijama ukupnog kolesterola.

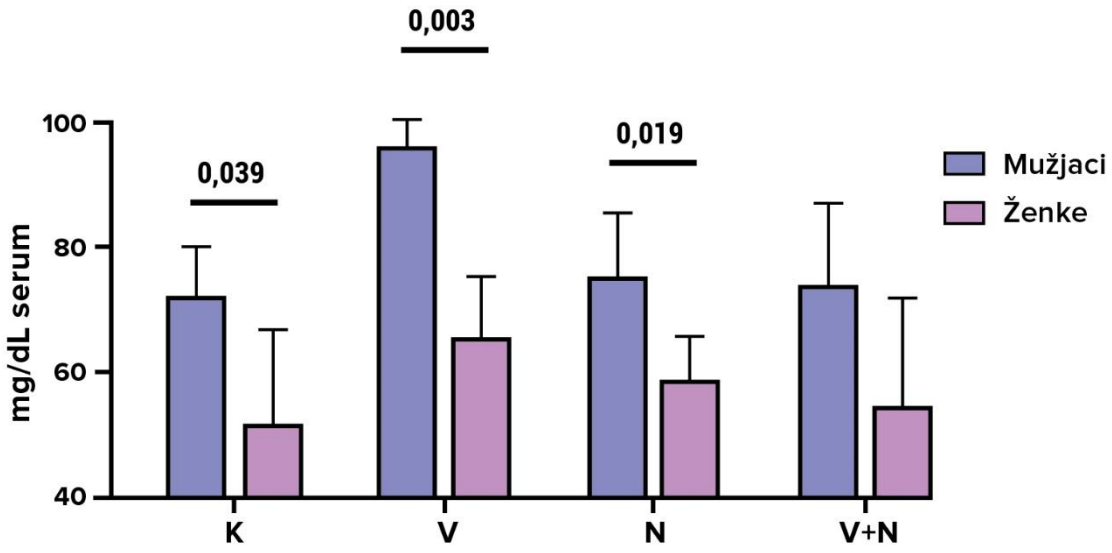
Analizom rezultata posebno po spolovima (slike 91, 92), uočava se da je ovaj porast prisutan u oba spola te da kod njih valproat značajno ($p \leq 0,05$) povisuje razinu ukupnog kolesterola u serumu. Između mužjaka i ženki postoje značajne razlike (slika 92). U ženki naringin značajno specifično smanjuje razinu kolesterola ($p \leq 0,05$) u skupine koje su uzimale naringin s valproatom i takav tretman vraća vrijednosti serumskih triglicerida u ženki na razine slične normalnim razinama u netretiranih životinja.



Slika 90. Koncentracija kolesterola u serumu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 91. Koncentracija kolesterola u serumu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

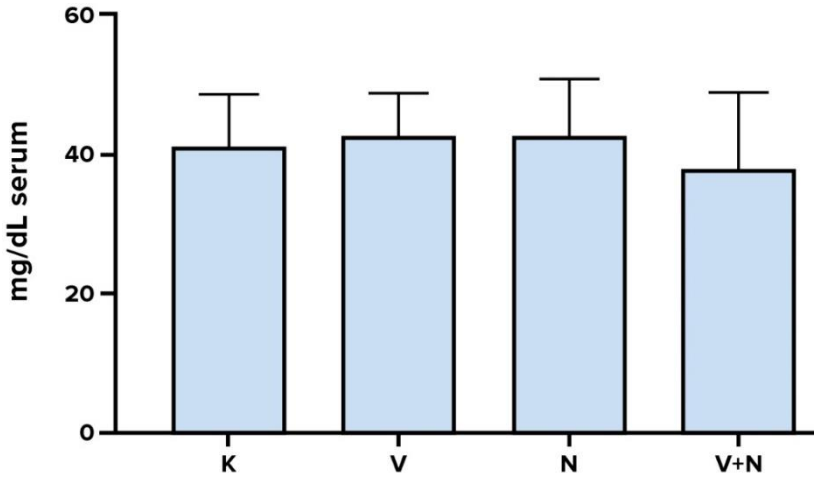


Slika 92. Koncentracija kolesterola u serumu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

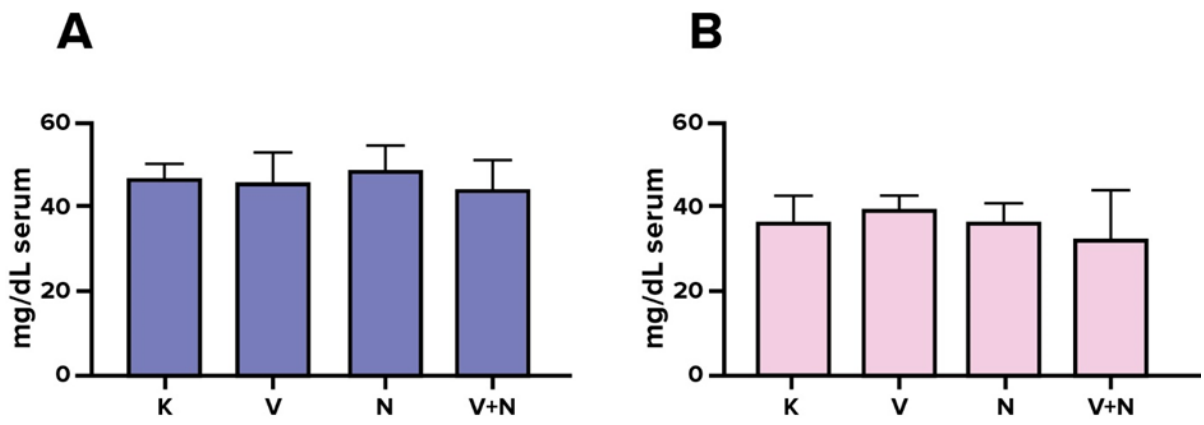
Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 93), nisu uočene statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) u serumskim koncentracijama HDL kolesterola.

Usporedbom rezultata posebno po spolovima (slika 94), također se ne uočavaju značajne ($p \leq 0,05$) promjene razine HDL kolesterola u serumu.

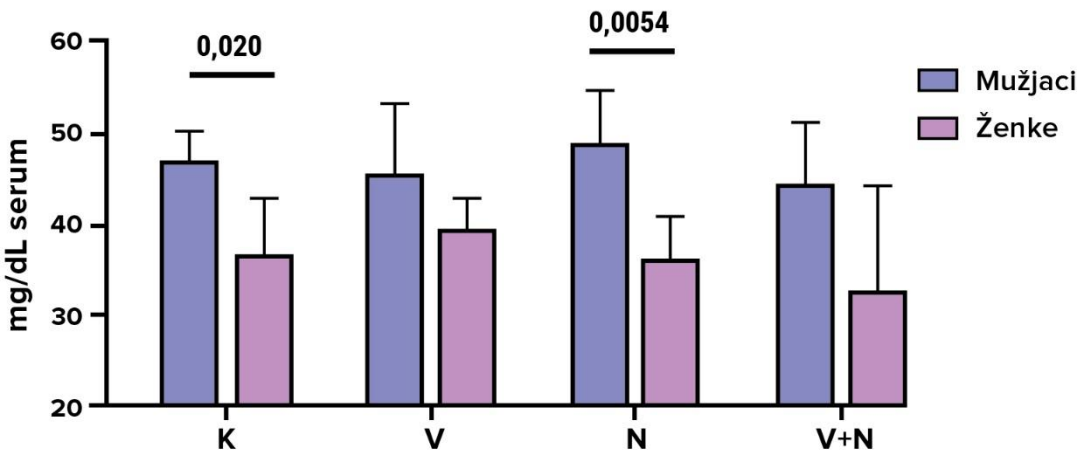
Između mužjaka i ženki ipak postoje neke značajne razlike (slika 95). U ženki je u kontroli i skupinama tretiranih naringinom značajno ($p \leq 0,05$) niža razina HDL kolesterola u odnosu na mužjake.



Slika 93. Koncentracija HDL kolesterola u serumu: svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



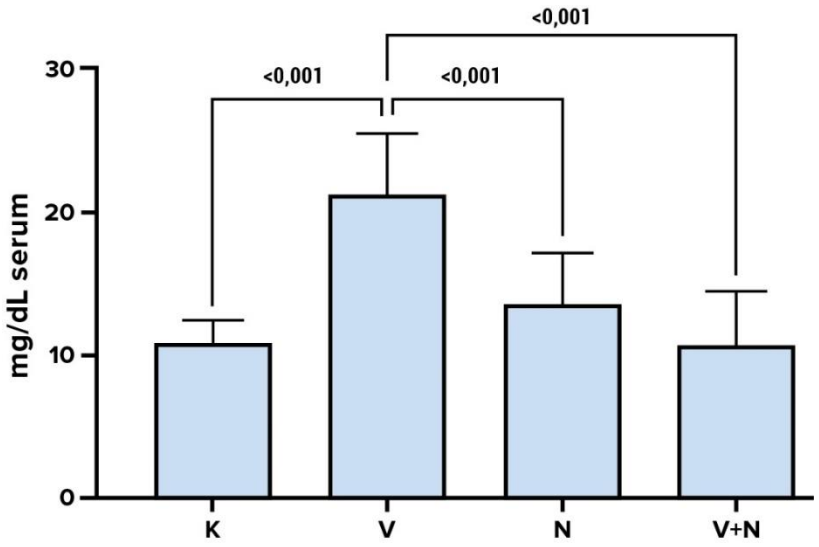
Slika 94. Koncentracija HDL kolesterola u serumu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



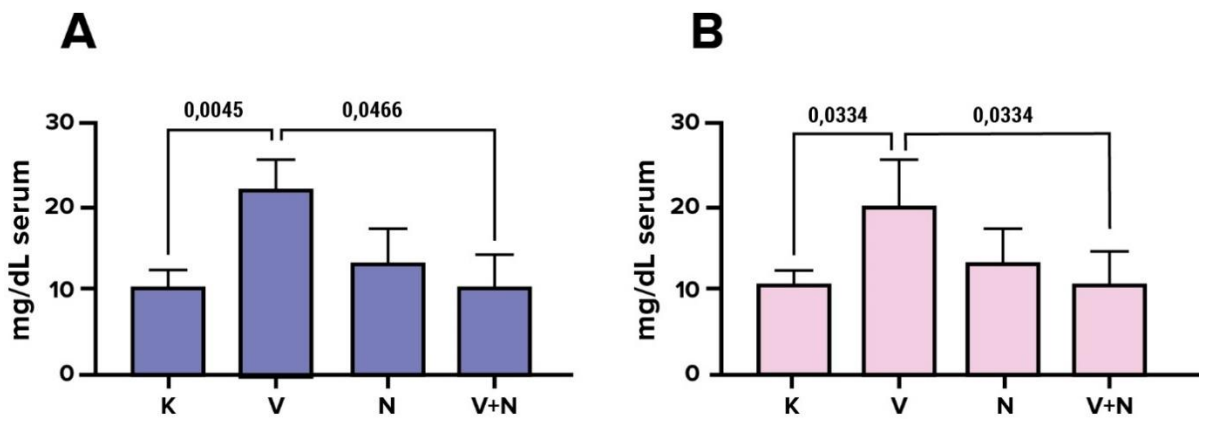
Slika 95. Koncentracija HDL kolesterola u serumu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

Usporedbom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 96), uočene su statistički značajno više ($p \leq 0,05$) serumske koncentracije LDL kolesterola u životinja koje su bile izložene valproatu. Tretman valproata s naringinom uzrokovao je značajnu ($p \leq 0,05$) normalizaciju razina LDL kolesterola u odnosu na porast koje je izazvao valproat.

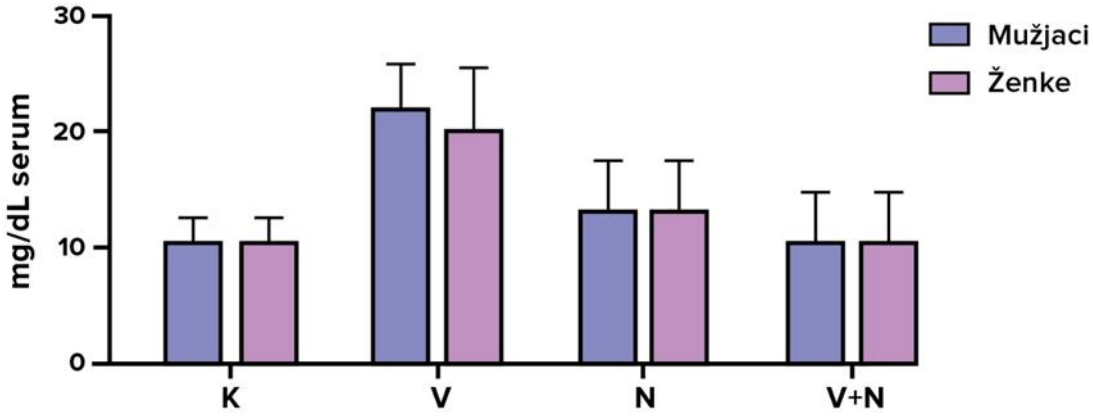
Analizom rezultata posebno po spolovima (slike 97, 98), uočava se da su ovaj porast i njegova normalizacija statistički značajno ($p \leq 0,05$) prisutni kod oba spola. Nema drugih značajnih razlika između mužjaka i ženki (slika 99).



Slika 96. Koncentracija LDL kolesterola u serumu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



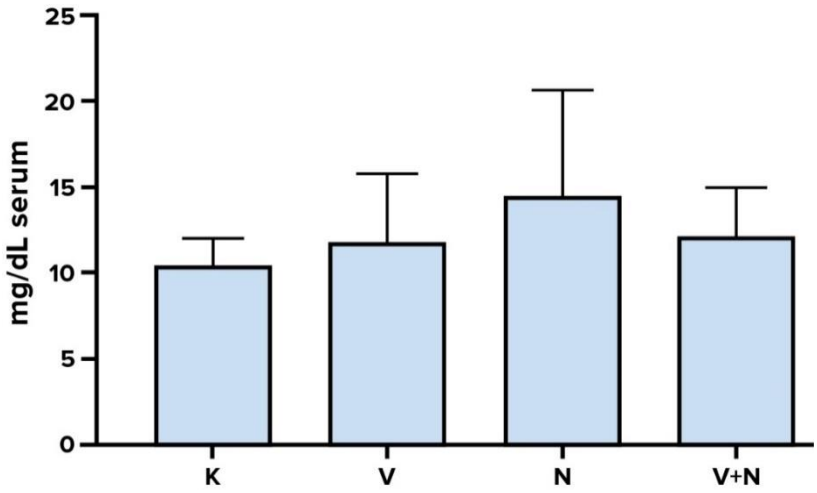
Slika 97. Koncentracija LDL kolesterola u serumu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



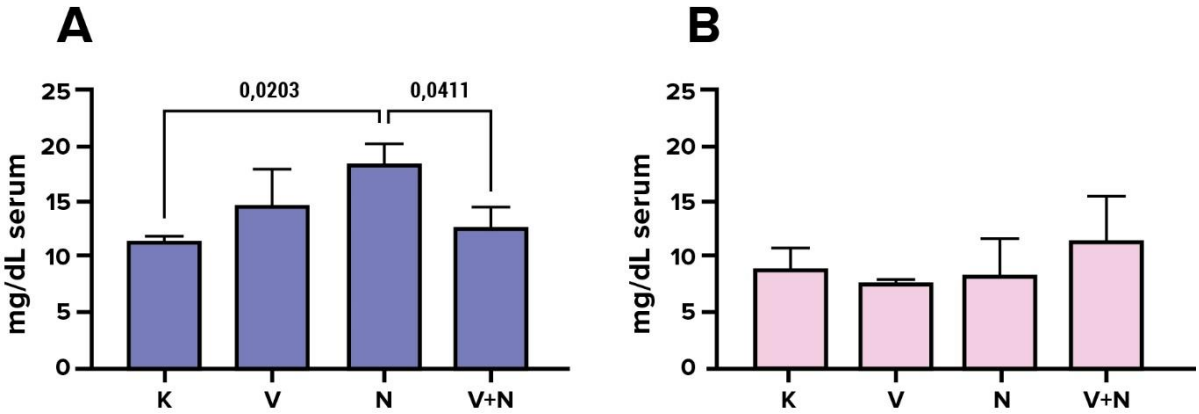
Slika 98. Koncentracija LDL kolesterola u serumu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

Analizom skupina mužjaka i ženki zajedno (slika 99), nisu uočene statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) u serumskim koncentracijama VLDL kolesterola.

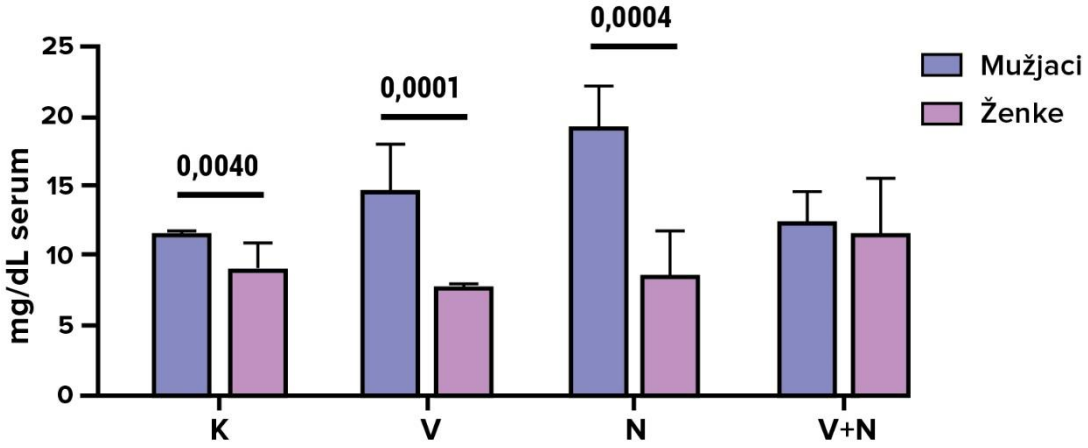
Usporedbom rezultata posebno po spolovima (slike 100, 101), ipak se uočava značajni ($p \leq 0,05$) porast razine VLDL kolesterola u serumu mužjaka koji je izazvan tretmanom naringinom. Između mužjaka i ženki ipak postoje neke značajne razlike u svim skupinama osim u onoj gdje je zajedno primijenjen valproat i naringin (slika 101).



Slika 99. Koncentracija VLDL kolesterola u serumu; svaka skupina prikazuje ujedinjene vrijednosti mužjaka i ženki : K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena otopini naringina (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 100. Koncentracija VLDL kolesterola u serumu mužjaka (A) i ženki (B): K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.



Slika 101. Koncentracija VLDL kolesterola u serumu; razlike između spolova: K – kontrolna skupina, V – skupina izložena valproatu (150 mg/kg), N – skupina izložena naringinu (25 mg/kg), V + N – skupina izložena zajedničkoj primjeni valproata i naringina (150 mg/kg + 25 mg/kg). Tretmani su trajali 10 dana. Stupci prikazuju srednju vrijednost i standardnu devijaciju (±SD). Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su značajne ($p \leq 0,05$) p-vrijednosti statističke analize. Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom p-vrijednostima nisu međusobno statistički značajno različite.

6.4.2 Ukupni proteini, albumin i globulini u krvi pokusnih životinja

Ukupni proteini u serumu (tablica 1), nisu bili statistički značajno različiti ($p \leq 0,05$) između tretiranih skupina, ali je albumin bio statistički značajno povećan ($p \leq 0,05$) u svih skupina u odnosu na kontrolu (tablica 1). Globulini su bili značajno ($p \leq 0,05$) sniženi prilikom združenog uzimanja valproata i naringina (tablica 1).

Pri analizi svakog spola zasebno (tablica 1), niti kod mužjaka niti kod ženki nisu uočene statistički značajne razlike u koncentracija ukupnih proteina i globulina ali je albumin u serumu mužjaka i ženki značajno različit ($p \leq 0,05$).

Tablica 1. Ukupni proteini, albumin i globulini u serumu pokusnih životinja nakon dnevnog tretiranja valproatom (150 mg/kg), naringinom (25 mg/kg), i njihovom kombinacijom V+N (150 mg/kg + 25 mg/kg) tijekom deset dana.

		UKUPNI PROTEINI (mg/L)					ALBUMIN (mg/L)					GLOBULINI (mg/L)				
Skupina	**Spol**	**Srednja vrijednost**	**SD**	**Median**	**Minimum**	**Maksimum**	**Srednja vrijednost**	**SD**	**Median**	**Minimum**	**Maksimum**	**Srednja vrijednost**	**SD**	**Median**	**Minimum**	**Maksimum**
Kontrola	**Oba spola**	39,3	4,4	40,5	32,0	45,0	25,7	2,7	25,5	21,0	30,0	12,0	0,8	12,0	11,0	13,0
Valproat	**Oba spola**	36,3	7,1	38,5	20,0	43,0	**35,6***	5,8	37,0	25,0	41,0	12,0	0,9	12,0	11,0	14,0
Naringin	**Oba spola**	37,8	4,7	36,0	34,0	49,0	**34,8***	3,3	35,0	30,0	42,0	12,6	0,7	12,7	12,0	14,0
V+N	**Oba spola**	38,3	5,0	39,0	25,0	43,0	**34,8***	4,0	34,0	29,0	40,0	**8,2***	2,6	8,0	5,0	12,0
Kontrola	**Mužjaci**	37,3	5,0	37,5	32,0	42,0	27,0	2,4	26,5	25,0	30,0	12,0	0,8	12,0	11,0	13,0
	Ženke	41,3	3,0	41,0	38,0	45,0	24,9	2,7	25,5	21,0	28,0	12,0	0,9	12,0	11,0	13,0
Valproat	**Mužjaci**	34,5	10,2	37,5	20,0	43,0	34,3	6,5	36,0	25,0	40,0	12,5	1,0	12,0	12,0	14,0
	Ženke	38,0	2,2	38,5	35,0	40,0	36,6	5,7	39,0	27,0	41,0	11,6	0,5	12,0	11,0	12,0
Naringin	**Mužjaci**	40,5	5,9	38,5	36,0	49,0	36,0	5,0	36,0	30,0	42,0	12,8	1,0	12,5	12,0	14,0
	Ženke	35,6	2,1	35,0	34,0	39,0	34,0	1,7	34,5	32,0	36,0	12,6	0,5	12,7	12,0	13,1
V+N	**Mužjaci**	38,1	0,9	38,3	37,0	39,0	**31,0**	1,8	31,0	29,0	33,0	**7,3***	1,7	7,5	5,0	9,0
	Ženke	38,3	6,7	40,5	25,0	43,0	**37,3#**	2,7	38,5	33,0	40,0	**9,0***	3,1	9,0	5,0	12,0

***-statistički značajno (p≤0,05) različito u odnosu na kontrolu, #/- statistički značajno (p≤0,05) različito između spolova unutar skupine, V+N – skupina izložena združenom tretmanu valproatom i naringinom.**

6.4.3 Enzimski biomarkeri u serumu laktat dehidrogenaza (LDH), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (AP) i amilaza (AMY)

Aktivnost enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu (tablica 2), bila je statistički značajno različita ($p \leq 0,05$) i povišena nakon tretmana naringinom i kombinacijom valproata i naringina u usporedbi s kontrolnim životinjama. Valproat nije značajno utjecao na porast aktivnosti laktat dehidrognaze u serumu.

Enzim alanin aminotransferaza (ALT) nije bila statistički značajno različita između skupina ukoliko se promatraju oba spola zajedno (tablica 2).

Pri analizi svakog spola zasebno (tablica 2), uočava se da je povećanje LDH statistički značajno ($p \leq 0,05$) izraženo kod mužjaka izloženih valproatu i naringinu, ali ne i kod ženki. Slično i u združenom tretmanu, porast LDH u serumu tipičan je za mužjake, a ne i za ženke i između njih postoji statistički značajna razlika ($p \leq 0,05$). Isto tako, enzim ALT u mužjaka je bio nakon tretmana valproatom povišen ($p \leq 0.05$) u odnosu na ženke, dok je u ženki naringin uzrokovao porast ($p \leq 0,05$) ALT-a.

Aktivnost enzima amilaze (AMY) u serumu (tablica 3), bila je statistički značajno različita ($p \leq 0,05$) i povišena nakon tretmana valproatom u usporedbi s kontrolnim životinjama koje nisu dobivale valproat.

Združenim djelovanjem valproata i naringina uočava se da je serumska vrijednost enzima alkalne fosfataze (AP) u skupini sa združenim tretmanom bila statistički značajno ($p \leq 0,05$) smanjena u odnosu na kontrolne životinje (tablica 3).

Pri analizi svakog spola zasebno (tablica 3), uočava se da je povećanje amilaze izraženo kod mužjaka tretiranih valproatom, ali ne i kod ženki, a združeni tretman naringinom nije smanjio povećanu koncentraciju kod mužjaka i ona je ostala statistički značajno povišena u odnosu na kontrolne mužjake i na ženke iz iste skupine. Kod ženki je uočena statistički značajno ($p \leq 0,05$) smanjenjeu aktivnosti alkalne fosfataze nakon združenog tretmana valproatom i naringinom (tablica 3).

Tablica 2. Laktat dehidrogenaza (LDH) i alaninaminotransferaza (ALT) u serumu pokusnih životinja nakon dnevnog tretiranja valproatom (150 mg/kg), naringinom (25 mg/kg), i njihovom kombinacijom V+N (150 mg/kg + 25 mg/kg) tijekom deset dana.

		LDH (U/L)					ALT (U/L)				
Skupina	**Spol**	**Srednja vrijednost**	**SD**	**Median**	**Minimum**	**Maksimum**	**Srednja vrijednost**	**SD**	**Median**	**Minimum**	**Maksimum**
Kontrola	**Oba spola**	226,4	62,9	240,0	119,0	305,0	33,7	2,2	33,5	30,0	37,0
Valproat	**Oba spola**	**287,6**	72,0	299,0	133,0	518,0	30,7	11,4	30,0	16,0	50,0
Naringin	**Oba spola**	**307,2***	117,4	319,5	163,0	352,0	35,2	7,0	38,5	20,0	42,0
V+N	**Oba spola**	**333,0***	257,6	240,0	122,0	809,0	37,9	5,8	39,0	30,0	45,0
Kontrola	**Mužjaci**	264,8	29,2	257,0	240,0	305,0	35,3	1,7	35,5	33,0	37,0
	Ženke	195,8	68,0	200,0	119,0	300,0	32,7	1,9	33,0	30,0	35,0
Valproat	**Mužjaci**	**316,4#**	40,3	392,0	263,0	518,0	**41,3#**	6,1	39,5	36,0	50,0
	Ženke	**258,8**	89,2	206,0	133,0	355,0	**22,2**	5,6	22,0	16,0	30,0
Naringin	**Mužjaci**	**382,0#**	97,8	331,0	250,0	348,0	**28,0**	5,4	30,5	20,0	31,0
	Ženke	**232,4**	86,4	256,0	163,0	352,0	**40,0#**	1,4	40,0	38,0	42,0
V+N	**Mužjaci**	**498,5**	324,2	531,5	122,0	809,0	35,5	4,8	36,0	30,0	40,0
	Ženke	**200,6#**	67,9	184,0	131,0	297,0	39,8	6,4	44,0	31,0	45,0

***-statistički značajno (*p≤0,05*) različito u odnosu na kontrolu, #-- statistički značajno (*p≤0,05*) različito između spolova unutar skupine V+N – skupina izložena združenom tretmanu valproatom i naringinom.**

Tablica 3. Amilaza (AMY) i alkalna fosfataza (AP) u serumu pokusnih životinja nakon dnevnog tretiranja valproatom (150 mg/kg), naringinom (25 mg/kg), i njihovom kombinacijom V+N (150 mg/kg + 25 mg/kg) tijekom deset dana.

		AMY (U/L)					AP (U/L)				
Skupina	**Spol**	**Srednja vrijednost**	**SD**	**Median**	**Minimum**	**Maksimum**	**Srednja vrijednost**	**SD**	**Median**	**Minimum**	**Maksimum**
Kontrola	**Oba spola**	339,9	77,2	331,0	251,0	526,0	47,8	4,2	48,5	40,0	55,0
Valproat	**Oba spola**	**462,5***	355,3	361,0	184,0	1326,0	44,3	5,8	42,0	40,0	58,0
Naringin	**Oba spola**	**338,2**	61,6	366,0	240,0	401,0	**35,4****	9,0	39,0	11,0	40,0
V+N	**Oba spola**	**352,1**	118,2	295,0	229,0	549,0	**29,6****	12,5	30,0	9,0	45,0
Kontrola	**Mužjaci**	365,3	110,6	331,0	273,0	526,0	46,3	6,3	45,0	40,0	55,0
	Ženke	319,6	40,0	331,0	251,0	356,0	48,8	2,3	50,0	45,0	51,0
Valproat	**Mužjaci**	**555,0**	520,4	355,0	184,0	1326,0	44,5	3,1	45,5	40,0	47,0
	Ženke	**370,0#**	**31,7**	364,5	339,0	412,0	44,2	7,8	41,0	40,0	58,0
Naringin	**Mužjaci**	**371,8**	23,8	373,5	342,0	398,0	32,0	14,1	38,5	11,0	40,0
	Ženke	**311,4**	71,8	277,0	240,0	401,0	37,7	3,4	39,0	31,0	40,0
V+N	**Mužjaci**	**455,8**	102,4	459,0	356,0	549,0	**42,0**	2,2	41,5	40,0	45,0
	Ženke	**269,2#**	27,2	275,0	229,0	295,0	**21,3#**	8,7	22,0	9,0	30,0

***-statistički značajno (*p≤0,05*) različito u odnosu na kontrolu, **- statistički značajno (*p≤0,05*) različito u odnosu na kontrolu i na skupinu tretiranu valproatom, #-- statistički značajno (*p≤0,05*) različito između spolova unutar skupine. V+N –skupina izložena združenom tretmanu valproatom i naringinom.**

6.4.4 Serumski kreatinin, bilirubin, urea (BUN), natrij, kalcij i kalij

Kreatinin i bilirubin u serumu (tablica 4) nisu bili značajno različiti između tretiranih skupina, u usporedbi s kontrolnim životinjama. Skupina tretirana valproatom imala je statistički značajno povećanje koncentracije ureje u odnosu na kontrolu, dok je tretman kombinacijom vratio razine ureje bliže kontroli.

Pri analizi svakog spola zasebno (tablica 4), uočava se da razlike u koncentraciji serumskog kreatininabilirubina i uree nisu bile značajne u odnosu na pripadajuće kontrole.

Prema spolovima. Bilirubin nije pokazao značajnu razliku, ali je kreatinin bio statistički značajno različit ($p \leq 0,05$) između spolova u združeno tretiranoj skupini, a urea u svim tretiranim skupinama.

Natrij i kalcij u serumu (tablica 5) nisu bili značajno različiti između tretiranih skupina u usporedbi s kontrolnim životinjama. Kalij u serumu (tablica 5) bio je statistički značajno ($p \leq 0,05$) povišen u skupini koja je uzimala valproat, a pri analizi serumskog kalija u svakog spola zasebno (tablica 5) uočava se da je za tu razliku zaslužno povećanje kalija u mužjaka tretiranih valproatom, dok kod ženki nije bilo značajne razlike.

Tablica 4. Kreatinin, bilirubin i urea (BUN) u serumu pokusnih životinja nakon dnevnog tretiranja valproatom (150 mg/kg), naringinom (25 mg/kg), i njihovom kombinacijom V+N (150 mg/kg + 25 mg/kg) tijekom deset dana.

		KREATININ (mmol/L)					BILIRUBIN (mmol/L)					UREA (BUN) (mmol/L)				
Skupina	Spol	Srednja vrijednost	SD	Median	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	SD	Median	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	SD	Median	Minimum	Maksimum
Kontrola	Oba spola	22,7	2,6	22,0	19,0	27,0	5,2	0,2	5,1	5,0	5,5	6,0	1,2	5,7	4,8	7,7
Valproat	Oba spola	30,7	6,3	28,0	25,0	42,0	5,4	0,4	5,1	5,0	5,9	**9,7***	5,0	8,5	3,0	21,0
Naringin	Oba spola	35,4	12,6	36,0	18,0	53,0	5,1	0,2	5,0	5,0	5,5	5,7	1,3	5,2	4,1	8,0
V+N	Oba spola	29,3	14,4	22,0	18,0	56,0	5,1	0,1	5,0	5,0	5,4	8,0	2,8	6,9	5,7	15,0
Kontrola	Mužjaci	22,8	3,3	22,5	19,0	27,0	5,3	0,2	5,3	5,0	5,5	6,0	1,3	5,7	4,8	7,7
	Ženke	22,6	2,4	22,0	20,0	26,0	5,1	0,2	5,0	5,0	5,5	6,0	1,3	5,7	4,8	7,7
Valproat	Mužjaci	31,3	7,8	29,0	25,0	42,0	5,6	0,4	5,8	5,1	5,9	**10,2**	7,6	8,5	3,0	21,0
	Ženke	30,2	5,8	28,0	25,0	40,0	5,2	0,4	5,0	5,0	5,9	**9,4#**	2,5	8,5	7,0	13,3
Naringin	Mužjaci	27,5	10,5	25,0	18,0	42,0	5,1	0,2	5,0	5,0	5,4	**6,9**	1,1	7,0	5,4	8,0
	Ženke	43,3	9,6	45,0	30,0	53,0	5,1	0,2	5,0	5,0	5,5	**4,9#**	0,4	5,1	4,1	5,2
V+N	Mužjaci	**42,8**	13,6	45,5	24,0	56,0	5,1	0,2	5,1	5,0	5,4	**10,0**	3,4	8,5	7,9	15,0
	Ženke	**20,3#**	4,3	18,5	18,0	29,0	5,0	0,1	5,0	5,0	5,2	**6,5#**	0,5	6,8	5,7	6,9

***-statistički značajno (*p≤0,05*) različito u odnosu na kontrolu, #-- statistički značajno (*p≤0,05*) različito između spolova unutar skupine V+N – skupina izložena združenom tretmanu valproatom i naringinom.**

Tablica 5. Glavni elektroliti u serumu pokusnih životinja nakon dnevnog tretiranja valproatom (150 mg/kg), naringinom (25 mg/kg), i njihovom kombinacijom V+N (150 mg/kg + 25 mg/kg) tijekom deset dana.

		Natrij (mmol/L)					Kalcij (mmol/L)					Kalij u SERUMU (mmol/L)				
Skupina	Spol	Srednja vrijednost	SD	Median	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	SD	Median	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	SD	Median	Minimum	Maksimum
Kontrola	Oba spola	154,0	153,0	4,9	145,0	161,0	1,78	1,80	0,08	1,60	1,90	4,7	4,8	0,3	4,3	4,9
Valproat	Oba spola	152,0	152,0	6,3	140,0	160,0	1,83	1,80	0,05	1,80	1,90	**6,3***	6,3	1,5	4,6	8,5
Naringin	Oba spola	150,0	147,5	8,0	142,0	165,0	1,83	1,80	0,05	1,80	1,90	**5,5***	5,6	0,2	5,3	5,9
V+N	Oba spola	153,5	154,0	6,7	141,0	161,0	1,78	1,80	0,11	1,60	1,90	5,0	5,1	0,5	4,2	5,8
Kontrola	Mužjaci	156,2	155,5	4,1	152,6	161,0	1,83	1,80	0,05	1,80	1,90	4,7	4,8	0,3	4,3	4,9
	Ženke	152,3	153,0	5,2	145,0	159,0	1,75	1,80	0,08	1,60	1,80	4,7	4,8	0,3	4,3	4,9
Valproat	Mužjaci	150,0	151,0	8,1	140,0	158,0	1,83	1,80	0,05	1,80	1,90	**7,1**	7,2	1,5	5,6	8,5
	Ženke	153,6	152,0	4,7	149,0	160,0	1,83	1,80	0,05	1,80	1,90	**5,5#**	5,0	1,3	4,6	7,0
Naringin	Mužjaci	156,7	158,0	9,1	147,0	165,0	1,83	1,80	0,05	1,80	1,90	5,6	5,7	0,3	5,3	5,9
	Ženke	146,0	145,0	4,1	142,0	152,0	1,83	1,80	0,05	1,80	1,90	5,5	5,5	0,1	5,3	5,6
V+N	Mužjaci	157,0	157,5	3,9	152,0	161,0	1,78	1,80	0,13	1,60	1,90	5,0	5,1	0,3	4,5	5,3
	Ženke	150,0	150,0	7,5	141,0	159,0	1,78	1,80	0,11	1,60	1,90	5,0	5,0	0,7	4,2	5,8

***-statistički značajno (p≤0,05) različito u odnosu na kontrolu, #/- statistički značajno (p≤0,05) različito između spolova unutar skupine, V+N – skupina izložena združenom tretmanu valproatom i naringinom.**

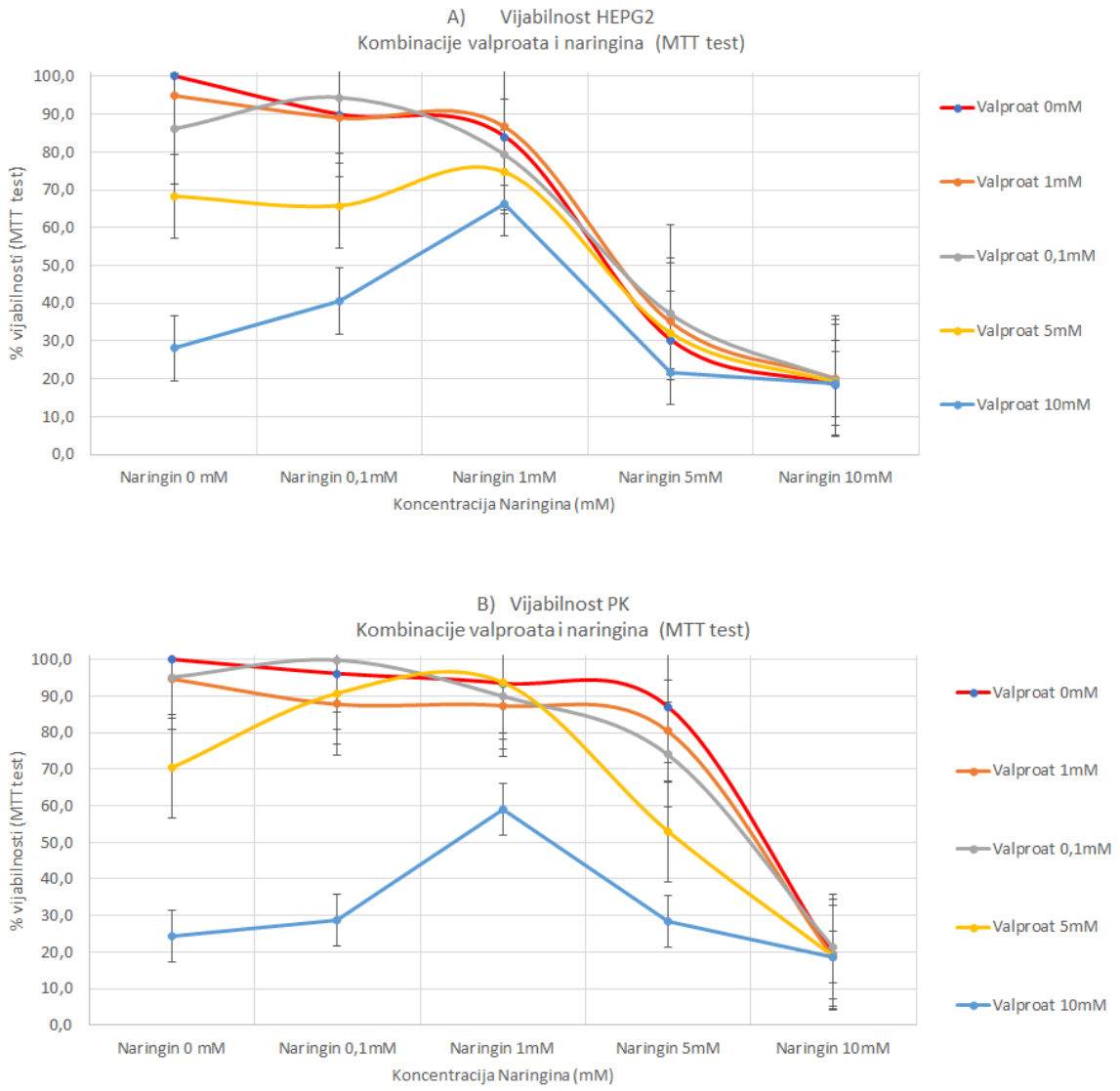
6.5 Vijabilnost stanica i promjene pokazatelja oksidacijskog stresa u jetrenim HepG2 i PK stanicama bubrega in vitro

Usporedbom vijabilnosti stanica HepG2 i PK (MTT testom), izloženih različitim koncentracijama valproata i naringina u uvjetima *in vitro* (slika 102; slike u Prilogu 1 i 2), uočava se da su koncentracije valproata i naringina koje prelaze 5 mM uzrokovale redukciju broja stanica na otprilike 20-40% vijabilnih stanica u kulturi. Jetrene Hep G2 stanice su blago osjetljivije u odnosu na PK stanice jer krivulje vijabilnosti PK stanica ostaju u razinama vijabilnosti od 80-100% pri koncentracijama valproata od 1 mM/mL i naringina od 5 mM/mL, dok kod Hep G2 stanica vijabilnost pada ispod 80% već pri nižim koncentracijama valproata (0,1 mM/mL) i naringina (1 mM/mL). Posebice je zanimljivo da pri visokim koncentracijama valproata (5 i 10 mM/mL) dodatak naringina od 1 mM/mL poboljšava preživljenje oba tipa stanice jer se vijabilnost nakon dodatka naringina (1 mM/mL) podiže za otprilike 10% (slika 102).

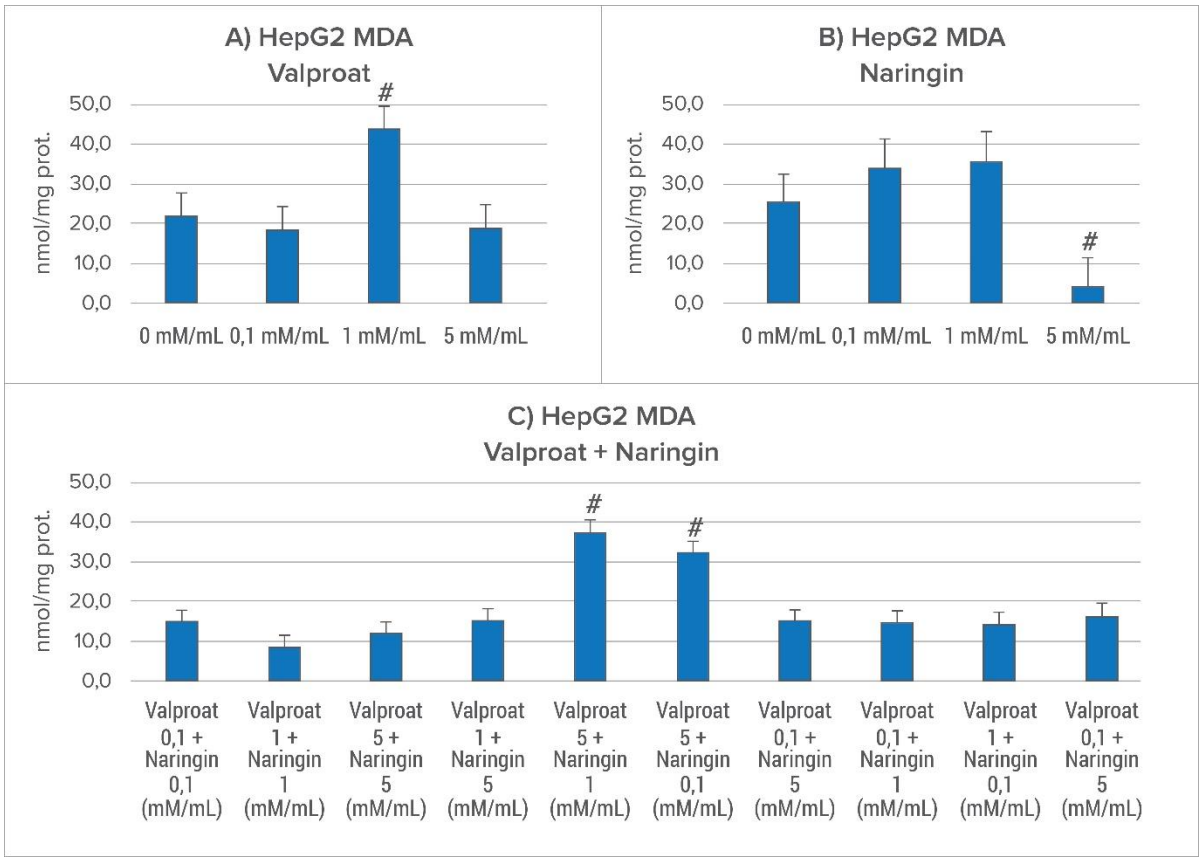
U HepG2 stanica valproat značajno ($p \leq 0,05$) povećava razinu MDA lipidne peroksidacije u koncentraciji od 1 mM/mL (slika 103) u odnosu na netretirne stanice. Naringin u Hep G2 stanica razinu lipidne peroksidacije povisuje ($p \leq 0,05$) u dozama od 0.1mM/ml i 1 mM/ml (slika 105).

Valproat u HepG2 stanicama u kulturi povećava ($p \leq 0,05$) aktivnost katalaze u odnosu na netretirane stanice u dozi od 0,1 mM/mL dok naringin umanjuje ($p \leq 0,05$) aktivnost katalaze tek pri dozi 5 mM/mL (slika 104). Izlaganjem kombinaciji valproatom i naringina, koje prelaze 1 mM/mL, izazivaju povećanje ($p \leq 0,05$) aktivnosti katalaze u HepG2 stanica u odnosu na netretiranu kontrolu.

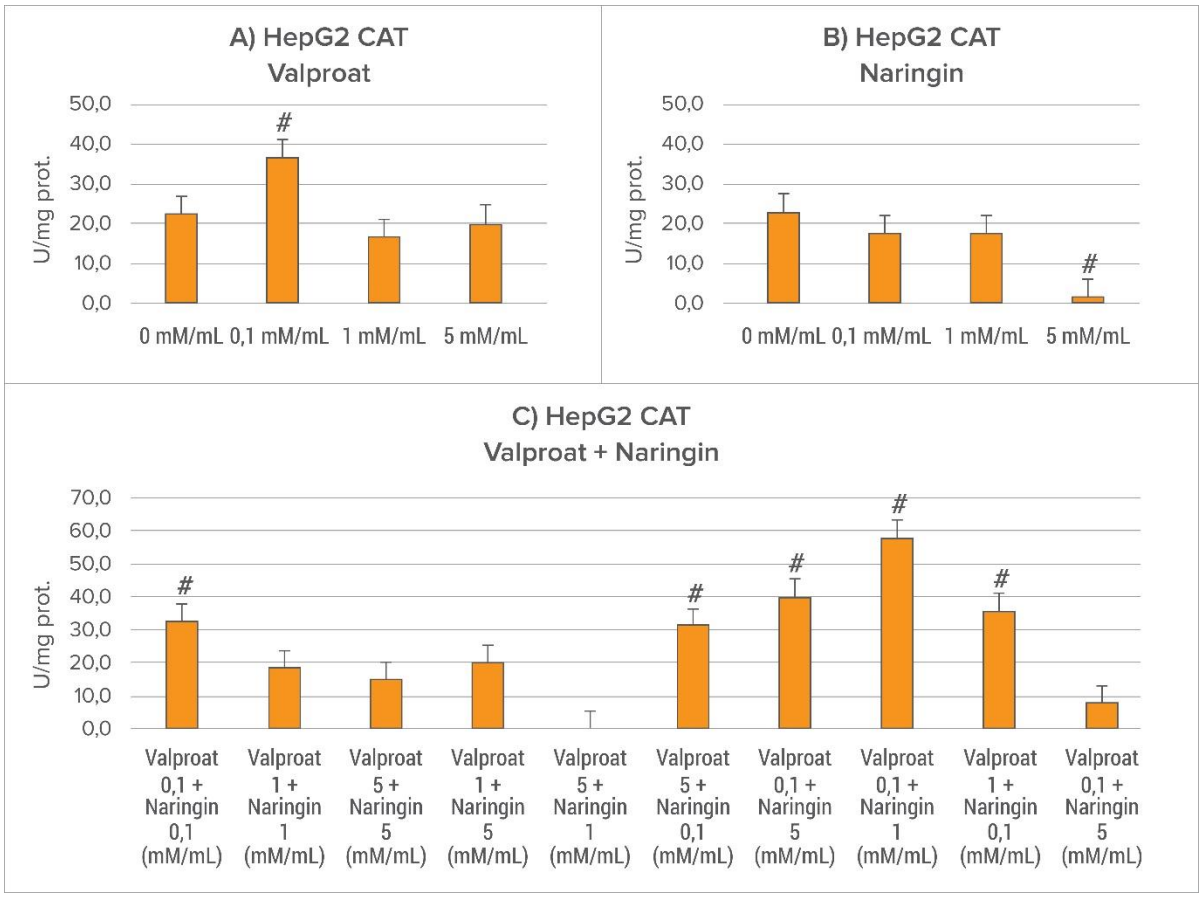
U HepG2 stanica u staničnoj kulturi nisu zabilježene značajne promjene u koncentraciji reduciranog glutationa (slika 107) niti u jednoj koncentraciji valproata dok naringin u koncentraciji od 5 mMol/mL umanjuje ($p \leq 0,05$) koncentraciju glutationa u odnosu na netretirane stanice. U toj je dozi vijabilnost HepG2 stanica značajno pala.



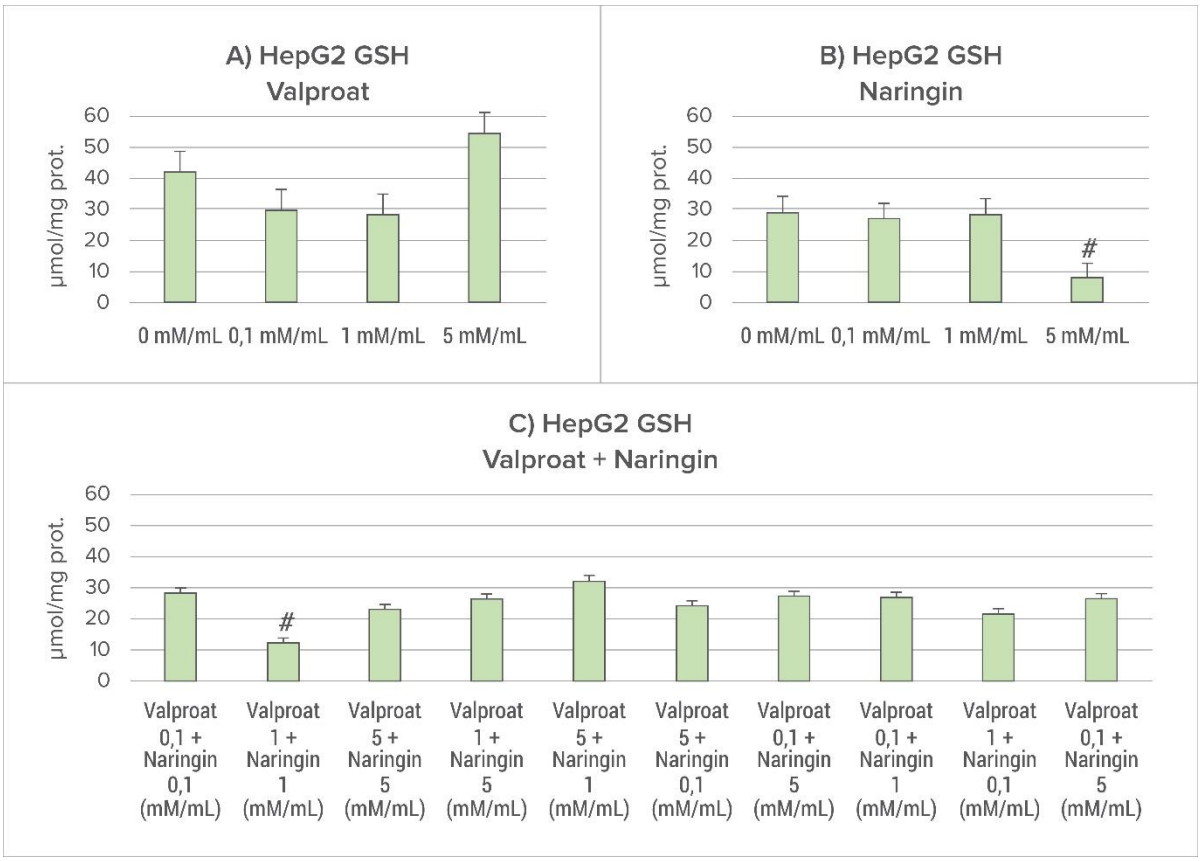
Slika 102. Vijabilnost stanica tretiranih različitim koncentracijama valproata i naringina određena MTT testom. A) stanice jetre Hep G2 , B) stanice bubrega PK. Rezultati su izraženi kao postotak (%) živih stanca u staničnoj kulturi (srednja vrijednost ± S.E.). Tretiranje je trajalo 24 h.



Slika 103. Lipidna peroksidacija određena kao koncentracija MDA u jetrenim Hep G2 stanicama *in vitro.* A) stanice jetre Hep G2 izložene različitim koncentracijama valproata, B) stanice jetre Hep G2 izložene različitim koncentracijama naringina, C) stanice jetre Hep G2 izložene istovremeno različitim kombinacijama valproata i naringina. Tretiranje je trajalo 24 h. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.E. #-statistički različito ($p \leq 0,05$) od kontrole.



Slika 104. Aktivnost katalaze u jetrenim Hep G2 stanicama *in vitro* A) stanice jetre Hep G2 izložene različitim koncentracijama valproata, B) stanice jetre Hep G2 izložene različitim koncentracijama naringina, C) stanice jetre Hep G2 izložene istovremeno različitim kombinacijama valproata i naringina. Tretiranje je trajalo 24 h. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.E . #-statistički različito ($p \leq 0,05$) od kontrole.

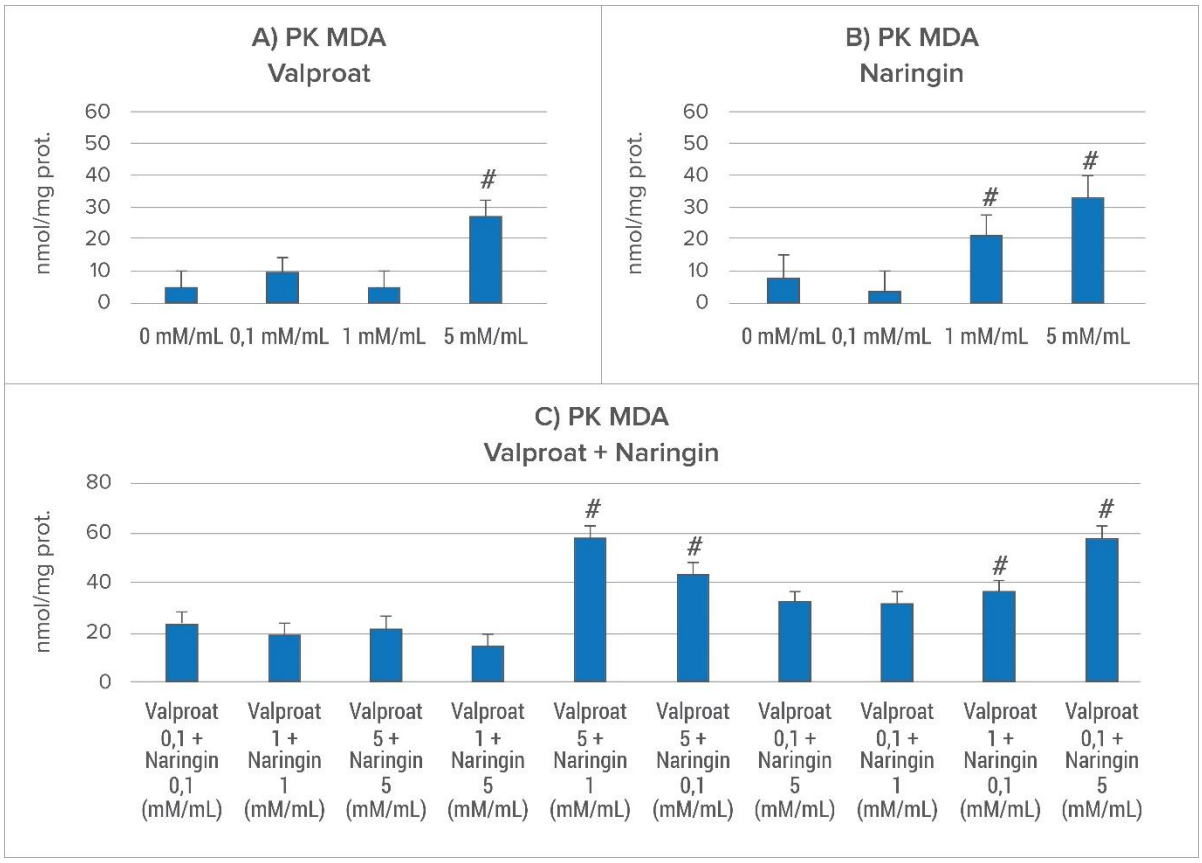


Slika 105. Koncentracija GSH u jetrenim Hep G2 stanicama *in vitro.* A) stanice jetre Hep G2 izložene različitim koncentracijama valproata, B) stanice jetre Hep G2 izložene različitim koncentracijama naringina, C) stanice jetre Hep G2 izložene istovremeno različitim kombinacijama valproata i naringina. Tretiranje je trajalo 24 h. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.E . #-statistički različito ($p \leq 0,05$) od kontrole.

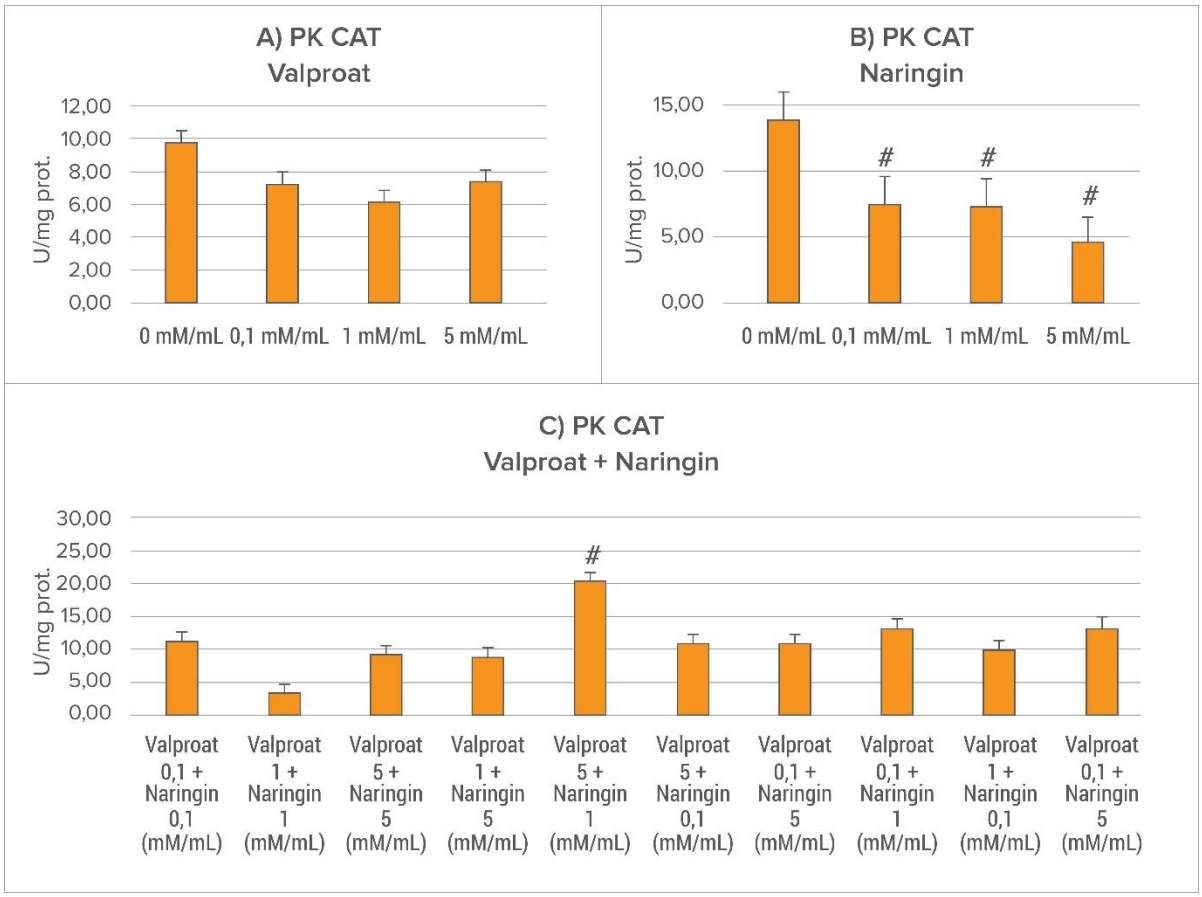
U PK stanica (slika 106) lipidna peroksidacija, izražena kao koncentracija MDA, značajno se povisuje ($p \leq 0,05$) u primjeni valproata od 5 mM/mL, a u tretmanu naringinom, u koncentracijama većim od 1 mM/mL. Zajedničkom primjenom obje tvari, lipidna peroksidacija u PK stanica povećava ($p \leq 0,05$) se primjenom naringina od 0,1 – 5 mM/mL. Aktivnost katalaze u PK stanica (slika 107) nije značajno promijenjena u izloženosti valproatu, dok naringin smanjuje ($p \leq 0,05$) aktivnost katalaze u svim primijenjenim koncentracijama u odnosu na netretirane PK stanice. U kombinacijama valproata i naringina, aktivnost katalaze povećava se samo primjenom visokih doza valproata od 5 mM/mL i naringina od 1 mM/mL.

Razine GSH u PK stanicama u kulturi (slika 110) povećane ($p \leq 0,05$) su nakon izloženosti valproatu u koncentracijama od 0,1 i 1 mM/mL, a smanjene nakon izloženosti naringinu u koncentracijama većim od 0,1 mM/mL. Koncentracije reduciranog glutationa nisu se

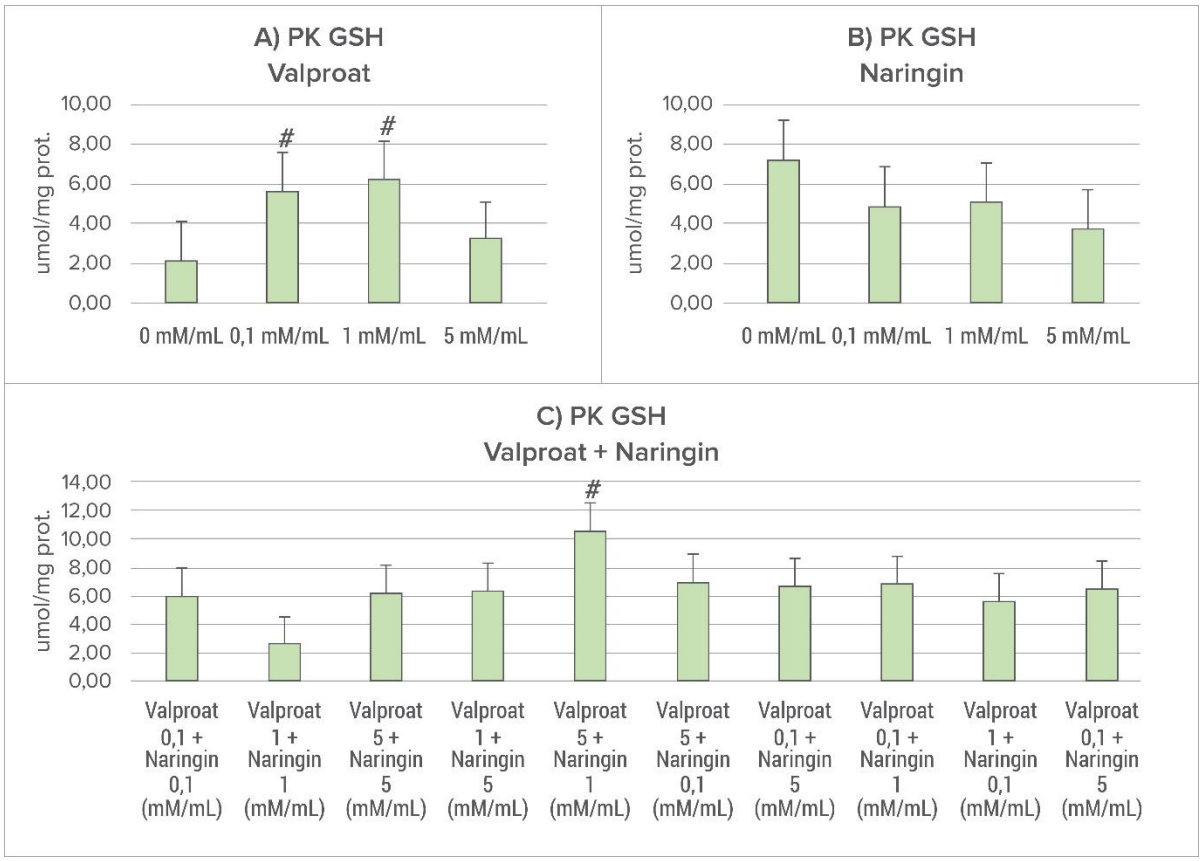
međusobno značajno razlikovale nakon tretmana različitih koncentracija valproata i naringina, osim u tretmanu s 5 mM/mL valproata i 1 mM/mL naringina.



Slika 106. Lipidna peroksidacija određena kao koncentracija MDA u PK stanicama bubrega *in vitro*. A) PK stanice bubrega izložene različitim koncentracijama valproata, B) PK stanice bubrega izložene različitim koncentracijama naringina, C) PK stanice bubrega izložene istovremeno različitim kombinacijama valproata i naringina. Tretiranje je trajalo 24 h. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.E. #-statistički različito ($p \leq 0,05$) od kontrole.



Slika 107. Aktivnost katalaze u PK stanicama bubrega *in vitro.* A) PK stanice bubrega izložene različitim koncentracijama valproata, B) PK stanice bubrega izložene različitim koncentracijama naringina, C) PK stanice bubrega izložene istovremeno različitim kombinacijama valproata i naringina. Tretiranje je trajalo 24 h. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.E . #-statistički različito ($p \leq 0,05$) od kontrole.



Slika 108. Koncentracija GSH u PK stanicama bubrega *in vitro.* A) PK stanice bubrega izložene različitim koncentracijama valproata, B) PK stanice bubrega izložene različitim koncentracijama naringina, C) PK stanice bubrega izložene istovremeno različitim kombinacijama valproata i naringina. Tretiranje je trajalo 24 h. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.E . #-statistički različito ($p \leq 0,05$) od kontrole.

7 RASPRAVA

7.1 Oksidacijski stres i antioksidacijski enzimi u različitim regijama mozga

Rezultati ukazuju da se uzimanjem valproata u pokusnih životinja, od 150 mg/kg tjelesne težine, svakodnevno, tijekom 10 dana, posebice u prednjem dijelu velikog mozga i u središnjoj kori velikog mozga statistički značajno ($p \leq 0,05$) povećava lipidna perorksidacija u odnosu na životinje koje nisu uzimale valproat (slika 8 i 11).

Rezultati se slažu s literaturnim podacima, primjerice, Chaudhary i sur. (140) koji su objavili da valproična kiselina može uzrokovati peroksidaciju lipida u neuronima, iako je pokus proveden *in vitro*, a u ovom pokusu sličan mehanizam pokazan je *in vivo*.

Membrane moždanih stanica posjeduju visoke razine lipida s nezasićenim masnim kiselinama. Nezasićene masne kiseline vrlo su osjetljive na peroksidaciju slobodnim radikalima te se lančana reakcija peroksidacije može lako potaknuti (140). Nadalje, moždano tkivo posjeduje značajno više željeza, a značajno manje koncentracije antioksidansa, u odnosu na tkiva drugih organa, što olakšava indukciju Fentonove reakcije koja proizvodi hidroksil radikle u visokim koncentracijama (140, 141). Od slobodnih kisikovih radikala, hidroksil radikal je najreaktivniji, a s obzirom da je to mala, ali vrlo mobilna molekula ona nespecifično napada i oksidira druge makromolekule (141). Jednom kada se proizvede OH^-, lančano se proizvode OH^- i H_2O_2 kroz Fentonovu reakciju (140).

Valproična kiselina je kratkolančana masna kiselina koja može biti oksidirana Fentonovom reakcijom, a stvara nestabilne radikale valproata koji mogu potaknuti daljnju peroksidaciju lipida i značajno ozljediti mitohondrije (11, 142). Kao što je već spomenuto, valproična kiselina u organizmu ima relativno dug poluživot, između 6 do 16 sati. Ovakvo dugo vrijeme zadržavanja u organizmu (u dozama višim od terapijskih) najvjerojatnije omogućuje stvaranje visokih koncentracija slobodnih kisikovih radikala (141). Slobodni i nestabilni radikali stvaraju se kada nema ravnoteže između prookdisansa i enzima antioksidacijske obrane i oni započinju lančanu reakciju lipidne peroksidacije (141). Oštećenje makromolekula slobodnim radikalima i proizvodima lipidne peroksidacije, kao što su malondialdehid (MDA) i 4–hidroksinonenal (4-HNE), dovodi do poremećaja funkcije neurona i drugih stanica u tijelu (140, 141).

Hussein i sur. (143) pokazuju da se koncentracija MDA statistički značajno povisuje u svim regijama mozga štakora aplikacijom 200 mg/kg i 400 mg/kg valproične kiseline. Banji i

sur. (144) ukazali su da valproat statistički značajno ($p \leq 0,05$) povisuje razine malondialdehida u mozgu u usporedbi s kontrolom. S dozom od 400 mg/kg intraperitonealno, histopatološki su pokazali da valproat može značajno oštetiti Purkinjeove neurone u cerebelumu (144), iako u našim rezultatima s manjom dozom i drugom vrstom životinja nismo uočili značajan porast MDA u malom mozgu. Ornoj i sur. (145) ukazali su da mogu umanjiti oksidacijski stres u mozgu induciran valproatom adenozinmetioninom (145). Al-Amin i sur. (146) pokazali su da astaksantin može ublažiti oksidacijski stres u mozgu uzrokovan valproičnom kiselinom (146). Fu i sur (147) navode da bi se oksidacijski stres koji valproična kiselina uzrokuje u mozgu mogao iskoristiti za liječenje glioma (147). Slično ovim literaturnim podacima naši rezultati ukazuju da valproat inducira lipidnu peroksidaciju u prednjem i središnjem režnju velikog mozga, ali ne u malom mozgu.

U provedenom istraživanju rezultati ukazuju da sve regije mozga ne aktiviraju jednako iste sustave obrane u tri regije mozga aplikacijom valproata. Aktivacija SOD-a specifična je za prednju i središnju koru velikog mozga (Slika 17, 20). U malom mozgu, u kojem nije zabilježena značajna lipidna peroksidacija (oksidacijski stres), sukladno, niti aktivnost SOD-a nije značajno pojačana, ali zato naringin u malom mozgu ipak povećava aktivnost SOD-a (slika 14 i 23). Ovakvi rezultati glavnog antioksidacijskog enzima SOD-a, u potpunosti su sukladni s trendom promjena koncentracije oštećenja lipida lipidnom peroksidacijom i s porastom MDA. Aktivnost obrane je jače pokrenuta u prednjoj kori velikog mozga, u kojoj je i zabilježena jača lipidna peroksidacija i nakupljanje MDA.

Svega nekoliko radova spominje interakciju valproata i SOD-a u *in vivo* sustavima. Na primjer, Lee i sur. (148) pokazali su 2014. godine, da nakon ozljede moždane kralježnice, primjena valproične kiseline (300 mg/kg subkutano) djeluje protektivno na neurone jer odmah nakon ozljede koncentracija superoksidovog aniona se značajno povećava, dok primjena valproične kiseline statistički značajno smanjuje i normalizira povišene koncentracije superoksidovog aniona koje je uzrokovala ozljeda, a usporedno s time smanjila se i apoptoza neurona, kao i otpuštanje citokroma c (148). Drugi radovi, primjerice Long i sur. (149) te Kabakus i sur. (150) spominju antioksidacijsko djelovanje u mozgu kojim valproična kiselina sprječava aktivaciju kaspaza, a pojačava ekspresiju antiapoptotskih molekula kao što je Bcl-2. Tunali i sur. (151) pokazali su da 500 mg/kg valproične kiseline primijenjeno intraperitonealno, u mozgu štakora statistički značajno povećava koncentraciju SOD-a ($p \leq 0,05$) ali i malondialdehida ($p \leq 0,01$) u odnosu na kontrolu (151), što je vrlo slično kao i u ovom radu. Liao G. i sur. (152) zabilježili su značajan porast SOD-a nakon primjene valproične kiseline.

Međutim, u nekim literaturnim izvorima pokazano je da valproat može smanjiti koncentraciju SOD-a te tako dodatno uzrokovati oksidacijski stres. Primjerice Turkyilmaz i sur. (153-154) pokazali su da tretman s visokom dozom od 500 mg/kg valproične kiseline primijenjeno intraperitonealno, u mozgu štakora, dovodi do pojačanja lipidne peroksidacije ($p \leq 0,05$) i smanjenja aktivnosti superoksid dismutaze ($p < 0,05$) (151, 152). Al-Amin i sur. (146) pokazali su smanjenje SOD-a u prenatalnim miševima nakon aplikacije visoke doze od 600 mg/kg valproata intraperitonealno u trudne mišice (146). U ljudi se uglavnom mjerila koncentracija SOD-a u perifernoj krvi. Kod djece su Beltran-Sarmiento i sur. (155) pokazali da valproat dovodi do povećanja koncentracije SOD-a ($p < 0,0001$) u krvi, dok su Zhang i sur. (156) ukazali na smanjenje SOD-a, a Perker i sur. (157) nisu našli značajne razlike (158).

U ovom istraživanju nije bilo statistički značajnih razlika u aktivnosti katalaze u prednjoj i središnjoj regiji mozga iako primjerice združeni tretman u malom mozgu aktivira katalazu (slika 26, 29, i 32). Jornada i sur. (159) navode kako omjer SOD-a i CAT-a mora biti 1:1, jer ako se povisi može doći do povišenih razina hidrogen peroksida, koji kroz Fentonovu reakciju stvara hidroksil radikale i superoksid anione, te povećava oksidacijski stres stanica (159). U ovom radu se koncentracija GSH-a povisila združenim tretmanom u središnjoj kori velikog mozga (slika 38), dok u prednjoj kori i malom mozgu nije bilo statistički značajnih razlika (slika 35 i 41). Ovim rezultatom možemo zaključiti da omjer SOD-a i CAT-a uzrokovan valproatom u ovom radu, nije značajno pojačao oksidacijski stres. Mehanizam nastajanja oksidacijskog stresa valproatom u mozgu vjerojatno je sličan opisanom u Chaudhary i sur. (140) te Zaccara i sur. (11). Zaccara i sur. (11) navode da valproična kiselina može biti oksidirana putem Fentonove reakcije u nestabilne radikale valproata (11), a Chaudhary i sur. (140) da valproična kiselina može dovesti do disfunkcije Na^+/K^+ ATPaze i do aktivacije enzima XO koji stvara superoksid radikale (140). Chaudary i sur. (140), Hussein i sur. (143), Al-Amin i sur. (146), Turkyilmaz i sur. (153, 154), navode da se koncentracija GSH-a statistički značajno smanjila u svim regijama mozga, dok su Tunali i sur. (151) pokazali da koncentracija GSH-a raste u mozgu nakon aplikacije valproične kiseline. Tunali i sur. (151) navode da pod oksidacijskim stresom tkiva pojačavaju sintezu GSH-a (151). Rezultati Al-Amin i sur. (146) i Turkyilmaz i sur. (153, 154) su pokazali da valproična kiselina paralelno smanjuje razine SOD-a i CAT-a, a Tunali i sur. (151) da paralelno podiže razine SOD-a i GSH peroksidaze, s indukcijom peroksidacije lipida. Ti rezultati podupiru i našu rezultate da povišen omjer SOD-a i CAT-a ili drugih peroksidaza nije razlog peroksidacije lipida u ovom radu i da aktivacija SOD-a valproatom

vjerojatno ublažava oksidacijski stres kako su naveli Lee i sur., Long i sur., i Kabakus i sur. (148-150).

Naringin je povisio razine SOD-a u svim dijelovima mozga, a združeni tretman CAT-a u malom mozgu i GSH-a u središnjem dijelu. Naringin se u ovom istraživanju pokazao u mozgu kao antioksidans, ali i djelomično i kao prooksidans jer je uzrokovao peroksidaciju lipida u prednjem režnju velikog mozga koji je bio osjetljiviji od druge dvije regije mozga. Stvaranje MDA bila je čak viša od zasebnog uzimanja valproata. U prednjoj regiji velikog mozga tretman s obje tvari istovremeno nije umanjio lipidnu peroksidaciju koju izaziva svaka tvar zasebno. Istovremenim uzimanjem valproata i naringina u kori prednjeg dijela velikog mozga dolazi do pojačane proizvodnje MDA u odnosu na kontrolu. Vjerojatno je prednji korteks osjetljiviji od druge dvije regije mozga na unos stranih tvari. Ovaj rezultat ukazuje da naringin može djelovati i kao prooksidans, što je također ranije opisano u literaturi. Postoje podaci da u nižim (tzv. katalitičkim) dozama naringin i naringenin paradoksalno postaju prooksidansi te lančano započinju peroksidaciju lipida cikliranjem njihovih fenoksil radikala u reakcijama oksidacije i redukcije (160). Galati i sur. (160) pokazali su da katalaza u prisutnosti hidrogen peroksida oksidira flavonoidni fenolni B prsten u fenoksil slobodni radikal, a on zauzvrat opsežno oksidira glutation te dovodi do njegove deplecije, paralelno iscrpljujući zalihe kisika, što rezultira produkcijom superoksid iona (160). U takvim uvjetima događa se cikličko stvaranje fenoksil radikala redoks mehanizmom gdje se oni stvaraju oksidacijom fenolnog B prstena naringina (160). Superoksid dismutaza pojačavala je ovu reakciju jer je stvarala hidrogen peroksid dismutacijom superoksid iona. Taj je hidrogen peroksid nadalje potaknuo daljnju oksidaciju flavanoidnog fenola sistemom katalaze i hidrogen peroksida. Galati i sur. (160) navode da po tom mehanizmu naringin i naringenin djelomično induciraju peroksidaciju lipida te da su oni po prvi puta zabilježili da flavonoidi (flavanoni s fenolnim B prstenom) kataliziraju oksidacijske reakcije neovisne o ionima tranzicijskih metala kao što su Fe^{2+} , Fe^{3+}, Mn^{2+} i Cu^{2+} (160). Ovo je jedna od najvažnijih spoznaja kod zajedničkog uzimanja valproata i naringina, jer se valproat mehanizmom sličnim Fentonovoj reakciji kroz CYP 450 enzime oksidira u nestabilne i vrlo reaktivne radikale valproata koji pojačavaju peroksidaciju lipida, a štetni su naročito za mitohondrije (11, 142). To znači da naringin i njegov metabolit naringenin kada su prisutni u malim koncentracijama kataliziraju stvaranje ne samo vlastitih fenoksil radikala, nego i nestabilnih radikala valproične kiseline koji značajno pojačavaju peroksidaciju lipida, pa su i iz tog razloga u združenom tremanu koncentracije MDA bile značajno više od kontrole.

Nestabilni radikali valproata se nadalje mogu transformirati i u 4-en-valproičnu kiselinu i 2,4-diene-valproat (11, 14, 160). Oba spoja su štetna (11, 14).

Nadalje, Galati i sur. (160) su zabilježili da glutation štiti flavonoide od kompletnog oksidativnog uništenja, što indicira da su fenoksil radikali inicijatori tog redoks cikliranja (160). Kod viših koncentracija flavonoida od niskih (tzv. katalitičkih), bi se H^+ flavonoida vrlo brzo donirao fenoksil i lipidperoksilnim radikalima zaustavljajući redoks cikliranje fenoksil radikala i lipidnu peroksidaciju. Naringin je relativno slabo topiv u vodi, većina koncentracije koja se proguta razgradi se u crijevima, ima slabu permeabilnost u tijelu, a od ranije je poznato da slabo dopire do mozga, slabije nego primjerice do nekih drugih organa poput jetre (115, 161). Zeng i sur. (115) su u mozgu štakora zabilježili najmanju akumulaciju naringina i naringenina nakon oralnog unosa naringina (115). Iz tih razloga, druga važna spoznaja je da postoji visok rizik pojave katalitičkih doza tih flavonoida u mozgu s posljedičnim prooksidacijskim djelovanjem. Nisu samo niske (tzv. katalitičke) doze flavanoida bitne za njihovo pro-oksidacijsko djelovanje. Finnoti i DeMajo (162) navode da u apolarnom okruženju flavonoidi ne mogu provoditi kiselinsko-bazne reakcije s vodom pa tako izostaju njihovi antioksidacijski oblici. U takvoj situaciji $-COO^-$ radikal masnih kiselina može jedino oksidirati fenolni prsten flavonoida u fenoksil slobodni radikal koji posjeduje snažno prooksidacijsko djelovanje (162, 163). Ovo je treća važna spoznaja. Valproat je razgranata masna kiselina i može se pretpostaviti, nakon uvida u metaboličke redoks mehanizme pretvorbe naringina da se u prisutnosti valproata najvjerojatnije doprinosi i povećanom apolarnom okruženju naringina, koje inducira prooksidacijsko djelovanje narinigina. Naringin tada služi kao katalizator peroksidacije lipida kako je i objašnjeno u nekim literaturnim izvorima (160, 162, 163). Hejnen i sur. (164) navode da postoji jasna povezanost između koncentracije fenola potrebne za 50% inhibicije lipidne peroksidacije (IC50) i elektronsko-donacijskog ili elektronsko-oduzimajućeg učinka supstitucijskih grupa fenolnog prstena te njihove pozicije na prstenu (164). Ovo je četvrta važna spoznaja. Što fenolni prsten posjeduje više elektronsko donirajućih grupa, to više slabi -OH povezanost te se H^+ enola lakše odvaja i donira lipidperoksilnom radikalu, zaustavljajući lipidnu peroksidaciju. Dodavanje hidroksil grupa pojačava antioksidacijsku sposobnost fenolnog prstena (163, 164). Primjerice 3,5-dihydroxynaringin (pyrogallol B-ring) je 70 puta jači antioksidans od naringenina. Nadalje, katehol jezgra (3,4-dihidroksi supstitucija fenolnog B prstena) pridonosi izuzetnoj moćnosti antioksidacijskog djelovanja flavanona (162-164), ali naringin i naringenin katehol jezgru ne posjeduju (162, 163). Te četiri činjenice, kada se kombiniraju sa spoznajom da je moždano tkivo osjetljivo na oksidacijski stres, dovode do

zaključka da se s niskim dozama apliciranog naringina može očekivati pojačana proizvodnja malondialdehida uz peroksidacijsko oštećenje neuronskih ovojnica s naringinom kao katalizatorom (160-164). Ovo je moguće objašnjenje uočenog povećanog nakupljanja MDA u prednjoj regiji velikog mozga pri aplikaciji naringina i valproata iako se točan redoks mehanizam u mozgu mora potvrditi dodatnim pokusima.. Rezultati ipak ukazuju da naringin aktivirajući sustave antoksidativne obrane ipak djelomično djeluje i kao antioksidans unatoč njegovom prooksidacijskom djelovanju pri kojem djelomično povisuje nakupljanje koncentracije MDA u niskim dozama. Glavni rezultati koji na to ukazuju su da je aktivnost superoksid dismutaze statistički značajno povišena u svim regijama mozga aplikacijom naringina u odnosu na netretirane skupine, posebice u prednjoj kori, ali i u središnjoj kori velikog mozga, te u malom mozgu. Slično se događa i u kombinaciji naringina s valproatom. Aktivnost katalaze značajno se pojačala u malom mozgu. U prednjem režnju nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti katalaze, ali je postojao trend povećanja. Koncentracija GSH-a značajno se povisila u kori središnjeg dijela velikog mozga u odnosu na skupinu tretiranu valproatom. U prednjoj kori je postojao trend povećanja koncentracije GSH-a, ali rezultat nije statistički značajan. Povećanje koncentracije GSH-a znači da je antioksidacijska obrana bila snažna jer se organizam uspio obnoviti i zaštiti od oksidacije zalihe GSH-a.

Da naringin djeluje kao antioksidans i neuroprotektor potvrđuju i brojna prijašnja istraživanja. Golechha i sur. pokazali su da je naringin snažan neuroprotektor (165-166). Očito je za napomenuti da naringin uzrokuje fiziološke efekte ovisne o dozi. U pokusima opisanim u literaturi, doza od 80 mg/kg najviše je zaustavila lipidnu peroksidaciju, dok je doza od 20 mg/kg imala slabiji efekt. Isto tako je aplikacija 80 mg/kg naringina najviše obnovila koncentraciju glutationa. Nadalje, doza od 80 mg/kg naringina u potpunosti je suzbila pojavu okidanja epileptičkog napadaja pentilenetetrazolom, dok su doze od 40 mg/kg i 20 mg/kg prolongirale vrijeme do neuralnog okidanja u modelu inducirane epilepsije (166). Viswantha i sur. (167), koji su radili meta-analizu anitoksidacijske funkcije naringina u mozgu, navode kako je tretman naringinom statistički značajno obnovio i vratio antioksidacijske enzime u normalu u svim regijama mozga u dosad objavljenim studijama. Na primjer, razine SOD-a, CAT-a, GSH-a su se sve vratile u normalu u raznim bolestima, a MDA razine su se snizile nakon aplikacije naringina (167). Postoje pokusi s nanočesticama naringina (161), koji navode da su nanočestice s naringinom uspješno smanjile slobodne kisikove radikale u *in vitro* neuronima linije SH-SY5Y koji su model Parkinsonove bolesti (161). Nanočestice su sintetizirali jer se naringin većinom degradira u crijevima, apsorbira u drugim organima i slabo dopire do mozga, a

nanočesticama se postiže bolja farmakološka distribucija naringina u mozak. Zaključili su da bi se nanočestice vjerojatno mogle uspješno primjenjivati dopremanjem u mozak inhalacijom na nos i da bi naringin bio dobar lijek za liječenje Parkinsonove bolesti (161). Han i sur. (168) aplicirali su naringin 80 mg/kg intraperitonealno i dokazali da je naringin u dozi od 80 mg/kg obnovio istrošene zalihe SOD-a, CAT-a te povisio razine GSH/GSSG omjera u modelu subarahnoidalnog krvarenja (SAH), a značajno smanjio razine MDA (168). Dokazali su da aplikacija naringina u toj dozi ublažava oksidacijski stres inducrian subarahnoidalnim krvarenjem (168). Cui i sur. (169) pokazali su da naringin u oralnoj dozi od 100 mg/kg/dan značajno smanjuje peroksidaciju lipida i povećava aktivnost superoksid dismuataze u traumatskoj ozljedi mozga (169). Prakshi sur. (170) pokazali su da naringin (40 mg/kg i 80 mg/kg) štiti neurone od oksidacijskog stresa uzrokovanog aluminijem time što smanjuje peroksidaciju lipida i obnavlja zalihe SOD-a, GSH-a i glutation-S-transferaze (170).

U navedenim istraživanjima koristile su se više koncentracije naringina, između 40-80 mg/kg. Te su doze otprilike 2 do 4 puta više od onih kojima smo se mi koristili. Uporabili smo dozu od 25 mg/kg jer bi kod ekstrapolacije na čovjeka to značilo da osoba od 70 kg uzima 1750 mg naringina dnevno, dok bi za četiri puta višu dozu značilo da mora uzeti 7,000 mg čistog naringina dnevno, što bi predstavljalo problem u doziranju za čovjeka, čak da je naringin pripremljen u obliku tableta kao suplement u prehrani bila bi to velika količina za svakodnevnu konzumaciju. Doze su važne, a osobito kod naringina koji ne dopire značajno do mozga, a u nižim dozama djeluje kao prooksidans. Iz literature se zna da je doza lijeka važna za ishod liječenja. Primjerice, kad bi se u liječenju infekcije koristilo samo 30 mg proteina određenog antibiotika tri puta dnevno, a ne 500 mg proteina, koja je učinkovita doza, mogli bismo zaključiti da antibiotik ne djeluje unatoč tome što je izvrstan baktericid u eksperimentalnim uvjetima (170, 171). Hejnen i sur. (164) objavili su da postoji jasna koleracija između koncentracije flavonoida (IC50) koja inhibira peroksidaciju lipida za 50%. Slična teorija može se primijeniti i u ovom pokusu jer, ako je većina studija dobila jasnu čistu antioksidacijsku sliku naringina koristeći se 2 do 4 puta višim koncentracijama naringina nego u ovom radu, onda smo dozom od 25 mg/kg dobili niske tzv. katalitičke koncentracije naringina, što se prikazalo među ostalim i kao naringinsko prooksidacijsko djelovanje, što bi se moglo zaključiti temeljem vrijednosti MDA u mozgu.

Dakle, rezultati provedenog istraživanja u mozgu pokazali su da naringin štiti od lipidne peroksidacije kako je gore navedeno. Međutim, dobili smo obrazac prooskidativnog djelovanja naringina, kao u radu Galati i sur. (160). Vrlo je moguće da se dogodila i reakcija gdje su

naringinovi fenoskil radikali oksidirali glutation. U prednjem režnju zbog pojačane aktivacije SOD-a, glutation se uspio regenerirati. Zauzvrat, to je dovelo i do pojačane peroksidacije jer Galati i sur. (160) navode da GSH štiti fenoksil radikale od daljnjeg oksidacijskog uništenja. Iz tih je razloga moguće da je peroksidacija visoka u prednjem režnju velikog mozga kada se naringin uzme zasebno. Kod uzimanja kombinacije lijekova ipak prevladava antioksidacijsko djelovanje jer paralelno s pojačanjem aktivacije SOD-a, GSH koncentracije rastu u svim dijelovima mozga, značajno u središnjoj kori, a bilježi se i porast aktivacije katalaze u većini dijelova, statistički značajno u malom mozgu. Valproat je aktiviranjem SOD-a također pridonio zaštiti od oksidacije.

7.2 Oksidacijski stres i antioksidacijski enzimi u jetri

U jetri se statistički povećalo oksidacijsko oštećenje lipida odnosno koncentracija MDA aplikacijom valproata, iako je ovo povećanje bilo statistički značajno samo u mužjaka ali ne i u ženki (slika 57 i 58). Aktivnost SOD-a, CAT-a i GSH-a u odnosu na kontrolu bila je bez statistički značajne razlike (slika 65, 68, 71). Tu možemo zaključiti da valproat nije aktivirao sustave antioksidacijske obrane u jetri što je i doprinijelo povećanju lipidne peroksidacije i nakupljanja MDA (5).

I radovi drugih autora ukazuju da valproat uzrokuje oksidacijski stres u jetri. Pourhamad i sur. (79) su uočili povećanje koncentracije slobodnih radikala i smanjenje koncentracije GSH-a u jetri te kolaps električnog potencijala mitohondrijske membrane (79). Jafrain i sur. zabilježili su narušavanje električnog potencijala mitohondrijske membrane i značajan porast slobodnih radikala u hepatocitima (172). Potvrda oksidacijskih procesa u jetri vidljiv je i u serumu. Koncentracije glukoze i amilaze se statistički značajno povećavaju u odnosu na kontrolu (slika 84, tablica 3). Hepatociti statistički značajno ($p \leq 0,05$) otpuštaju amilazu, ali je taj trend uočen samo u mužjaka (tablica 3). Slično je zabilježeno i s otpuštanjem ALT-a (tablica 2). Identični učinci dobiveni su i na staničnim kulturama Hep G2 stanica u ovom radu u dijelu *in vitro*, a rezultati su sukladni s literaturnim podatcima primjerice, Komulainen i sur. (78) su uočili su da se koncentracija slobodnih radikala povećava tretmanom Hep G2 stanica s natrijevim valproatom. Navedeni parametri ukazuju da je došlo do značajnog oksidacijskog oštećenja hepatocita, posebice u mužjaka.

Nema statistički značajnog povećanja produkcije MDA u jetri kada se uzme naringin, odnosno naringin ne pojačava peroksidaciju lipida u jetri (slika 57). Naringin je u jetri statistički

značajno ($p \leq 0,05$) aktivirao SOD u odnosu na valproat, ali samo kod mužjaka (slika 63 i 64). U njih je valproatom postojao trend smanjenja aktivnosti SOD-a u odnosu na ženke (slika 64). Alkalna fosfataza (AP) se u serumu statistički značajno smanjuje u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$) i na grupu tretiranu valproatom ($p \leq 0,05$) uzimanjem naringina (tablica 3). Prijašnji radovi podupiru ove rezultate. Primjerice, naringin posjeduje -OH grupe koje pomažu u antioksidacijskom djelovanju (162-164, 173), a poznato je da aktivira NRF 2, koji aktivira razne antioksidanse kao što su SOD, CAT, GSH, i glutation S transferaza (173), međutim u ovom radu ovaj faktor nije bio satistički značajno različit u odnosu na kontrolu, ali je postojao trend povećanja u svim tretiranim skupinama (slika 54 i 55). U radu Ahmed i sur. (174) aplikacija naringina i naringenina dovela je do statistički značajnog smanjenja peroksidacije lipida u jetri, povećanjem koncentracije GSH-a, aktivacijom SOD-a te smanjenjem ekspresije proapoptotskih gena Bax i kaspaze 3. Također se smanjila steatoza jetre, citoplazmatska vakuolizacija i hidropična degeneracija i nekroza (174). Arafah i sur. (175) zabilježili su da naringin smanjuje propuštanje jetrenih enzima AST, ALT, ALP i bilirubina u serum. Također smanjuje upalu jetre te se tako zaključilo da naringin vjerojatno posjeduje i protuupalno djelovanje (175). Dakle, naringin posjeduje snažnije antioksidacijsko djelovanje u jetri u odnosu na druga dva organa analizirana u ovom radu jer nema značajnog porasta koncentracije MDA u jetri nakon tretmana naringinom. Povećanje glukoze se može objasniti literaturnim podatcima iz kojih je poznato da koncentracije malondialdehida i 4-hydroxinonenala dovode do ozljeda beta stanica gušterače i do rezistencija raznih tkiva na inzulin. Rabinovitch i sur. (176) zabilježili su da MDA dovodi do smanjenja razina DNA i koncentracija inzulina u beta stanicama gušterače, a to smanjenje je ovisno o koncentraciji MDA (173). Dalleau i sur. (177) navode da 4-hidroksinonenal (4-HNE), također produkt lipidne peroksidacije, stvara adukte proteina i tako modificira molekularno signaliziranje što među ostalim može doprinijeti razvoju hiperglikemije i dijabetesa (177). Barrera i sur. (178) navode da se 4-HNE spaja s inzulinskim receptorom i tako dovodi do rezistencije receptora na insulin (178). Druge studije također su pokazale da više razine MDA koreliraju s povišenim koncentracijama glukoze u krvi i posebice sa nastalom rezistencijom tkiva na inzulin (179-184). Dakle, hiperglikemija tretiranih skupina može se objasniti sustavnim povećanjem koncentracije MDA i 4-HNE, zbog pojačane peroksidacije lipida koja se u ovom radu dogodila naročito s združenim tretmanom u bubregu (slika 72) i u kori prednjeg režnja velikog mozga (slika 8). Naši rezultati podupiru gore navedene literaturne navode.

Iz ovog rada se može zaključiti da kombinacija valproata i naringina u jetri djeluje antioksidacijski, jer vraća koncentracije amilaze, AP-a i ALT-a bliže kontrolnim skupinama u odnosu na skupine tretirane valproatom (tablica 2 i 3).

Valproat dovodi do akumulacije lipida u jetri, što također pridonosi peroksidaciji lipida u jetri i nakupljanju MDA. U ovom radu i mi smo zabilježili statistički značajan porast triglicerida u serumu značajnom histološkom akumulacijom u jetri koja se manifestirala kao mikrovesikularna steatoza. Naš rezultat je u skladu s prijašnjom literaturom gdje su steatoza jetre i dislipidemije u serumu, vrlo slični kao i Oil red O bojenje u ovom radu (183-186). Raniji radovi pokazali su da valproat modulira i mijenja ispoljavanje gena koji upravljaju peroksisomalnom i mitohondrijskom beta oksidacijom masnih kiselina te i one koji upravljaju transportom lipida i masnih kiselina u stanicu i izvan nje (86, 185-188), a poznato je od ranije da valproična kiselina djeluje kao inhibitor histonskih deacetilaza (24, 25). Taj je mehanizam zaslužan za moduliranje gena te kao takav djeluje na ekspresiju raznih gena. Poznato je da valproat povećava ekspresiju proteina CD36 (86, 185-187). CD36 je translokaza masnih kiselina u jetri te omogućuje brzi transport lipida u jetri. Također valproat povećava ekspresiju diacilglicerol aciltransferaze 2 (DGAT 2) i glycerol-3-fosfat aciltransferaze (GPAM) (85, 185-187). To su enzimi koji kataliziraju staničnu sintezu triacilglicerola (184-186). Akumulacija masnoća u jetri može biti i rezultat sistemske serumske hiperglikemije, ali je također vjerojatno da je rezultat povišenog unosa lipida u jetru, te smanjene potrošnje i katalizacije masnih kiselina, a taj mehanizam su Aires i sur. dobro objasnili (188). Oni su pokazali da metabolit valproata, valproil-CoA, inhibira karnitin palmitoil-transferazu I (CPT1), koji je glavni limitirajući enzim mitohondrijske beta oksidacije. Povećanje kolesterola u serumu može se objasniti rezultatima Lee i sur. (86) koji su pokazali da valproična kiselina modulira gene upletene u konverziju mevalonata u isopren iz kojeg se sintetizira kolesterol, a to dovodi do povećanja koncentracije kolesterola. Tako da naše rezultate hepatičke steatoze i povećanja lipida i kolesterola u krvi podupiru i druge studije (86, 185-188). Kada je apliciran s valproatom, naringin je smanjio koncentracije lipida u serumu i jetri. Poznato je iz prijašnjih radova da naringin smanjuje ekspresiju gena za transport triglicerida, a to su geni za protein vezivanja na masne kiseline (iz engl. "fatty acid binding protein 1", FABP1) kao i CD36 u hepatocitima (189-190).

U ovom istraživanju prikazani rezultati o razini transkripcijskih faktora su se do sada u literaturi manje analizirali u *in vivo* pokusima, i predstavljaju inovativni doprinos tematici. PPARα glavni je regulator metabolizma masnih kiselina. Kada je proizvodnja PPARα izraženo

stimulirana, njegovo djelovanje smanjuje razine triglicerida. Osim toga, PPARα podiže razine HDL-a, posjeduje protu-upalna i protutrombotska svojstva (191). PPARα je reguliran kofaktorom PPARG1α čija ekspresija, čak i ako je samo umjerena, na primjer na 25%, poboljšava mitohondrijsku biogenezu, osjetljivost na inzulin u mišićima koji su otporni na inzulin, ali i u zdravim mišićima, te inducira oksidaciju masnih kiselina, glukoneogenezu, termogenezu, i ekspresiju PPARα pa tako započinje metabolizam lipida (192-193). Valproat je značajno smanjio razine PPARα i PPARG1α u krvi miševa u ovom eksperimentu (slika 45 i 48). Naringin te parametre nije mijenjao, a razine tih transkripcijskih faktora u zajedničkom tretmanu povisile su se i vratile sličnim vrijednostima kao u kontroli. Naringin je dakle značajno umanjio efekte valproata nad transkripcijskim faktorima metabolizma lipida. Ranije su *in vitro* Zhang i sur. (190) pokazali molekularne mehanizme značajno smanjenih unutar staničnih koncentracija triglicerida za 52,7% koje je uzrokovao naringin u laboratorijski proizvedenoj masnoj jetri (190). Analiza molekularnog pristajanja pokazala je da se naringin veže za CD36 i PPARα (190). Naringin je smanjio ekspresiju CD36 i tako smanjio unos slobodnih masnih kiselina u stanice jetre. Nadalje, smanjio je ekspresiju acetilCoA karboksilaze i sintezu masnih kiselina te tako smanjio liposintezu *de novo*. Razine VLDL-a koji se luči iz stanica jetre smanjile su se za 24,7% nakon tretmana naringinom u njihovom *in vitro* modelu. Autori su zaključili da je naringin poboljšao metabolizam lipida smanjivši unos masnih kiselina i *de novo* lipogenezu te pojačavši oksidaciju masnih kiselina. Čini se, prema literaturi, da su CD36 i PPARα specifične mete naringina (190). Mi smo njihove *in vitro* rezultate dobili, odnosno ponovili u *in vivo* C57BL6 modelu miša.

Nadalje, u našim rezultatima analizirali smo koncentraciju peroksisomalne acil-koenzim A oksidaze 1 (ACOX 1), limitirajućeg enzima peroksisomalne oksidacije masnih kiselina. Peroksisomalni ACOX1 lociran je u peroksisomima i tu je prvi enzim oksidacijskog puta masnih kiselina. ACOX1 katalizira desaturaciju acil-koenzima A u 2-trans-enoil-koenzim A. Izoforma 1 ima najveću aktivnost s lancima masnih kiselina srednje veličine, a njena aktivnost smanjuje se povećanjem dužine lanca. ACOX 1 regulira peroksisomalnu fiziju i oksidaciju masnih kiselina i opću homeostazu lipida te generira prekurzore metabolita i energiju. Općenito je poznato da PPARα regulira ekspresiju ACOX1 (194-196). Varanasi i sur. (196) sugeriraju da je njihov rad pokazao da aktivacija PPARα inducira ekspresiju ACOX1 (196). U ovom su radu koncentracije ACOX1 enzima bile povišene unatoč smanjenim koncentracijama PPARα. Očekivali smo, sukladno već poznatom, da će smanjene koncentracije PPARα rezultirati niskom ekspresijom ACOX1 enzima. Vrlo je malo radova opisalo međusobno djelovanje i

ravnotežu između PPARα i ACOX1. Postoji nekoliko ranijih radova koji impliciraju slične rezultate, ali novijih radova nema. Ayoma i sur. (197) pokazali su da oksidacija vrlo dugih lanaca masnih kiselina nije bila različita između divljih miševa i onih s knockoutom PPARα. Prema tim autorima miševi s knockoutom PPARα imali su normalne razine ACOX1 u peroksisomima. To znači da se unatoč nepostojećim koncentracijama PPARα, ACOX1 ekspresija dogodila. Vamecq i sur. (198) pokazali su da se CoA ester valproata i njegov delta-4-ene derivat oksidiraju u peroksisomima s acilCoA oksidazom koja je različita od uobičajenih peroksisomalnih oksidaza za masne i žučne kiseline. Ponchaut i sur. (199) pokazali su da tretman valproatom inducira proliferaciju peroksisoma uz povećanje aktivnosti peroksisomalnih enzima oksidacije masnih kiselina. Ti autori (199) implicirali su mogućnost da se peroksisomalna acilCoA oksidaza aktivira valproatom ili nekim njegovim metabolitom jer je tretman valproatom u njihovom radu doveo do male ali značajne produkcije hidrogen peroksida. Van den Branden i sur. (200) navode da valproat ne inhibira aktivnost perksisomalne acil CoA oksidaze. Aplikacijom nižih koncentracija valproata moguće je da peroksisomi preuzmaju oksidaciju masnih kiselina od inhibiranih mitohondrija. Iz knockout miševa je također poznato da druga tkiva kompenziraju svojom PPARα aktivnošću kada je jetreni PPARα inhibiran, i to povećanjem ekspresije Acil CoA oksidaza i lipaza (201). I drugi radovi (202-204) također pokazuju da uklanjanje ili disrupcija signalizranja u funkciji ACOX1 enzima dovodi do proliferacije peroksisoma, razvijanja hepatokarcinoma i povišene ekspresije PPARα. Nadalje, poznato je iz literature da peroksisomalni proliferatori stimuliraju protein kinazu C (194, 205, 206). Kada je valproat smanjio ekspresiju PPARα, onda se smanjila ekspresija protein kinaze C. Smanjena ekspresija protein kinaze C, dovela je do povišene ekspresije ACOX1. Yaacob i sur. (206) opisuju da su statini, poput fenofibrata i ciprofibrata, povisili ekspresiju ACOX bez utjecaja na PPARα. Inhibicija protein kinaze C uporabom bisindolylmaleimid ili calphostin C smanjila je ekspresiju PPARα, a to nije imalo utjecaja na ekspresiju ACOX gena. Forbol-12-miristat-13-acetat povisio je razine PPARα mRNA bez promjene u ACOX mRNA koncentracijama. Upletena u metabolizam lipida inače smanjuje koncentracije triglicerida, povećava HDL i djeluje protuupalno, a povisuje razine ACOX-1 gena koji stvara H_2O_2. Naringin je smanjio proliferaciju peroksisoma i pojačanu ekspresiju ACOX1 enzima jer je doveo do normalizacije PPAR α koncentracija (slika 49 i 52).

Metaboličko djelovanje naringina u ovom radu se pokazalo i s normalizacijom koncentracije amilaze, te s modulacijom ekspresije AP-a (Tablica 3). Od ranije se zna da akumulacija masnoća u jetri i adipozitet dovode do povišenih razina amilaze u serumu (206,

207). S ovim rezultatom se također može zaključiti da je naringin vrlo vjerojatno umanjio ili eliminirao upalu gušterače koja je povezana s uzimanjem valproata, ali i s hepatosteatozom (209-212). Od lijekova valproat najčešće uzrokuje upalu gušterače (209). Protektivno djelovanje naringina na gušteraču dokazano je i ranije (213, 214). Vrlo je vjerojatno dakle da je hiperglikemija u ovom radu nastala zbog smetnji u signalnim putevima inzulina kao rezultat formiranja adukta raznih proteina s 4-HNE, kao što su opisali Dalleau i sur. (177) i Barrera i sur. (178), a ne zbog ozljeda stanica gušterače. Nadalje, AP razine rastu kod steatohepatoze/hepatitisa ali i kod povišenog unosa masnoća, pa su smanjene razine AP-a u ovom radu (Tablica 3) daljnji dokaz antilipidnog djelovanja naringina (215).

7.3 Oksidacijski stres i antioksidacijski enzimi u bubregu

U ovom radu je valproatom statistički značajno povećano lipidno oštećenje u bubregu (p = 0,0188). Paralelno, uz pojačanje produkcije malondialdehida, zaliha se glutationa GSH smanjuje (p=0,0359). Statistički su se značajno povisili ureja i kalij u odnosu na kontrolu, a pratilo se i povećanje koncentracije kalcija iako nije bilo statistički značajno. Navedeni rezultati sugeriraju početak razvijanja Fankonijevog sindroma induciranog oksidacijskim stresom izazvanog valproatom (90-95). Rezultati elektrolita impliciraju disfunkciju pumpe za kalij i natrij, kao i kalcijeve ATPaze koja je glavna efluks pumpa za kalcij u proksimalnim kanalićima bubrega (92, 216-218). Pretpostavljamo da bi se kasnije razvila tipična slika Fankonijevog sindroma s hipokalemijom i hipokalcemijom (90-95). Te rezultate podupire prijašnja literatura, gdje se kao najvjerojatniji uzrok nastanka Fankonijevog sindroma tretmanom valproične kiseline navodi oksidacijski stres. Heidari i sur. (92) zabilježili su da aplikacija valproične kiseline u bubregu uzrokuje porast slobodnih radikala, smanjuje antioksidacijsku aktivnost enzima, povećava lipidnu peroksidaciju i smanjuje zalihe glutationa, kao i u ovom radu. Slično su zabilježili i Patel i sur. (94) koji su primijetili smanjenje zaliha glutationa u bubregu nakon tretmana valproatom. Druge studije pokazale su oštećenja mitohondrija te kolaps mitohondrijskog membranskog potencijala i povećanja oksidacijskog stresa (92). Poznata je korelacija između disfunkcije mitohondrija, pada mitohondrijskog potencijala ovojnice i povećanja oksidacijskog stresa (92, 219-220). Oksidacijski stres u bubregu, kao i u drugim tkivima, dovodi do upale, najčešće putem indukcije NF-kappaB, a uzrokuje i oštećenje makromolekula, koje dovode do disfunkcije raznih organela, poput mitohondrija (220). Mnogi radovi navode disfunkciju bubrežnih mitohondrija kao jedan od glavnih uzročnika nastanka

Fankonijevog sindroma (70, 219-220, 222-225). Singer i sur. (222) pokazali su morfološki izobličene mitohondrije u sedmogodišnjem djetetu koje je razvilo Fankonijev sindrom nakon liječenja valproičnom kiselinom. Pod mikroskopom su bile vidljive degenerativne promjene mitohondrija (222). Zaključili su da je uzrok takvih promjena bilo oštećenje mitohondrija zbog inhibicije beta oksidacije masnih kiselina (222). Stanice proksimalnih kanalića bubrega vrlo su važne jer upravo one obavljaju većinu najvažnijih funkcija bubrega, poput filtracije krvi i reabsorpcije elektrolita. Mitohondriji tih stanica proizvode 95% energije za obavljanje takvih funkcija (70, 92, 219, 222, 223). Pumpa natrija i kalija koristi ATP kako bi održavala svoju funkciju (216). Kada razine ATP-a padnu, naprimjer kada je blokirana beta oksidacija masnih kiselina ili zbog pada električnog potencijala ovojnice mitohondrija, dolazi do abnormalne sekrecije i reabsorpcije elektrolita i drugih molekula (90, 222). Važna spoznaja u Fankonijevom sindromu je da niti distalni nefron ne absorbira ono što bi se trebalo reabsorbirati u proksimalnom, a to je također povezano s niskim razinama ATP-a, disfunkcijom transportera i propustljivosti ovojnica (90). Međutim, u ovoj studiji valproat statistički značajno aktivira CAT u bubregu u odnosu na kontrolu i značajno podiže njenu aktivnost (p=0,0022) u odnosu na naringin (p=0,0074). Druge sustave obrane valproat statistički značajno ne aktivira. Rezultati koncentracije proteina u serumu ukazuju da se nije statistički značajno razvila proteinurija u miševima nakon liječenja valproatom. Ti rezultati impliciraju da valproat djeluje i antioksidacijski te da ima i renoprotektivne učinke. To podupiru i druge studije (226-231). Na primjer, Van Benden i sur. (226) pokazali su da predtretman valproičnom kiselinom prevenira nastanak proteinurije i glomeruloskleroze koje uzrokuje adriamicin. U tom pokusu valproat je kao HDAC inhibitor smanjio pojačanu ekspresiju proupalnih i profibrotičnih gena te depoziciju kolagena i infiltraciju makrofaga u bubregu. Apoptoza glomerula je također inhibirana (226). Uz to Costalonga (227) pokazali su da valproična kiselina u dozi od 300 mg/kg dva puta dnevno štiti bubreg od ishemijsko-reperfuzijske ozljede bubrega. Navode da je valproična kiselina smanjila oksidacijski stres, smanjila ekspresiju proupalnih gena te tako značajno umanjila akutnu tubularnu nekrozu u intervalu od 48 h. Te rezultate podupiru i radovi drugih autora, primjerice Zacharias i sur. (228), Speir i sur. (229), te Brar i sur. (230). Zacharias i sur. (228) navode da 300 mg/kg valproata štiti bubrežne stanice u hemoragijskom šoku od apoptoze jer on fosforilira Akt kinazu koja inhibira BAD proapoptotski protein. To poboljšava funkciju Bcl-2 proteina. Speir i sur. (229) navode da valproična kiselina (150 mg/kg) i.p. smanjuje ekspresiju proupalnih citokina, apoptozu i povećava regeneraciju stanica te tako štiti od ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Brar i sur. (230) navode da modulacija i regulacija GABA receptora natrijevim valproatom u dozi od 300 mg/kg i.p., dovodi do smanjenja oksidacijskog stresa u

bubrezima nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede (230). Biesterveld i sur. (231) su 2021. godine pokazali protektivno djelovanje valproične kiseline u jednoj dozi od 150 mg/kg u bubregu kod masivne hemoragije i kod politraume (231). Sumarno, vidi se da valproat štiti od oksidacijskog stresa te tako smanjuje upale i prevenira apoptozu u bubregu. Doze kojima su se ti radovi koristili, bile su oko 300 mg/kg, ali neki su se koristili 150 mg/kg kao što smo mi, no oni su koristili kraće intervale doziranja. Primjerice Speir i sur. (229) i Biestervald i sur. (231) istraživali su jednu dozu valproične kiseline od 150 mg/kg u akutnoj ozljedi bubrega, dok su se drugi koristili s 300 mg/kg (217-219, 221). Costalonga i sur. (227) su, na primjer, koristili 300 mg/kg dva puta dnevno, tijekom dva dana. Jedan od razloga snažnog protektivnog učinka na bubreg kratkoročnim liječenjem, može biti da valproična kiselina u prvih šest sati djelovanja potiče ekspresiju EHHADH gena koji kodira za jedan od četiri enzima u peroksisomalnoj beta oksidaciji (232, 233). Tako, inicijalno, potiče peroksisomalnu beta oksidaciju masnih kiselina jer je sama valproična kiselina po strukturi masna kiselina (86). U hepatocitima su Lee i sur. (86) i Grinberg i sur. (232) zabilježili da je indukcija EHHADH gena ovisna o dozi i vremenskom intervalu tretiranja i da ne traje duže od 72 sata (3 dana). Ako se slično događa u bubregu, mehanizam protekcije kratkoročnog tretmana valproatom može biti indukcija EHHADH gena uz indukciju katalaze koji pridonose zaštiti od oksidacijskog stresa. Raniji radovi su pokazali da niske razine ili inhibicija gena EHHADH dovodi do akumulacije masnih kiselina u stanicama proksimalnih kanalića bubrega, što rezultira oksidacijskim stresom, kolapsom mitohondrijskog potencijala ovojnice, ozljedom stanica proksimalnih kanalića i u konačnici do razvijanja Fankonijevog sindroma (221-224, 233-236). Iako iz praktičnih razloga PPAR transkripcijski faktori nisu analizirani u ovom radu u bubregu, ako naringin na te molekule djeluje kao u jetri, onda bi mogao biti zaštita od Fankonijevog sindroma (219-224, 233-234). Ding i sur. (236) su već pokazali da naringin i u bubregu aktivira PPAR proteine i tako štiti bubreg od dijabetičke nefropatije.

Naringinom se u bubregu statistički značajno povećava produkcija MDA (p=0,0017). U bubregu naringin puno jače oštećuje lipide od valproata. Uzrok tomu su vjerojatno katalitičke doze naringina i naringenina u bubregu i ciklus oksidacije potaknut s tim flavonoidima koji je objašnjen u dijelu rasprave u kojem se raspravljalo o promjenama u mozgu. Bubreg u ovojnicama svojih stanica također ima nezasićenih masnih kiselina. Normalne membrane proksimalnih tubula miša imaju 20% stearinske kiseline, 30% palmitinske kiseline, 11% oleinske kiseline, 7% linoleične kiseline i 23% arahidonske kiseline (237). Takvo okruženje, s visokim razinama polinezasićenih masnih kiselina izvrsna je podloga za katalizaciju lipidne

peroksidacije naringinom. Dodatno, hidroksil ioni (OH^-) mogu aktivirati CYP4502E1 enzim u proksimalnim kanalićima koji onda služi kao izvor željeza za lančanu proizvodnju OH^- iona kroz Fentonovu reakciju, i tako se dodatno pojačava oksidacijski stres u bubregu (238).

Aktivnost SOD-a pojačala se u bubregu u grupi tretiranoj samo naringinom u odnosu na skupinu tretiranu valproatom ali, bez statistički značajne razlike. Mnoge studije podupiru antioksidacijsko i protektivno djelovanje naringina i naringenina na bubreg. Primjerice, Singh i sur. (239) navode kako je predtretman naringinom u dozama od 100 mg/kg, 200 mg/kg, i 400 mg/kg rezultirao normalnom funkcijom bubrega, smanjio morfološke promjene i povećao zalihe antioksidacijskih enzima kod ozljede bubrega glicerolom (239). Gandhii sur. (240) kažu da naringin i naringenin djeluju protektivno kroz antioksidacijsku obranu u dijabetičkim inzultima na bubreg te da bi bili dobri kandidati u liječenju bubrežnih ozljeda u dijabetesu. Choturou i sur. pokazali su da naringin u dozama od 25 mg/kg, 50 mg/kg i 100 mg/kg može uspostaviti normalnu funkciju bubrega, obnoviti zalihe antioksidacijskih enzima i smanjiti ekspresiju upalnih gena u ozljedi bubrega uzrokovanu cisplatinom (241).

Antioksidacijsko djelovanje naringina može se vidjeti i u našim rezultatima. Primjerice, nije se razvila proteinurija, što implicira da glomeruli nisu oštećeni. Statistički značajnih razlika u razinama kreatinina nije bilo, a razine ureje su ostale slične kontroli. Dakle, sumarno, u odnosu na tretman valproatom, tretman naringinom je manje ozlijedio bubreg lipidnom peroksidacijom iako je produkcija MDA bila viša.

Uzimanjem kombinacije valproata i naringina u bubregu dolazi do statistički značajno najvišeg porasta lipidne peroksidacije s produkcijom MDA ($p=0,0032$) u odnosu na kontrolu. Uzrok tomu je vjerojatno sponatana Fentonova reakcija, i rizični faktori oksidacijskog stresa u bubregu, kao što je i ranije opisano (11, 160, 237, 238). U tretmanu kombinacijom, koncentracija valproata, koji je po prirodi razgranata masna kiselina pojačava apolarno okruženje, što je izvrsna podloga za prooksidacijsko djelovanje naringina (160). Uz to i sam valproat inducira lipidnu peroksidaciju kao što je ranije objašnjeno. Paralelno s ovim rezultatom su se razine glutationa statistički značajno spustile, što implicira da se formirao 2,4-diene-valproat (14), dok je aktivnost CAT-a bila bez statistički značajne razlike. Unatoč tomu nije se razvila proteinurija, a razine ureje i kalija su se vratile u kontrolne vrijednosti, što implicira da naringin djeluje renoprotektivno bez obzira na povišene razine MDA-a. Zanimljivo je da se peroksidacija lipida nije dogodila u jetri aplikacijom naringina i združenog tretmana u ovom radu. Zeng i sur. (116) su u štakorima zabilježili značajno veću akumulaciju naringenina u jetri (21, 423 ng/g) nego u bubregu (12, 706 ng/g) i u mozgu (75, 9 ng/g) nakon oralnog unosa

naringina (42 mg/kg) (116). To znači da je veća koncentracija naringenina u jetri suzbila cikliranje naringinovih i naringeninovih fenoksil radikala i zaustavila lipidnu peroksidaciju, kao što smo objasnili u dijelu rasprave o promjenama u mozgu, dok je nedostatak tih koncentracija u bubregu omogućio lančanu peroksidaciju cikliranjem fenoksil radikala tih flavonoida spontanom Fentonovom reakcijom. Nadalje, koncentracije naringina u jetri i bubregu su bile slične, pa su visoke koncentracije metabolita naringenina vjerojatno najviše zaslužne za prekid peroksidacije.

Povišene razine MDA ipak su imale štetne posljedice u organizmu miševa koji je vidljiv u rezultatima ovog rada. Uočen je statisitčki značajan pad globulina u serumu. Manje je vjerojatno da je došlo do ozljede laminina (Lama 5), kolagena tipa IV ili drugih proteina glomerulne ovojnice jer bi u tom slučaju došlo najprije do gubitka albumina koji je veličinom manji od globulina (242-243), pa bi razine ukupnih proteina i albumina bile statistički značajno niže od kontrole (243). Više je vjerojatno da su visoke koncentracije MDA i 4-HNE smanjile produkciju globulina. Zna se da njihove visoke koncentracije dovode do višeg mortaliteta u bolesnika sa sepsom, i da je taj mortalitet povezan s niskim razinama globulina (244, 245). Nadalje, od ranije je poznato da MDA i 4-HNE izazivaju mutageneze, te da su povezani s brojnim malignim bolestima (177, 178, 246-248), pa je moguće da su s tim mehanizmom umanjili sintezu globulina u limfocitima miševa ovog rada. Razlog njihovih smanjenih koncentracija trebao bi se ispitati i utvrditi u budućim pokusima analizom urina, krvnih stanica, te elektroforezom proteina u serumu.

Bitno je spomenuti da značajno smanjenja koncentracija AP-a uz normalizaciju kalija i ureje naringinom i s kombinacijom u ovom radu (Tablica 3) implicira da je došlo do poništenja nastajanja Fankonijevog sindroma, jer su raniji radovi opisali da je AP u Fankonijevom sindromu značajno povišen (91, 92). Štoviše, naš rezultat AP-a sugerira da bi naringin mogao smanjiti mortalitet bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem (249). Kovesdy i sur. (249) zaključili su da su visoke koncentracije AP-a povezane s visokim mortalitetom u bolesnika s KBZ-om, vjerojatno jer AP hidrolizira pirofosfat koji je snažan inhibitor kalcifikacije krvožilnog sustava, ali i zato što su visoke koncentracije AP-a povezane s nisikim koncentracijama Vitamina D. Naringin je statistički značajno povisio koncentracije Vitamina D2 i D3 u radu Gerçek i sur. (250).

Sumarno, tretman kombinacijom i naringinom je vratio razine kalija, kalcija, AP-a, i ureje bliže kontroli, pa su tako jasno vidljivi renoprotektivni učinci naringina. Iako je došlo do lipidne peroksidacije koja je ostavila posljedice, vrlo je moguće da naringin štiti bubreg od

oksidacijskog stresa valproatom. Izbjegavanje katalitičkih doza naringina, primjenom viših doza, na primjer 40 ili 80 mg/kg bi mogla zaustaviti peroksidaciju lipida, i tako u cijelosti zaštiti bubreg i cijeli organizam.

6.4 Vijabilnost stanica i promjene pokazatelja oksidacijskog stresa u jetrenim HepG2 i PK15 stanicama bubrega in vitro

Rezultati *in vitro* pokusa u ovom radu ukazuju da bi *in vitro* model mogao biti predskazatelj *in vivo* odgovora stanica na navedene tretmane, te da bi *in vitro* mogao zamjeniti *in vivo* model eksperimentiranja. Naringin i njegov metabolit naringenin kataliziraju Fentonovu reakciju koja stvara visoke koncentracije toksičnih metabolita valproata kako je ranije objašnjeno. Zbog toga CYP450 enzimi nisu glavni proizvođači štetnih metabolita *in vivo* niti *in vitro* u ovom radu. Inače oni metaboliziraju samo 10% valproata *in vivo* (6, 14). Sumarno ove spoznaje impliciraju da općenito zanemariva aktivnost CYP450 enzima u HepG2 stanicama *in vitro*, kako je opisao Komulainen i sur. (78), ne čini značajnu razliku u koncentracijama štetnih metabolita valproata i hidroksil radikala flavonona između *in vitro* i *in vivo* pokusa u ovom radu. Ta teza je potvrđena rezultatima oksidacijskog stresa koji su vrlo slični *in vitro* i *in vivo*, iako su se neki odgovori stanica na oksidacijski stres međusobno razlikovali.

Nastavno, zanimljivo je da između koncentracija od 0 mM i 0,5 mM naringina, vijabilnost stanica tretiranih s 0mM/ml i 1mM/ml valproata blago opada, a pri koncentarcijama višim od 0,5 mM naringina vijabilnost opet raste (slika 102). Ovi rezultati ukazuju da je Galatijev i sur. (160) obrazac ponašanja naringina vjerojatno prisutan i u *in vitro* modelu i to podupire gore navedenu tezu da se Fentonova reakcija s katalizatorom naringinom događala jednako *in vitro* i *in vivo*.

Parametri oksidacijskog stresa *in vitro* s HepG2 stanicama i *in vivo* u hepatocitima su vrlo slični i podudaraju se s prijašnjom literaturom. Zabilježen je i značajan ($p \leq 0,05$) porast koncentracije MDA s dozom od 1,0 mM/ml valproata u HepG2 stanicama (slika 103). Pourahmad i sur. (79) zabilježili su *in vitro* značajan porast ROS-a u HepG2 stanicama s dozom od 100 μM vaproata. Jafarian i sur. (171) pokazali su značajan porast MDA nakon tretmana valproatom s 50 μM, 100 μM, i 200 μM. Komulainen i sur. (78) zabilježili su porast koncentracije superoksid (O^{2-}) iona s dozom valproata od 1,0 mM i 2,0 mM, a s 2,0 mM i značajan pad vijabilnosti HepG2 stanica. Oni su zaključili da je koncentracija 0,5 mM valproata terapeutska doza, dok je koncentracija od 1,0 mM ili 2,0 mM toksična doza, a smrt stanica

povećavala se vremenom i dozom tretmana. Naši rezultati s valproatom najviše se podudaraju s Komulainen i sur. (78). U *in vivo* dijelu ovog rada u jetri, koncentracije MDA bile su povišene samo u mužjaka u skupini tretiranoj valproatom, vjerojatno kao posljedica dodatnog prooksidacijskog djelovanja testosterona (slika 57). Skupina tretirana naringinom imala je statistički značajno (p=0,48) niže koncentracije MDA od skupine tretirane valproatom, a nisu se značajno razlikovale od kontrolne skupine (slika 57), isto kao i u *in vitro* pokusu (slika 103), gdje također nije bilo statistički značajnih razlika u MDA koncentracijama između skupina tretiranih s različitim koncentracijama naringina i kontrolne skupine. Jedino je skupina tretirana s više of 1 mM/ml naringina zbog pada vijabilnosti HepG2 imala i posljedični značajan pad koncentracije MDA (slika 102, 103). Zhang i sur. (190) zaključili su da je naringin siguran za HepG2 stanice u rasponu između 1nM i 0,1 mM (100μM). To znači da je gornja granica sigurnosti naringina u ovom pokusu bila deset puta viša nego što je ranije opisana. Naringin je dakle imao slične učinke *in vitro* i *in vivo* u ovom pokusu. Pri zajedničkoj izloženosti objema tvarima *in vitro* (slika 103, 105) lipidna peroksidacija je značajno povećana ($p \leq 0,05$) samo pri kombinacijama koje su imale koncentraciju od 5 mM valproata i 0,1 ili 1 mM/mL naringina, a pratio se pad vijabilnosti HepG2 stanica u združenom tretmanu pri svim dozama valproata, a naringina s višim dozama od 1 mM/ml (slika 102). Moguće je da je 0,1 mM/ml naringina katalitička doza koja djeluje kako je ranije opisano u ovom radu, dok je 1 mM/ml toksična doza za HepG2, pa je potrebno modulirati dozu kako bi se postigao antioksidacijski učinak. Isto tako je moguće da je doza od 5,0 mM valproata previše visoka za koncentraciju naringina od 0,1 i 1 mM/ml, te da se doza naringina mora prilagoditi kako bi se postigao pozitivan učinak. *In vivo*, nakon tretmana s kombinacijom nije bilo statistički značajno povišenih koncentracija MDA u odnosu na druge skupine. Ovi rezultati impliciraju i da hormoni utječu na antioksidacijsku obranu.

In vivo nije bilo statistički značajnih razlika u aktivnosti CAT-a između tretiranih skupina u stanicama jetre (slika 66), dok se *in vitro* statistički značajno povisila aktivnost pri dozi valproata od 0,1 mM/ml, a spustila nakon pada vijabilnosti stanica u tretmanu s naringinom pri dozi od 5mM/ml (slika 104). Pri ranije opisanim toksičnim dozama naringina i valproata u združenom tretmanu se aktivnost CAT-a također povisila *in vitro*. Raniji radovi nisu istražili aktivnost katalaze u Hep G2 stanicama izloženih valproatu.

U HepG2 stanica u staničnoj kulturi nisu zabilježene značajne promjene u koncentraciji reduciranog GSH-a (slika 107) niti u jednoj koncentraciji valproata, a pri koncentraciji od 5 mM/mL naringina smanjena je ($p \leq 0,05$) koncentracija glutationa u odnosu na netretirane

stanice, vjerojatno kao posljedica pada vijabilnosti HepG2 stanica. Jafarian i sur. (172) zabilježili su značajan pad u koncentraciji GSH-a tek nakon tretmana valproatom u dozi od 200 μM. Pourahmad i sur. (79) su zabilježili značajan pad koncentracije GSH-a u stanicama tretiranim s 100 μM valproata. U našem *in vitro* pokusu postojao je trend smanjenja GSH-a s dozom od 0,1 mM/ml i 1 mM/ml valproata ali nije bio značajan. *In vivo* nije bilo značajnih razlika u koncentracijama GSH-a (slika 69, 70). Izlaganjem kombinaciji valproata i naringina, tek je kombinacija obje tvari od 1 mM/mL uzrokovala smanjenje ($p \leq 0,05$) GSH-a. Naši *in vitro* i *in vivo* rezultati se podudaraju.

Syed i sur. (122) pokazali su da tretman s 5 μM naringina može umanjiti oksidacijski stress u HepG2 stanica izloženih palmitatu i da vraća GSH koncentracije bliže kontroli. Drugi radovi s naringinom u HepG2 stanicama su pokazali da naringin normalizira aktivnosti enzima antioksidacijske obrane u dozama od 5 μM (124). U ovom radu se 0,1 mM/ml pokazala katalitičkom, a iznad 1 mM/ml toksičnom dozom za HepG2 stanice. Terapeutske doze bi dakle trebale biti između tih koncentracija.

Razine MDA u PK stanicama rasle su samo pri 5 mM/ml valproata, te 1 mM/ml i 5 mM/ml naringina i združenom tretmanu s 5 mM/ml valproata i 0,1 i 1 mM/ml naringina (slika 106). Razine GSH-a (slika 110) povećane ($p \leq 0,05$) su nakon izloženosti valproatu u koncentracijama od 0,1 i 1 mM/mL, a bile su bez značajnih promjena nakon izloženosti naringinu iako je postajo trend smanjenja. Koncentracije GSH-a nisu se međusobno značajno razlikovale nakon združenog tretmana različitih koncentracija, osim u tretmanu s 5 mM/mL valproata i 1mM/mL naringina gdje je postojao značajan porast. Jedino pri toj koncentraciji je rasla i razina CAT-a, a padala je u svim skupinama tretiranih samo naringinom. *In vivo,* se koncentracije GSH-a značajno smanjuju u svim tretiranim skupinama u odnosu na kontrolu (slika 81), a CAT raste valproatom te pada naringinom pa se naši *in vivo* i *in vitro* rezultati ne podudaraju. Trend CAT-a i GSH-a *in vivo* bio je značajan samo u mužjaka, dok je u ženki CAT rastao u združenom tretmanu (slika 79). Chaudhary i sur. (108) su zabilježili statistički značajan porast koncentracije GSH-a nakon *in vitro* tretmana bubrežnih stanica Wister štakora valproatom u dozi od 10mg i 20mg, što se poklapa sa našim *in vitro* rezultatima. Nema radova koji su istraživali *in vitro* efekte naringina na PK stanicama.

Zaključno, naringin je djelovao protektivno i u *in vivo* i u *in vitro* modelu. U *in vitro* pokusu jasno je bilo vidljivo da dodatak naringina u dozi od 1 mM/ml poboljšava preživljenje HepG2 i PK stanica, posebice u onih s visokim dozama valproata. To se podudara s *in vivo* rezultatima jer je zabilježena zaštita jetre padom amilaze i AP-a s normalizacijom PGC-1α,

PPARα, i ACOX1 enzima, te bubrega padom kalija i ureje. Moguće je da je doza od 0,1 mM/ml naringina katalitička jer se u združenom tretmanu i u HepG2 i u PK stanicama pojačava lipidna peroksidacija. Doza od 1 mM/ml naringina bi mogla biti gornja granica sigurnosti za HepG2 stanice, jer iznad nje vijabilnost HepG2 stanica opada. Vijabilnost PK stanica opada tek pri dozi od 5 mM/ml.

Neke *in vitro* grupe su imale različite odgovore na tretmane od *in vivo* grupa. Na primjer, stanice HepG2 *in vitro* pojačavaju aktivnost katalaze kada su tretirane valproatom, što nije uočeno *in vivo*. *In vivo* jetrene stanice naringinom pojačavaju aktivnost superoksid dismutaze. PK stanice *in vitro* na oksidacijski stres valproatom odgovaraju pojačanom proizvodnjom GSH. *In vivo*, na takav stres bubrežne stanice odgovaraju povišenom aktivnošću katalaze. Dakle po nekim se odgovorima *in vitro* i *in vivo* stanice na oksidacijski stres međusobno razlikuju.

Moguće je da se HepG2 i PK stanice moraju pred tretirati s određenim koncentracijama hormona (estrogena i/ili testosterona) i njihovim metabolitima koji djeluju kao antioksidansi *in vivo* (254, 258). Također je moguće da su potrebni određeni metaboliti naringina i naringenina (naprimjer hesperidin i/ili apigenin itd.), kako bi se pojačao antioksidacijski efekt *in vitro* (115, 163, 164). Predtretmani HepG2 i PK stanica hormonima i metabolitima naringina bi mogli izjednačiti *in vitro* i *in vivo* odgovore stanica na tretmane valproatom i naringinom.

7.5 Razlike među spolovima

Jedina regija mozga, sa statistički značajnom razlikom između spolova, bila je u malom mozgu u grupi tretiranoj kombinacijom, gdje su ženke imale više lipidne peroksidacije, i jaču aktivnost SOD-a i CAT-a. Poznato je da ženke sa normalnim koncentracijama estrogena u štakora, imaju više nezasićenih masnih kiselina, što ih čini senzitivnim na oksidacijski stres, naročito u mozgu (140, 251). Estrogeni su u glavnom snažni zaštitnici SŽS-a, ali njihov metabolizm stvara katehol estrogene koji su prirodni prooksidansi (252-255). Na taj način mogu doprinijeti oksidacijskom stresu (252-254), ali mozak u ženki štakora ima veće koncentracije superoksid dismutaze i katalaze od muških, što znači da bi se oksidacijski stres mogao brzo neutralizirati (255). Zna se da estrogeni povisuju ekspresiju SOD-a, CAT-a, i GPx-a, citokroma C, kompleksa IV i drugh proteina elektornskog transportnog lanca mitohondrija, te da imaju brojne druge genomske i negenomske učinke koji štite mozak od oksidacijskog i drugih stresora (255). Estrogen receptor alpha je ključan za aktivaciju transkripcije sirtuina 1 i 3, kroz koje se jača antioksidacijska obrana i poboljašava replikacija i funkcija mitohondrija (255, 256).

U jetri je aktivnost katalazom bila značajno viša u mužjaka u grupama tretiranim naringinom i kombinacijom. To implicira da testosteron djeluje antioksidacijski u jetri i metabolizmu. Verma i Rana (257) ukazali da dodatak testosterona kastriranim štakorima smanjuje peroksidaciju lipida u jetri i poboljšava rad CYP450 enzima (257). Teppner i sur. (258) su pokazali da antagonist androgenskog receptora, flutamid, izaziva pojačanu lipidnu peroksidaciju u jetri. Slično navode i Cruz-Topete i sur. (259) jer se pokazalo da testosteron može umanjiti smrt stanica izazvanu s hidrogen peroksidom (259). Zhang i sur. (260) su također pokazali da testosteron u jetri aktivira Nrf2-ARE stazu koja djeluje antioksidacijski u jetri. Unatoč tomu, enzimi jetre i pokazatelji oksidacijskog stresa su u više slučajeva bili povišeni u muških miševa. Koncentracije MDA, ALT-a, AP-a, i amilaze u serumu mužjaka su statistički značajno bile više nego u ženki. S ovom činjeciom može se zaključiti da je estrogen snažniji antioksidans od testosterona, što je i ranije opisano u literaturi (252, 255, 256, 259, 261).

Turola i sur. (262) su zabilježili pojačanje steatoze jetre u riba zebrica nakon atrezije jajnika, a kod ljudi u menopauzi povećanje steatoze i fibroze jetre (262). To implicira da su estrogeni važni za metabolizam lipida jer žene u menopauzi sa smanjenim razinama estrogena razvijaju hepatičnu steatozu (262, 263). Od ranije je poznato da u ženki estrogeni inhibiraju transkripciju gena za *de novo* lipogenezu, na primjer *Fasn* (sinteza za masne kiseline) u jetri (263). Muškarci s deficijencijom aromataze ili estrogen receptora α također razvijaju hepatičnu steatozu (263). Zna se i da valproat može smanjiti konverziju testosterona u estradiol što doprinosi većem riziku hepatične steatoze i oksidacijskog stresa u mužjaka (103, 185, 261, 263). Zanimljivo je da u ovom radu valproat nije statistički značajno smanjio razine PPARG1α u odnosu na kontrolu u ženki kao što je to učinio u mužjaka (slika 46). Razine PPARG1α u grupi tretiranoj valproatom su također bile statistički značajno više u ženki nego u mužjaka (slika 47). Ovaj rezultat implicira da jetre ženki bolje podnose tretman valproatom. Razlog tome je sirtuin 1 (SIRT 1) koji je ključan za aktivaciju PPARG1α (264). Od ranije se zna da valproat inhibira ekspresiju SIRT 1 u jetri (265). Isto tako se zna da estrogen kroz moduliranje ERα izravno aktivira transkripciju SIRT1 (255). PPARα razine u ženki se također nisu statistički značajno mijenjale tretmanom valproata u odnosu na kontrolu, jer je PPARG1 α aktivirao transkripciju PPARα (slika 49, 193). Koncentracije PPARα su također bile statistički više u ženki nego u mužjaka (slika 50). Naringin je i u ženki i u mužjaka u združenom tretmanu statistički značajno povisio koncentracije PPARα u odnosu na tretman valproatom, i tako smanjio koncentracije LDL kolesterola te normalizirao koncentracije triglicerida u odnosu na tretman valproatom (slika 97, 91, 88, 49). Efekt bi mogao biti jači s dužim vremenskim

intervalom liječenja i/ili s višom dozom naringina (122, 266). Zanimljivo je da su koncentracije ALT-a bile statistički značajno više u mužjaka tretiranih valproatom u odnosu na ženke, i da su razine MDA u mužjaka bile značajno više tretmanom valproatom u odnosu na kontrolu (tablica 2, slika 58). Obrnuto, u ženki je naringin koji je statistički značajno smanjio koncentracije PPARG1α i PPARα, povisio razine ALT-a. Ovi rezultati impliciraju da PPARG1α i PPARα posjeduju značajno antioksidacijsko djelovanje uz već objašnjene funkcije u ovom radu. Jedan mehanizm tog djelovanja je da PPARG1α inducira transkpriciju receptora srodnog estrogenu α (iz eng.: "estrogen related receptor α" (ERRα)), koji je važan u regulaciji stvaranja slobodnih kiskovih radikala (255). ERRα također regulira i transkpriciju PPARα (255). Kim i Yang navode da PPARα aktivira SOD i katalazu (267). Ovim rezultatom možemo zaključiti da hormoni, posebice estrogeni, mogu modulirati funkciju naringina.

U bubregu su mužjaci općenito imali statistički više koncentracije MDA, kreatinina, ureje i kalija od ženki, te značajan pad aktivnosti katalaze, naročito u grupi tretiranoj naringinom i kombinacijom. Ranije je opisano da visok omjer SOD-a i CAT-a može dovesti do povećanog oksidacijskog stresa, stvaranjem hidroksil i superoksid radikala kroz Fentonovu reakciju (159). Ženke su uglavnom imale pad koncentracije MDA, značajan porast aktivnosti SOD-a i CAT-a. Vjerojatno se radi o mogućnosti da je testosteron potisnuo antioksidacijsku obranu kao što je ranije demonstrirano u bubregu (268, 269). Nasuprot tome su aktivnost SOD-a, koncentracija GSH-a, te aktivnost CAT-a bile statistički značajno više u ženki u valproat grupi te onoj združenog tretmana. Ranije je dokazano da estrogeni, čiji je kemijski sastav sličan vitaminu E, mogu zaustaviti lipidnu peroksidaciju pojačanjem aktivnosti SOD-a i CAT-a. (270, 271). Androgen je imao značajan prooksidacijski efekt, što se pokazalo i u ovom radu (268, 269).

Drugi parametri koji potvrđuju snažnije antioksidacijsko djelovanje estrogena od testosterona, i moguće prooksidacijsko djelovanje androgena, su statistički značajno povišene razine LDH i amilaze u mužjaka. Od ranije je poznato da se LDH općenito otpušta u serum kod ozljede raznih stanica, a amilaza kod ozljede stanica gušterače (209, 211, 272).

Rezultatima parametara oksidacijskog stresa i transcripcijskih faktora jetre možemo zaključiti da naringin može štiti oba spola, posebice mužjake koji su izloženiji oksidacijskom stresu, ali i da hormoni mogu modulirati funkciju naringina i/ili da naringin modulira funkcije organizma.

8 ZAKLJUČAK

1. Valproat je uzrokovao značajnu peroksidaciju lipida, tj. porast MDA u korteksu velikog mozga, ali ne i u malom mozgu. Antioksidacijski enzim SOD pratio je ovaj trend u mozgu i imao je povećanu aktivnost u korteksu velikog mozga i nepromijenjenu aktivnost u malom mozgu u odnosu na netretirane životinje.

2. U korteksu velikog mozga valproat uzrokuje lipidnu peroksidaciju, a u cerebelumu ne izaziva povećani oksidacijski stres. Primjenom naringina uvelike se povećava razina oksidacijskih markera u korteksu, više nego aplikacijom obje tvari zasebno, ali u cerebelumu ne dolazi do promjena.

3. Naringin u kombinaciji s valproatom je uspješno vratio razinu lipida i triglicerida u serumu bliže kontrolnoj razini. U jetri je valproat izazvao izraženu mikrovezikularnu steatozu u cijeloj jetri, ali je uz istodobnu primjenu naringina steatoza je ograničena na periferiju lobula.

4. Naringin je obnovio normalne razine transkripcijskih čimbenika PPARα i PGC1α u jetri koje valproat uvelike reducira. U jetri valproat uzrokuje povišene razine acetilCoA oksidaze1 (ACOX1), koja pri oksidaciji lipida proizvodi H_2O_2, što dovodi do inducirane peroksidacije lipida.

5. U kombinaciji s naringinom razine MDA bile su niže, a oksidacijski enzim ACOX1 snižen je bliže kontrolnim razinama. Naringin je povećao aktivnost SOD-a u jetri, što je vjerojatno dodatno štitilo tkiva od oksidacijskog stresa.

6. Naringin je imao potencijal moduliranja ključnih regulatora valproatnog disbalansiranog metabolizma lipida i fiziologiju jetre.

7. U bubregu je valproatom uočen značajan porast koncentracije ureje i kalija u serumu, a kombinacijom njihova normalizacija. Postojao je i trend rasta aktivnosti SOD-a. Smanjena razina AP-a naringinom sugerira da bi naringin mogao umanjiti mortalitet bolesnika s KBZ.

8. Rezultati *in vitro* pokusa u ovom radu ukazuju da bi se *in vitro* model mogao korisiti kao predskazivač *in vivo* pokusa, ili kao zamjena za *in vivo* model. Potrebna su daljnja istraživanja.

9. Postojale su brojene razlike između spolova. Pokazalo se da ženke ipak imaju veću otpornost na oksidacijski stres. Hormoni utječu na funkciju naringina i naringin može štiti oba spola od oksidacijskog stresa.

10. Visoke razine naringenina u jetri suzbile su stvaranje MDA. Naringin se pokazao kao snažan protektor organa. Izbjegavanjem katalitičkih doza bi se postigli značajno bolji učinici uključujući suzbijanje nuspojava malondialdehida. Vremenska dužina liječenja bi mogla značajno poboljšati ishode liječenja naročito dislipidemije.

9 LITERATURA

1) Burton B.S. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *American Chemical Journal*. 1882; 3(4): 385-95.

2) Löscher W. The discovery of valproate. In: Loscher W.'s *Valproate (Milestones in Drug Therapy)*. 1st ed. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1999: pp: 1-2.

3) Gharib M, Samani L N, Panah ZE, Naseri M, Bahrani N, Kiani K. The Effect of valeric acid on anxiety severity in women undergoing hysterosalpingography. *Global Journal of Health Science*. 2015; 7 (3): 358-63. doi: 10.5539/gjhs.v7n3p358

4) Loeb C, Patrone A, Besio G, Balestrino M, Mainardi P. The antiepileptic effect of low-dose amino-phosphono-valericacid (APV) is not enhanced by phosphatidylserine association. *Seizure*. 1993; 2 (4): 309-10. doi: 10.1016/s1059-1311(05)80146-3. PMID: 7909269.

5) Đikić D, Jutrić D, Dominko K. The dual nature of the antiepileptic drug valproic acid, with possible beneficial effects in Alzheimer's Disease. *Southeastern European Medical Journal*. 2017; 1(1): 74-89. https://doi.org/10.26332/seemedj.v1i1.26

6) Valproic acid. Dosing, indications, interactions, adverse effects and more. Medscape: Drugs and Diseases. Medscape Reference. WebMD. https://reference.medscape.com/drug/valproic-acid-343024. 1992-2022. Ažurirano March, 2022. Pristupljeno March, 2022.

7) Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *Journal of Biomedicine Biotechnology*. 2010; 2010: 479364. doi:10.1155/2010/479364.

8) Valproate and related substance. European Medicines Agency: Science. Medicines. Health. Internet. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/valproate-related-substances-0. 1995-2022. Ažurirano June 07, 2018. Pristupljeno June 10, 2021.

9) Valproic acid. Epilepsy foundation: end epilepsy together. Website. https://www.epilepsy.com/medications/valproic-acid/advanced. Pristupljeno Ožujak, 2022.

10) Sodium valproate. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 16760703, Sodium valproate. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-valproate. Pristupljeno April 8, 2022.

11) Zaccara G, Messori A, Moroni F. Clinical pharmacokinetics of valproic acid. *Clinical Pharmacokinetics*. 1988; 15 (6): 367-89. doi: 10.2165/00003088-198815060-00002.

12) Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of Valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *Central Nervous System Drugs*. 2002; 16 (10): 695-714. doi: 10.2165/00023210-200216100-00004

13) Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2013; 23 (4): 236-41. doi:10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2

14) Monostory K, Nagy A, Tóth K, et al. Relevance of CYP2C9 function in valproate therapy. *Current Neuropharmacology*. 2019; 17(1): 99-106. doi: 10.2174 /1570159X15666171109143654

15) McMullan J.T, Duvivier E.H, Jr. Pollack C.V. Seizure disorders. In: *Marx J. ed. Rosen's Emergency Medicine 8th edition: Concepts and Clinical Practice*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders Inc.; 2014: 156-61.

16) Allen MJ, Sabir S, Sharma S. GABA Receptor. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526124/. Ažurirano February. 17, 2022. Pristupljeno February. 17, 2022.

17) Piplani S, Verma PK, Kumar A. Neuroinformatics analyses reveal GABAt and SSADH as major proteins involved in anticonvulsant activity of valproic acid. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016; 81: 402-10. doi: 10.1016/j.biopha. 2016.04.036.

18) Baldino F Jr, Geller HM. Sodium valproate enhancement of gamma-aminobutyric acid (GABA) inhibition: electrophysiological evidence for anticonvulsant activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1981; 217(2): 445-50.

19) Löscher W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Progress in Neurobiology*. 1999; 58(1): 31-59. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00075-6.

20) Tolou-Ghamari Z, Palizban A. Review of sodium valproate clinical and biochemical properties. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2015. 17(8): e 2207. doi.:10.17795/zjrms-2207

21) Löscher W. Effects of the antiepileptic drug valproate on metabolism and function of inhibitory and excitatory amino acids in the brain. *Neurochemical Research*. 1993; 18(4): 485-502. doi: 10.1007/BF00967253.

22) Löscher W. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *Central Nervous System Drugs*. 2002; 16(10): 669-94. doi: 10.2165/00023210-200216100-00003.

23) Farber NB, Jiang XP, Heinkel C, Nemmers B. Antiepileptic drugs and agents that inhibit voltage-gated sodium channels prevent NMDA antagonist neurotoxicity. *Molecular Psychiatry*. 2002; 7(7): 726-33. doi: 10.1038/sj.mp.4001087.

24) Zeise ML, Kasparow S, Zieglgänsberger W. Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro. *Brain Research*. 1991; 544(2): 345-8. doi: 10.1016/0006-8993(91)90078-a.

25) Powell KL, Cain SM, Snutch TP, O'Brien TJ. Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2014; 77(5): 729-39. doi: 10.1111/bcp.12205

26) Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer and teratogen. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276 (39): 36734-41. doi: 10.1074/jbc.M101287200.

27) Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*. 2001; 20(24): 6969-78. doi: 10.1093/emboj/20.24.6969.

28) Meyer FB. Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Research Reviews*. 1989; 14(3): 227-43. doi: 10.1016/0165-0173(89)90002-7.

29) Van Dongen AM, Van Erp MG, Voskuyl RA. Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance. *Epilepsia*. 1986; 27(3): 177-82. doi: 10.1111/j.1528-1157.1986.tb03525.x.

30) Abel T, Zukin RS. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008; 8(1): 57-64. doi: 10.1016/j.coph.2007.12.002.

31) Li G, Tian Y and Zhu W-G The roles of histone deacetylases and their inhibitors in cancer therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; (8): 576946. doi: 10.3389/fcell.2020.576946

32) Milazzo G, Mercatelli D, DiMuzio G, et al. Histone deacetylases (HDACs): evolution, specificity, role in transcriptional complexes, and pharmacological actionability. *Genes*. 2020; 11(5): 556. doi:10.3390/genes11050556

33) Sixto-López Y, Bello M, Correa-Basurto J. Exploring the inhibitory activity of valproic acid against the HDAC family using an MMGBSA approach. *Journal of Computer Aided Molecular Design*. 2020; 34(8): 857-78. doi: 10.1007/s10822-020-00304-2.

34) Zaikos TD, Painter MM, Sebastian Kettinger NT, Terry VH, Collins KL. Class 1-selective histone deacetylase (HDAC) inhibitors enhance HIV latency reversal while preserving the

activity of HDAC isoforms necessary for maximal HIV gene expression. *Journal of Virology*. 2018; 92(6): e02110-17. doi: 10.1128/JVI.02110-17.

35) Young J.L. and Rund D.A. Mood disorders. In: *Marx J. ed. Rosen's Emergency Medicine 8th edition: Concepts and Clinical Practice*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders Inc.; 2014: 1466-73.

36) Schroeder M, Hillemacher T, Bleich S, Frieling H. The epigenetic code in depression: implications for treatment. *Translation*. 2012. 91(2): 310-14.

37) Fuchikami M, Yamamoto S, Morinobu S, Okada S, Yamawaki Y, Yamawaki S. The potential use of histone deacetylase inhibitors in the treatment of depression. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016; 64: 320-4. doi: 10.1016/j.pnpbp. 2015.03.010.

38) Bonfanti L, Peretto P. Adult neurogenesis in mammals - a theme with many variations. *European Journal of Neuroscience*. 2011; 34(6): 930-50. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07832.x.

39) Long ZM, Zhao L, Jiang R, Wang KJ, Luo SF, Zheng M, Li XF4, He GQ, Valproic acid modifies synaptics tructure and accelerates neurite outgowth via the glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway in an Alzheimer's disease model. *Central Nervous System Neuroscience and Therapeutics*. 2015: 21(11): 887-97. doi: 10.111/cns.12445.

40) Simon AB, Gorman JM. Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate. *NeuroRx*. 2006; 3(1):57-68. doi: 10.1016/j.nurx.2005.12.005.

41) Hwang EC, Van Woert MH. Effect of valproic and acid on serotonin metabolism. *Neuropharmacology*. 1979; 18(4): 391-7. doi: 10.1016/0028-3908(79)90147-3.

42) McElroy SL, Keck PE Jr, Pope HG Jr. Sodium valproate: its use in primary psychiatric disorders. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1987; 7(1): 16-24.

43) McElroy SL, Keck PE Jr, Tugrul KC, Bennett JA. Valproate as a loading treatment in acute mania. *Neuropsychobiology*. 1993; 27(3): 146-9. doi: 10.1159/000118970.

44) Keck PE Jr, McElroy SL, Tugrul KC, Bennett JA. Valproate oral loading in the treatment of acute mania. *Journal of Clinical Psychiatry*. 1993; 54(8): 305-8. doi: 10.1159/000118970

45) Keck PE Jr, McElroy SL. Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of antimanic and mood-stabilizing medications. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2002; 63(4): 3-11.

46) Davis LL, Kabel D, Choate A. D, Foslien-Nash C, Gurguis G.N, Kramer G.L, Petty F. Valproate as antidepressant in major depressive disorder. *Psychopharmacology Bulletin*. 1996; 32(4): 647-52.

47) McPheeters R. and Tobias J.L. Anxiety Disorders. In: *Marx J. ed. Rosen's Emergency Medicine 8th edition: Concepts and Clinical Practice*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders Inc.; 2014: 1474-80.

48) Whittle N, Singewald N. HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand? *Biochemical Society Transactions*. 2014; 42(2): 569-81. doi: 10.1042/BST20130233.

49) Keck PE Jr, Strawn JR, McElroy SL. Pharmacologic treatment considerations in co-occurring bipolar and anxiety disorders. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2006; 67(1): 8-15.

50) Ramadan E, Basselin M, Taha A. Y, Cheon Y, Chang L, Chen M, Rapoport S. I. Chronic valproate treatment blocks D2-like receptor-mediated brain signaling via arachidonic acid in rats. *Neuropharmacology*. 2011; 61(8): 1256–64. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.07.025.

51) Hockberger R. S, Richards J. R. Thought Disorders. In: *Marx J. ed. Rosen's Emergency Medicine 8th edition: Concepts and Clinical Practice*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders Inc.; 2014; 1460-65.

52) Seeman P. Schizophrenia and dopamine receptors. *European Neuropsychopharmacology*. 2013; 23(9): 999-1009. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.06.005.

53) Seeman P. Dopamine D2 receptors as treatment targets in schizophrenia. *Clinical Schizophrenia and Related Psychoses*. 2010; 4(1): 56-73. doi: 10.3371/CSRP.4.1.5.

54) Haddad P. M, Das A, Ashfaq M, Wieck A. A review of valprate in psychiatric practice. *Expert Opinion in Drug Metabolism and Toxicology*. 2009; 5(5): 539-51. doi: 10.1517/17425250902911455

55) Wang Y, Xia J, Helfer B, Li C, Leucht S. Valproate for schizophrenia. *Cochrane Database Systematic Reviews*. 2016; 11(11): CD004028. doi:10.1002/14651858.CD004028.pub4

56) Adamou M, Puchalska S, Plummer W, Hale AS. Valproate in thetreatment of PTSD: systematic review and meta analysis. *Current Medical Research and Opinion*. 2007; 23(6): 1285-91. doi: 10.1185/030079907X188116.

57) Peichev L. Mechanisms of neurotransmission of valproate sodium in suppressing barbiturate and phenytoin withdrawal syndrome. *Folia Medica*. 1992; 34(2): 14-9.

58) Roy-Byrne PP, Ward NG, Donnelly PJ. Valproate in anxiety and withdrawal syndromes. *Journal of Clinical Psychiatry*. 1989; 50: 44-8.

59) Hahnen E, Hauke J, Traenkle C, Eyuepoglu I.Y, Wirth B, Bluemcke I. Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opinion On Investigational Drugs.* (2008); 17(2): 169-84. doi: 10.3389/fphar.2020.00537

60) Saft C, Lauter T, Kraus PH, Przuntek H, Andrich JE. Dose-dependent improvement of myoclonic hyperkinesia due to valproic acid in eight Huntington's disease patients: a case series. *BMC Neurology*. 2006; 6:11. doi: 10.1186/1471-2377-6-11.

61) Unti E, Mazzucchi S, Kiferle L, Bonuccelli U, Ceravolo R. Q09 Valproic Acid for the treatment of aggressiveness in Huntington's disease: 1-year follow-up. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2012; 83: A57. http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2012-303524.179

62) Shahien R, Saleh A, Bowirrat A. Intravenous sodium valproate aborts migraine headaches rapidly. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2011; 123: 257–65. doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01394.x

63) Zhang XZ, Li XJ, Zhang HY. Valproic acid as a promising agent to combat Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*. 2010; 81(1): 3-6. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.09.003.

64) Burré J. The Synaptic Function of α-Synuclein. *Journal of Parkinson's Disease*. 2015; 5(4): 699-713. doi:10.3233/JPD-150642

65) Long Z, Zeng Q, Wang K, Sharma A, He G. Gender difference in valproic acid-induced neuroprotective effects on APP/PS1 double transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*. 2016; 48(10): 930-38. doi: 10.1093/abbs/gmw085.

66) Nalivaeva NN, Belyaev ND, Lewis DI, Pickles AR, Makova NZ, Bagrova DI, Dubrovskaya NM, Plesneva SA, Zhuravin IA, Turner AJ. Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. *Journal of Molecular Neuroscience.* 2012; 46(3): 569-77. doi: 10.1007/s12031-011-9644-x.

67) Mackenzie G.G, Huang L, Alston N, Ouyang N, Vrankova K, Mattheolabakis G, Constantinides P.P, Rigas B. Targeting Mitochondrial STAT3 with Novel Phospho-Valproic Acid (MDC-1112) Inhibits Pancreatic Cancer Growth in Mice. *PLOS One*. 2013; 8(5): e61532. doi: 10.1371/journal.pone.0061532.

68) Zhao L, He D, Jiao M, et al. Overexpression of Histone Deacetylase and Amyloid Precursor Protein in Hepatocellular Carcinoma. *Technology in Cancer Research and Treatment*. 2017; 16(5): 586-594. doi:10.1177/1533034616661664

69) Brodie S.A. and Brandes J.C. Could valproic acid be an effective anticancer agent? The evidence so far. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2014; 14(10): 1097–1100. doi:10.1586/14737140.2014.940329

70) Crespillo AJ, Praena B, Bello-Morales R, Lerma L, Vázquez-Calvo A, Martín-Acebes MA, Tabarés E, Sobrino F, López-Guerrero JA. Inhibition of herpes virus infection in

oligodendrocyte cultured cells by valproic acid. *Virus Research*. 2016; 214: 71-9. doi: 10.1016/j.virusres.2016.01.009.

71) Vázquez-Calvo A, Saiz JC, Sobrino F, Martín-Acebes MA. Inhibition of enveloped virus infection of cultured cells by valproic acid. *Journal of Virology*. 2011; 85(3): 1267-74. doi: 10.1128/JVI.01717-10.

72) Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, Landay AL, Coombs RW, Richman DD, Mellors JW, Coffin JM, Bosch RJ, Margolis DM. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet*. 2005; 366(9485): 549-55. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67098-5.

73) Tyrrell DAJ, Myint SH. Coronaviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996; Chapter 60. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7782/

74) Pitt B, Sutton NR, Wang Z, Goonewardena SN, Holinstat M. Potential repurposing of the HDAC inhibitor valproic acid for patients with COVID-19. *European Journal of Pharmacology*. 2021; 898:173988. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.173988.

75) Bambakidis T, Dekker SE, Sillesen M, Liu B, Johnson CN, Jin G, de Vries HE, Li Y, Alam HB. Resuscitation with Valproic Acid Alters Inflammatory Genesin a Porcine Model of Combined Traumatic Brain Injury and Hemorrhagic Shock. *Journal of Neurotrauma*. 2016; 33(16): 1514-21. doi: 10.1089/neu.2015.4163.

76) Kabakus N, Ay I, Aysun S, Söylemezoglu F, Ozcan A, Celasun B. Protective effects of valproic acid against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Journal of Child Neurology*. 2005; 20(7): 582-7. doi: 10.1177/08830738050200070801.

77) Gonzales E, Chen H, Munuve R, Mehrani T, Webb-Briteen J, Nadel A, Alam H.B, Wherry D, Burris D, Koustova E. Valproic acid prevents hemorrhage-associated lethality and affects the acetylation pattern of cardiac histones. *Shock*. 2005; 25(4): 395-401. DOI: 10.1097/01.shk.0000209522.28120.c8

78) Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, Bolszak M, Pietilä M, Koivunen P, Hakkola J, Poulton J, Morten KJ, Uusimaa J. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in Hep G2 in vitro cell model. *Toxicology*. 2015; 331: 47-56. doi: 10.1016/j.tox.2015.03.001.

79) Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, Shaki F, Shahraki J, Fard JK. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicology In Vitro* 2012; 26(4): 545-51. doi: 10.1016/j.tiv.2012.01.020.

80) Kiang TK, Teng XW, Surendradoss J, Karagiozov S, Abbott FS, Chang TK. Glutathione depletion by valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes: role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2011; 252(3): 318-24. doi: 10.1016/j.taap.2011.03.004.

81) Ji Q, Shi X, Lin R, Mao Y, Zhai X, Lin Q, Zhang J. Participation of lipid transport and fatty acid metabolism in valproate sodium-induced hepatotoxicity in Hep G2 cells. *Toxicology in Vitro*. 2010; 24(4): 1086-91. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.014.

82) Stewart JD1, Horvath R, Baruffini E, Ferrero I, Bulst S, Watkins PB, Fontana RJ, Day CP, Chinnery PF. Polymerase γ gene POLG determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology*. 2010; 52(5): 1791-6. doi: 10.1002/hep.23891

83) Chang HH, Gean PW, Chou CH, Yang YK, Tsai HC, Lu RB, Chen PS.C825T polymorphism of the GNB3 gene on valproate-related metabolic abnormalities in bipolar disorder patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2010; 30(5): 512-7. doi: 10.1097/JCP.0b013e3181f03f50.

84) Zhao M, Zhang T, Li G, Qiu F, Sun Y, Zhao L. Associations of CYP2C9 and CYP2A6 polymorphisms with the concentrations of valproate and its hepatotoxin metabolites and valproate-induced hepatotoxicity. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2017; 121(2): 138-43. doi: 10.1111/bcpt.12776.

85) Bellringer ME, Rahman K, Coleman R. Sodium valproate inhibits the movement of secretory vesicles in rat hepatocytes. *Biochemistry Journal*. 1988; 249(2): 513-9. doi: 10.1042/bj2490513

86) Lee MH, Hong I, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, Kim HL, Yoon BI, Chung H, Kong G, Lee MO. Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of valproic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; 220(1): 45-59. doi: 10.1016/j.taap.2006.12.016.

87) Farinelli E, Giampaoli D, Cenciarini A, Cercado E, Verrotti A. Valproic acid and nonalcoholic fatty liver disease: A possible association? *World Journal Hepatology*. 2015; 7(9): 1251-57. doi:10.4254/wjh.v7.i9.1251.

88) Gungor S, Yücel G, Akinci A, Tabel Y, Ozerol IH, Yologlu S. The role of ghrelin in weight gain and growth in epileptic children using valproate. *Journal of Child Neurology*. 2007; 22(12):1384-8. doi: 10.1177/0883073807307096.

89) Meral C, Cekmez F, Vurucu S, Tascılar E, Pirgon O, Canpolat FE, Ipcioglu OM, Aydemir G, Aydınoz S. New adipocytokines (vaspin, apelin, visfatin, adiponectin) levels in children treated with valproic acid. *European Cytokine Network*. 2011; 22(2): 118-22. doi: 10.1684/ecn.2011.0284

90) Keefe P, Bokhari SRA. Fanconi syndrome. *In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL)*: Stat Pearls Publishing; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534872/. Ažurirano December 12, 2021. Pristupljeno March 2022.

91) Karatzas A, Paridis D, Kozyrakis D, et al. Fanconi syndrome in the adulthood. The role of early diagnosis and treatment. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. 2017; 17(4): 303-06.

92) Heidari R, Jafari F, Khodaei F, ShiraziYeganeh B, Niknahad H. Mechanism of valproic acid induced Fanconi syndrome involves mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rat kidney. *Nephrology*. 2018; 23(4): 351-61. doi: 10.1111/nep.13012.

93) Endo A, Fujita Y, Fuchigami T, Takahashi S, Mugishima H. Fanconi syndrome caused by valproic acid. *Pediatric Neurology*. 2010; 42(4): 287-90. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2009.12.003.

94) Patel SM, Graff-Radford J, Wieland ML. Valproate-induced Fanconi syndrome in a 27-year-old woman. *Journal of General Internal Medicine*. 2011; 26(9): 1072-74. doi:10.1007/s11606-011-1708-7

95) Knights MJ, Finlay E. The effects of sodium valproate on the renal function of children with epilepsy. *Pediatric Nephrology*. 2014; 29(7): 1131-8. doi: 10.1007/s00467-013-2512-x.

96) Hu X, Wang J, Dong W, Fang Q, Hu L, Liu C.A. Meta-analysis of polycystic ovary syndrome in women taking valproate for epilepsy. *Epilepsy Research*. 2011; 97(1-2): 73-82. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2011.07.006.

97) Petersen I, Collings SL, McCrea RL, Nazareth I, Osborn DP, Cowen PJ, Sammon CJ. Antiepileptic drugs prescribed in pregnancy and prevalence of major congenital malformations: comparative prevalence studies. *Clinical Epidemiology*. 2017; 9: 95-103. doi: 10.2147/CLEP.S118336

98) Lloyd K.A. A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons*. 2013; 6: doi: 10.1093/biohorizons/hzt003, https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzt003

99) Eadie M. J. and Vajda F. J. E. Should valproate be taken during pregnancy? *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2005; 1(1): 21–6. doi: 10.2147/tcrm.1.1.21.53605

100) Herzog AG. Disorders of reproduction in patients with epilepsy: antiepileptic drug related mechanisms. *Seizure*. 2008; 17(2): 111-9. doi: 10.1016/j.seizure.2007.11.007.

101) Verrotti A, Mencaroni Ez, Cofini M, Castagnino M, Leo A, Russo E, Belcastro V. Valproic acid metabolism and its consequences on sexual functions. *Current Drug Metabolism*. 2016; 17(6): 573-81. doi: 10.2174/1389200217666160322143504

102) Brion L, Gorostizaga A, Gómez NV, Podestá EJ, CornejoMaciel F, Paz C. Valproic acid alters mitochondrial cholesterol transport in Y1 adrenocortical cells. *Toxicology in Vitro*. 2011; 25(1): 7-12. doi: 10.1016/j.tiv.2010.08.006.

103) Taubøll E1, Gregoraszczuk EL, Kołodziej A, Kajta M, Ropstad E. Valproate inhibits the conversion of testosterone to estradiol and acts as an apoptotic agent in growing porcine ovarian follicular cells. *Epilepsia*. 2003; 44(8): 1014-21. doi: 10.1046/j.1528-1157.2003.60702.x.

104) Gustavsen MW, von Krogh K, Taubøll E, Zimmer KE, Dahl E, Olsaker I, Ropstad E, Verhaegen S. Differential effects of antiepileptic drugs on steroidogenesis in a human in vitro cell model. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2009; (189): 14-21. doi: 10.1111/j.1600-0404.2009.01206.x.

105) Inada H, Chihara K, Yamashita A, Miyawaki I, Fukuda C, Tateishi Y, Kunimatsu T, Kimura J, Funabashi H, MiyanoT. Evaluation of ovarian toxicity of sodium valproate (VPA) using cultured rat ovarian follicles. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2012; 37(3): 587-94.

106) Glister C, Satchell L, Michael AE, Bicknell AB, Knight PG. The anti-epileptic drug valproic acid (VPA) inhibits steroidogenesis in bovine theca and granulosa cells in vitro. *PLOS One*. 2012; 7(11): e49553. doi: 10.1371/journal.pone.0049553.

107) Gezginci-Oktayoglu S, Turkyilmaz IB, Ercin M, Yanardag R, Bolkent S. Vitamin U has a protective effect on valproic acid-induced renal damage due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-fibrotic properties. *Protoplasma*. 2016; 253(1): 127-35. doi: 10.1007/s00709-015-0796-3.

108) Chaudhary S, Ganjoo P, Raiusddin S, Parvez S. Nephro protective activities of quercetin with potential relevance to oxidative stress induced by valproic acid. *Protoplasma*. 2015; 252(1): 209-17. doi: 10.1007/s00709-014-0670-8.

109) El-Shenawy NS, Hamza RZ. Nephrotoxicity of sodium valproate and protective role of L-cysteine in rats at biochemical and histological levels. *Journal of Basic Clinical Physiology and Pharmacology*. 2016; 27(5): 497-504. doi: 10.1515/jbcpp-2015-0106.

110) Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*. 2013: 162750. doi: 10.1155/2013/162750.

111) Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, et al. The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceuticals*. 2019; 12(1): 11. doi:10.3390/ph12010011

112) Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Krzeminski R, Gralak M, Delgado-Licon E, Martinez Ayala AL, Katrich E, Trakhtenberg S. Changes in plasma lipid and antioxidant activity in rats as a result of naringin and red grapefruit supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(8): 3223-8. doi: 10.1021/jf058014h.

113) Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, Arya DS. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta Medica*. 2014; 80(6): 437-51. doi: 10.1055/s-0034-1368351.

114) Bai Y, Peng W, Yang C, et al. Pharmacokinetics and metabolism of naringin and active metabolite naringenin in rats, dogs, humans and the differences between species. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 11:364. doi:10.3389/fphar.2020.00364

115) Zeng X, Su W, Zheng Y, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of naringin in aged rats. *Frontiers in Pharmacology*. 2019; 10:34. doi:10.3389/fphar.2019.00034

116) Youdim A.K, Qaiser M.Z, Begley D.J, Rice-Evans C.A, Abbott N.J.. Flavonoid permeability across an in-situ model of the blood–brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 36(5): 592 – 604. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023.

117) Gaur V, Aggarwal A, Kumar A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. *European Journal of Pharmacology*. 2009; 616 (1-3): 147-54. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.056.

118) Chen H, He Y, Chen S, Qi S, Shen J. Therapeutic targets of oxidative/nitrosative stress and neuroinflammation in ischemic stroke: applications for natural product efficacy with omics and systemic biology. *Pharmacological Research*. 2020; 158: 104877. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104877.

119) Yang J, Yuan L, Wen Y, et al. Protective effects of naringenin in cerebral infarction and its molecular mechanism. *Medical Science Monitor*. 2020; 26:e918772. doi:10.12659/MSM.918772

120) Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway [published correction appears in Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2015; 7(4). doi: 10.1101/cshperspect.a026609]. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012; 4(9):a011189. 2012 doi:10.1101/cshperspect.a011189

121) Han Y, Su J, Liu X, Zhao Y, Wang C, Li X. Naringin alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage by reducing oxidative stress and inhibiting apoptosis. *Brain Research Bulletin*. 2017; 133: 42-50. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.12.008.

122) Syed AA, Reza MI, Shafiq M, Kumariya S, Singh P, Husain A, Hanif K, Gayen JR. Naringin ameliorates type 2 diabetes mellitus-induced steatohepatitis by inhibiting RAGE/NF-κB mediated mitochondrial apoptosis. *Life Sciences*. 2020; 257:118118. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118118.

123) Zhang X, Zhang Y, Gao W, Guo Z, Wang K, Liu S, Duan Z, Chen Y. Naringin improves lipid metabolism in a tissue-engineered liver model of NAFLD and the underlying mechanisms. *Life Sciences*. 2021; 277:119487. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119487.

124) Shirani K, Yousefsani BS, Shirani M, Karimi G. Protective effects of naringin against drugs and chemical toxins induced hepatotoxicity: A review. *Phytotherapy Research*. 2020; 34(8): 1734-44. doi: 10.1002/ptr.6641.

125) Wang R, Wu G, Dai T, Lang Y, Chi Z, Yang S, Dong D. Naringin attenuates renal interstitial fibrosis by regulating the TGF-β/Smad signaling pathway and inflammation. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2021; 21(1): 66. doi: 10.3892/etm.2020.9498.

126) Elsawy H, Alzahrani AM, Alfwuaires M, Abdel-Moneim AM, Khalil M. Nephroprotective effect of naringin in methotrexate induced renal toxicity in male rats. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2021; 143: 112180. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112180.

127) Amini N, Sarkaki A, Dianat M, Mard SA, Ahangarpour A, Badavi M. The renoprotective effects of naringin and trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats through inhibition of apoptosis and downregulation of micoRNA-10a. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2019; 112: 108568. doi: 10.1016/j.biopha.2019.01.029.

128) Venkateswara Rao P, Kiran S. D. V. S, Rohini P, Bhagyasree P. Flavonoid: A review on Naringenin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017; 6(5): 2778-83.

129) Park JH, Ku HJ, Kim JK, Park JW, Lee JH. Amelioration of high fructose-induced cardiac hypertrophy by naringin. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 9464. doi:10.1038/s41598-018-27788-1.

130) Rajadurai M, Prince PS. Naringin ameliorates mitochondrial lipid peroxides, antioxidants and lipids in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Phytotherapy Research*. 2009; 23(3): 358-62. doi: 10.1002/ptr.2632.

131) Balta V. Bioraspoloživost, metabolizam i antioksidacijska sposobnost polifenola u organima miša C57BL/6. *Doktorska disertacija*. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018; 175. https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:957362

132) Balta, V, Đikić, D, Crnić, I, Odeh, D, Oršolić, N, Kmetić, I, Murati, T, Dragović Uzelac, V, Landeka Jurčević, I. The effects of four-week intake of black thorn flower extract on mice tissue antioxidant status and phenolic content. *Polish Journal Food and Nutrition Sciences*. 2020.70:361-375. doi: https://doi.org/10.31883/pjfns/128132

133) Crnić I. Učinak bioaktivnih molekula iz ekstrakta cvijeta prunus spinosa l. na biodostupnost, oksidacijski stres i hiperglikemiju u miša C57BL/6. *Doktorska disertacija*. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2020; 340. https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:870065

134) Lowry, D.H, Rosebrough, N.J, Farr, A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193(1): 265-75.

135) Jayakumar T, Sakthivel M, Thomas PA, Geraldine P. Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interactions*. 2008; 176 (2-3): 108-20. doi: 10.1016/j.cbi.2008.08.006.

136) Flohé L, Ötting F. Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 93–104. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05013-8.

137) Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

138) Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry*. 2003; 312(2): 224-7. doi: 10.1016/s0003-2697(02)00506-7.

139) Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 1994; 233: 346-57. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33040-9.

140) Chaudhary S, Parvez S. An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. *Neuroscience*. 2012; 225: 258-68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.060.

141) Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*. 2014; 360438. doi:10.1155/2014/360438

142) Kugelmann E, Albert CR, Bringmann G, Holzgrabe U. Fenton's oxidation: a tool for the investigation of potential drug metabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. 5; 54(5):1047-58. doi: 10.1016/j.jpba.2010.12.016.

143) Hussein AM, Awadalla A, Abbas KM, Sakr HF, Elghaba R, Othman G, Mokhtar N, Helal GM. Chronic valproic acid administration enhances oxidative stress, upregulates IL6 and down regulates Nrf2, Glut1 and Glut4 in rat's liver and brain. *Neuroreport*. 2021; 32(10): 840-50. doi: 10.1097/WNR.0000000000001663.

144) Banji D, Banji OJ, Abbagoni S, Hayath MS, Kambam S, Chiluka VL. Amelioration of behavioral aberrations and oxidative markers by green tea extract in valproate induced autism in animals. *Brain Research*. 2011; 1410:141-51. doi: 10.1016/j.brainres.2011.06.063.

145) Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Prevention or amelioration of autism-like symptoms in animal models: will it bring us closer to treating human ASD? *International Journal of Molecular Science*. 2019; 20(5): 1074. doi:10.3390/ijms20051074

146) Al-Amin MM, Rahman MM, Khan FR, Zaman F, Mahmud Reza H. Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism. *Behavioral Brain Research*. 2015; 286: 112-21. doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.041.

147) Fu J, Shao CJ, Chen FR, Ng HK, Chen ZP. Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines. *Neuro-Oncology*. 2010; 12(4): 328-40. doi:10.1093/neuonc/nop005

148) Lee JY, Maeng S, Kang SR, Choi HY, Oh TH, Ju BG, Yune TY. Valproic acid protects motor neuron death by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-mediated cytochrome C release after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 2014; 31(6): 582-94. doi: 10.1089/neu.2013.3146

149) Long Z. Zheng M, Zhao L, Xie P, Song C, Chu Y, Song W, He G. Valproic acid attenuates neuronal loss in the brain of APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice model. *Current Alzheimer Research*. 2013; 10(3): 261-9. doi: 10.2174/1567205011310030005

150) Kabakus N, et al. Protective effects of valproic acid against hypoxic-ischaemic brain injury in neonatal rats. *Journal of Child Neurology*. 2005; 20: 582-87. doi: 10.1177/08830738050200070801

151) Tunali S, Cimen ES, Yanardag R. The effects of chard on brain damage in valproic acid-induced toxicity. *Journal of Food Biochemistry*. 2020: e13382. doi: 10.1111/jfbc.13382.

152) Liao G, Li R, Chen X, Zhang W, Du S, Yuan Y. Sodium valproate prevents radiation-induced injury in hippocampal neurons via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Neuroscience*. 2016; 331:40-51. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.019.

153) Turkyilmaz IB, BilginSokmen B, Yanardag R. Alpha-lipoic acid prevents brain injury in rats administered with valproic acid. *The Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2020; 34(11): e22580. doi: 10.1002/jbt.22580.

154) Turkyilmaz IB, Altas N, Arisan I, Yanardag R. Effect of vitamin B_6 on brain damage in valproic acid induced toxicity. *The Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2021; 35(9): e22855. doi: 10.1002/jbt.22855.

155) Beltrán-Sarmiento E, Arregoitia-Sarabia CK, Floriano-Sánchez E, Sandoval-Pacheco R, Galván-Hernández DE, Coballase-Urrutia E, Carmona-Aparicio L, Ramos-Reyna E, Rodríguez-Silverio J, Cárdenas-Rodríguez N. Effects of valproate monotherapy on the oxidant-antioxidant status in mexican epileptic children: A Longitudinal Study. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*. 2018; 7954371. doi: 10.1155/2018/7954371.

156) Zhang YJ, Zhang M, Wang XC, Yu YH, Jin PJ, Wang Y. [Effects of sodium valproate on neutrophils' oxidative metabolism and oxidant status in children with idiopathic epilepsy]. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2011; 49(10): 776-81. Chinese.

157) Peker E, Oktar S, Ari M, Kozan R, Doğan M, Cağan E, Söğüt S. Nitric oxide, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme levels in epileptic children using valproic acid. *Brain Research*. 2009; 1297: 194-7. doi: 10.1016/j.brainres.2009.08.048.

158) Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E, Rivera-Espinosa L, Romero-Toledo A, Sampieri A 3rd, Ortega-Cuellar D, Montesinos-Correa H, Floriano-Sánchez E, Carmona-Aparicio L. Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproicacid, oxcarbazepine, andtopiramate): evidence in humans and experimental models. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*. 2013; 598493. doi: 10.1155/2013/598493.

159) Jornada LK, Valvassori SS, Steckert AV, Moretti M, Mina F, Ferreira CL, Arent CO, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *Journal of Psychiatry Research*. 2011. 45(2):162-8. doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.05.011.

160) Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redoxcycling of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*. 1999; 12(6): 521-5. doi: 10.1021/tx980271b.

161) Md S, Alhakamy NA, Aldawsari HM, Asfour HZ. Neuroprotective and antioxidant effect of naringenin-loaded nanoparticles for nose-to-brain delivery. *Brain Science*. 2019; 9(10): 275. doi:10.3390/brainsci9100275

162) Finotti E, Di Majo D. Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung*. 2003; 47(3):186-7. doi: 10.1002/food.200390043.

163) Kamran Khan M, Huma Z.E, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols *Journal of Food Composition and Analysis*. 2014; 33: 85-104. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004

164) Heijnen CG, Haenen GR, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radical Research*. 2002; 36(5): 575-81. doi: 10.1080/10715760290025951.

165) Golechha M, Sarangal V, Bhatia J, Chaudhry U, Saluja D, Arya DS. Naringin ameliorates pentylenetetrazol-induced seizures and associated oxidative stress, inflammation, and cognitive impairment in rats: possible mechanisms of neuroprotection. *Epilepsy &Behavior*. 2014; 41: 98-102. doi: 10.1016/j.yebeh.2014.09.058.

166) Golechha M, Chaudhry U, Bhatia J, Saluja D, Arya DS. Naringin protects against kainic acid-induced status epilepticus in rats: evidence for an antioxidant, anti-inflammatory and

neuroprotective intervention. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2011; 34(3): 360-5. doi: 10.1248/bpb.34.360.

167) Viswanatha GL, Shylaja H, Moolemath Y. The beneficial role of naringin - a citrus bioflavonoid, against oxidative stress-induced neurobehavioral disorders and cognitive dysfunction in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 94:909-929. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.072.

168) Han Y, Su J, Liu X, Zhao Y, Wang C, Li X. Naringin alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage by reducing oxidative stress and inhibiting apoptosis. *Brain Research Bulletin*. 2017; 133: 42-50. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.12.008.

169) Cui QJ, Wang LY, Wei ZX, Qu WS. Continual naringin treatment benefits the recovery of traumatic brain injury in rats through reducing oxidative and inflammatory alterations. *Neurochemistry Research*. 2014; 39(7): 1254-62. doi: 10.1007/s11064-014-1306-2.

170) Prakash A, Shur B, Kumar A. Naringin protects memory impairment and mitochondrial oxidative damage against aluminum-induced neurotoxicity in rats. *International Journal of Neuroscience*. 2013; 123 (9): 36-45. doi: 10.3109/00207454.2013.785542.

171) Saul AW: Hidden inplain sight: the pioneering work of Frederick Robert Klenner, M.D. *Journal of Orthomolecular Medicine*. 2007; 22: 31-38.

172) Jafarian I, Eskandari MR, Mashayekhi V, Ahadpour M, Hosseini MJ. Toxicity of valproic acid in isolated rat liver mitochondria. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2013; 23(8): 617-23. doi: 10.3109/15376516.2013.821567.

173) Koroglu OF, Gunata M, Vardi N, Yildiz A, Ates B, Colak C, Tanriverdi LH, Parlakpinar H. Protective effects of naringin on valproic acid-induced hepatotoxicity in rats. *Tissue & Cell*. 2021; 72:101526. doi: 10.1016/j.tice.2021.101526.

174) Ahmed OM, Fahim HI, Ahmed HY, Al-Muzafar HM, Ahmed RR, Amin KA, El-Nahass ES, Abdelazeem WH. The preventive effects and the mechanisms of action of navel orange peel hydroethanolic extract, naringin, and naringeninin N-Acetyl-p-aminophenol-induced liver

injury in wistar rats. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*. 2019; 2745352. doi: 10.1155/2019/2745352.

175) Arafah A, Rehman MU, Mir TM, Wali AF, Ali R, Qamar W, Khan R, Ahmad A, Aga SS, Alqahtani S, Almatroudi NM. Multi-Therapeutic potential of naringenin (4',5,7-trihydroxyflavonone): experimental evidence and mechanisms. *Plants*. 2020; 9(12): 1784. doi: 10.3390/plants9121784.

176) Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Lakey JR, Rajotte RV. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996; 81(9): 3197-202. doi: 10.1210/jcem.81.9.8784069.

177) Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death & Differentiation*. 2013; 20(12): 1615-30. doi: 10.1038/cdd.2013.138.

178) Barrera G, Pizzimenti S, Ciamporcero ES, Daga M, Ullio C, Arcaro A, Cetrangolo GP, Ferretti C, Dianzani C, Lepore A, Gentile F. Role of 4-hydroxynonenal-protein adducts in human diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015; 22(18): 1681-702. doi: 10.1089/ars.2014.6166.

179) Manohar SM, Vaikasuvu SR, Deepthi K, Sachan A, Narasimha SR. An association of hyperglycemia with plasma malondialdehyde and atherogenic lipid risk factors in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2013; 18(2): 89-93.

180) Kaefer M, De Carvalho JA, Piva SJ, da Silva DB, Becker AM, Sangoi MB, Almeida TC, Hermes CL, Coelho AC, Tonello R, Moreira AP, Garcia SC, Moretto MB, Moresco RN. Plasma malondialdehyde levels and risk factors for the development of chronic complications in type 2 diabetic patients on insulin therapy. *Clinical Laboratory*. 2012; 58(9-10): 973-8.

181) Wang X, Lei XG, Wang J. Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014; 382(1): 8-16. doi: 10.1016/j.mce.2013.09.003.

182) Moreto F, de Oliveira EP, Manda RM, Burini RC. The higher plasma malondialdehyde concentrations are determined by metabolic syndrome-related glucolipotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014; 505368. doi: 10.1155/2014/505368.

183) Jain SK, Morshed KM, Kannan K, McMartin KE, Bocchini JA Jr. Effect of elevated glucose concentrations on cellular lipid peroxidation and growth of cultured human kidney proximal tubule cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1996; 162(1): 11-6. doi: 10.1007/BF00250990.

184) Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2000; 43(5): 550-7. doi: 10.1007/s001250051342.

185) Grünig D, Szabo L, Marbet M, Krähenbühl S. Valproic acid affects fatty acid and triglyceride metabolism in HepaRG cells exposed to fatty acids by different mechanisms. *Biochemical Pharmacology*. 2020; 177: 113860. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113860.

186) Ma L, Wang Y, Chen X, Zhao L, Guo Y. Involvement of CYP2E1-ROS-CD36/DGAT2 axis in the pathogenesis of VPA-induced hepatic steatosis in vivo and in vitro. *Toxicology*. 2020; 445:152585. doi: 10.1016/j.tox.2020.152585.

187) Bai X, Hong W, Cai P, Chen Y, Xu C, Cao D, Yu W, Zhao Z, Huang M, Jin J. Valproate induced hepatic steatosis by enhanced fatty acid uptake and triglyceride synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017; 324: 12-25. doi: 10.1016/j.taap.2017.03.022.

188) Aires CC, Ijlst L, Stet F, Prip-Buus C, de Almeida IT, Duran M, Wanders RJ, Silva MF. Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT IA) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 79(5): 792-9. doi: 10.1016/j.bcp.2009.10.011.

189) Mu H, Zhou Q, Yang R, Zeng J, Li X, Zhang R, Tang W, Li H, Wang S, Shen T, Huang X, Dou L, Dong J. Naringin attenuates high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease and gut bacterial dysbiosis in mice. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 11: 585066. doi: 10.3389/fmicb.2020.585066.

190) Zhang X, Zhang Y, Gao W, Guo Z, Wang K, Liu S, Duan Z, Chen Y. Naringin improves lipid metabolism in a tissue-engineered liver model of NAFLD and the underlying mechanisms. *Life Sciences*. 2021; 277:119487. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119487.

191) Van Raalte DH, Li M, Pritchard PH, Wasan KM. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. *Pharmaceutical Research*. 2004; 21(9): 1531-8. doi: 10.1023/b:pham.0000041444.06122.8d.

192) Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1 alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010; 299(2): E145-E161. doi:10.1152/ajpendo.00755.2009

193) Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education*. 2006; 30(4): 145-51. doi: 10.1152/advan.00052.2006.

194) Tahri-Joutey M, Andreoletti P, Surapureddi S, Nasser B, Cherkaoui-Malki M, Latruffe N. Mechanisms mediating the regulation of peroxisomal fatty acid beta-oxidation by PPARα. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(16): 8969. doi: 10.3390/ijms22168969.

195) Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annual Review of Nutrition*. 2001; 21:193-230. doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.193.

196) Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi AV, Reddy JK. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(4): 2147-55. doi: 10.1074/jbc.271.4.2147.

197) Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(10): 5678-84. doi: 10.1074/jbc.273.10.5678.

198) Vamecq J, Vallee L, Fontaine M, Lambert D, Poupaert J, Nuyts JP. CoA esters of valproic acid and related metabolites are oxidized in peroxisomes through a pathway distinct from peroxisomal fatty and bile acyl-CoA beta-oxidation. *FEBS Letters*. 1993; 322(2):95-100. doi: 10.1016/0014-5793(93)81545-b.

199) Ponchaut S, Draye JP, Veitch K, Van Hoof F. Influence of chronic administration of valproate on ultrastructure and enzyme content of peroxisomesin rat liver and kidney. Oxidation of valproate by liver peroxisomes. *Biochemical Pharmacology*. 1991; 41(10):1419-28. doi: 10.1016/0006-2952(91)90557-l.

200) Van denBranden C, Roels F. Peroxisomal beta-oxidation and sodium valproate. *Biochemical Pharmacology*. 1985; 34(12): 2147-9. doi: 10.1016/0006-2952(85)90409-5.

201) Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N. PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(6): 2061. doi: 10.3390/ijms21062061.

202) C Y Fan, J Pan, R Chu, D Lee, K D Kluckman, N Usuda, I Singh, A V Yeldandi, M S Rao, N Maeda, J K Reddy. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271: 24698-24710

203) Huang W, Bansode RR, Bal NC, Mehta M, Mehta KD. Protein kinase Cβ deficiency attenuates obesity syndrome of ob/ob mice by promoting white adipose tissue remodeling. *Journal of Lipid Research*. 2012; 53(3): 368-78. doi:10.1194/jlr.M019687

204) McMullen PD, Bhattacharya S, Woods CG, Sun B, Yarborough K, Ross SM, Miller ME, McBride MT, LeCluyse EL, Clewell RA, Andersen ME. A map of the PPARα transcription

regulatory network for primary human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*. 2014; 209: 14-24. doi: 10.1016/j.cbi.2013.11.006.

205) Bansode RR, Huang W, Roy SK, Mehta M, Mehta KD. Protein kinase C deficiency increases fatty acid oxidation and reduces fat storage. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(1): 231-236. doi: 10.1074/jbc.M707268200.

206) Yaacob NS, Norazmi MN, Gibson GG, Kass GE. The transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is regulated by protein kinase C. *Toxicology Letters*. 2001; 125(1-3): 133-41. doi: 10.1016/s0378-4274(01)00433-7.

207) Winawer S.J., Broitman S.A., Gottlieb L.S., Zamchek N. The Serum and liver amylase and transaminase activities in choline deficiency fatty liver and cirrhosis. *Gastroenterology*. 1965. 48(2): 216-225. doi: https://doi.org/10.1016/S0016-5085(65)80140-8

208) Afsartala Z, Savabkar S, Nazemalhosseini Mojarad E, et al. Expression of liver alpha-amylase in obese mouse hepatocytes. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2016; 9(4): 278-285.

209) Jain A, Haque I, Tayal V, Roy V. Valproic acid-induced acute pancreatitis. *Indian Journal of Psychiatry*. 2019;61(4):421-422. doi:10.4103/psychiatry.IndianJPsychiatry_383_18

210) Ali MF, Loh KY. Sodium valproate induced necrotising pancreatitis: A case report. *Malaysian Family Physician*. 2013; 8(3): 28-30.

211) Quan W, Shao Q, Zhang H, Liu FH, Zhang XH. Acute pancreatitis associated with valproate treatment. *Chinese Medical Journal (Engl)*. 2018; 131(15): 1889-90. doi:10.4103/0366-6999.237390

212) Yoon SB, Lee IS, Choi MH, et al. Impact of fatty liver on acute pancreatitis severity. *Gastroenterology Research and Practice*. 2017; doi:10.1155/2017/4532320

213) Lim YJ, Kim JH, Pan JH, Kim JK, Park TS, Kim YJ, Lee JH, Kim JH. Naringin protects pancreatic β-cells against oxidative stress-induced apoptosis by inhibiting both intrinsic and

extrinsic pathways in insulin-deficient diabetic mice. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2018; 62(5). doi: 10.1002/mnfr.201700810.

214) Li Y, Pan Y, Gao L, Zhang J, Xie X, Tong Z, Li B, Li G, Lu G, Li W. Naringenin protects against acute pancreatitis in two experimental models in mice by NLRP3 and Nrf2/HO-1 pathways. *Mediators of Inflammation*. 2018. doi: 10.1155/2018/3232491.

215) Weatherby D. and Ferguson S. Alkaline phosphatase. *In Weatherby and Ferguson's ed. Blood Chemistry and CBC Analysis*. Bear Mountain Publishing; Jacksonville, Oregon. 2002. pp. 119-28

216) Pirahanchi Y, Jessu R, Aeddula NR. Physiology, Sodium Potassium Pump. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2022. Treasure Island, Florida. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537088/ Ažurirano 2021, Pristupljeno 2022

217) White, K. E, Gesek, F. A, Nesbitt, T, Drezner, M. K, & Friedman, P. A. Molecular dissection of Ca^{2+} efflux in immortalized proximal tubule cells. *The Journal of General Physiology*. 1997; 109 (2): 217–228. https://doi.org/10.1085/jgp.109.2.217

218) Dang, D, & Rao, R. (2016). Calcium-ATPases: Gene disorders and dysregulation in cancer. *Biochemica et Biophysica Acta. Biophys* 1863 (6 Pt B), 1344–50. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.016

219) Heidari R, Ahmadi A, Mohammadi H, Ommati MM, Azarpira N, Niknahad H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress are involved in the mechanism of methotrexate-induced renal injury and electrolytes imbalance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 107: 834-40. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.050.

220) Watanabe T, Yoshikawa H, Yamazaki S, Abe Y, Abe T. Secondary renal Fanconi syndrome caused by valproate therapy. *Pediatric Nephrology*. 2005; 20(6): 814-7. doi: 10.1007/s00467-005-1827-7.

221) Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016: 5698931. doi: 10.1155/2016/5698931.

222) Singer P, Sethna CB, Castellanos-Reyes L, Yaskiv O, Bijol V. Kidney biopsy findings in a patient with valproic acid-associated Fanconi syndrome. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2019; 22(4): 370-74. doi: 10.1177/1093526618819334.

223) Heidari R. The footprints of mitochondrial impairment and cellular energy crisis in the pathogenesis of xenobiotics-induced nephrotoxicity, serum electrolytes imbalance, and Fanconi's syndrome: A comprehensive review. *Toxicology*. 2019. 423: 1-31. doi: 10.1016/j.tox.2019.05.002.

224) Briones-Herrera A, Ramírez-Camacho I, Zazueta C, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Altered proximal tubule fatty acid utilization, mitophagy, fission and supercomplexes arrangement in experimental Fanconi's syndrome are ameliorated by sulforaphane-induced mitochondrial biogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2020; 153: 54-70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.010.

225) Murphy RA, Stafford RM, Petrasovits BA, Boone MA, Valentovic MA. Establishment of HK-2 Cells as a Relevant Model to Study Tenofovir-Induced Cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(3): 531. doi: 10.3390/ijms18030531.

226) Van Beneden K, Geers C, Pauwels M, Mannaerts I, Verbeelen D, van Grunsven LA, Van den Branden C. Valproic acid attenuates proteinuria and kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011; 22(10): 1863-75. doi: 10.1681/ASN.2010111196.

227) Costalonga EC, Silva FM, Noronha IL. Valproic Acid Prevents Renal Dysfunction and Inflammation in the Ischemia-Reperfusion Injury Model. *Biomed Research International*. 2016; 2016: 5985903. doi: 10.1155/2016/5985903.

228) Zacharias N, Sailhamer EA, Li Y, Liu B, Butt MU, Shuja F, Velmahos GC, de Moya M, Alam HB. Histone deacetylase inhibitors prevent apoptosis following lethal hemorrhagic shock

in rodent kidney cells. *Resuscitation*. 2011; 82(1): 105-9. doi: 10.1016/j.resuscitation.2010.09.469.

229) Speir RW, Stallings JD, Andrews JM, Gelnett MS, Brand TC, Salgar SK. Effects of valproic acid and dexamethasone administration on early bio-markers and gene expression profile in acute kidney ischemia-reperfusion injury in the rat. *PLOS One*. 2015; 10(5): e0126622. doi: 10.1371/journal.pone.0126622.

230) Brar R, Singh JP, Kaur T, Arora S, Singh AP. Role of GABAergic activity of sodium valproate against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2014; 387(2): 143-51. doi: 10.1007/s00210-013-0928-2.

231) Biesterveld BE, Siddiqui AZ, O'Connell RL, Remmer H, Williams AM, Shamshad A, Smith WM, Kemp MT, Wakam GK, Alam HB. Valproic Acid Protects Against Acute Kidney Injury in Hemorrhage and Trauma. *Journal of Surgical Research*. 2021; 266: 222-229. doi: 10.1016/j.jss.2021.04.014.

232) Grinberg M, Stöber RM, Albrecht W, Edlund K, Schug M, Godoy P, Cadenas C, Marchan R, Lampen A, Braeuning A, Buhrke T, Leist M, Oberemm A, Hellwig B, Kamp H, Gardner I, Escher S, Taboureau O, Aguayo-Orozco A, Sachinidis A, Ellinger-Ziegelbauer H, Rahnenführer J, Hengstler JG. Toxicogenomics directory of rat hepatotoxicants in vivo and in cultivated hepatocytes. *Archives of Toxicology*. 2018; 92(12): 3517-3533. doi: 10.1007/s00204-018-2352-3.

233) Ranea-Robles P, Portman K, Bender A, Lee K, He JC, Mulholland DJ, Argmann C, Houten SM. Peroxisomal L-bifunctional protein (EHHADH) deficiency causes male-specific kidney hypertrophy and proximal tubular injury in mice. *Kidney* 360. 2021; 2(9): 1441-54. doi: 10.34067/KID.0003772021.

234) Forst, A. L, Reichold, M, Kleta, R, & Warth, R. Distinct Mitochondrial Pathologies Caused by Mutations of the Proximal Tubular Enzymes EHHADH and GATM. *Frontiers in Physiology*. 2021; 12, 715485. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.715485

235) Klootwijk ED, Reichold M, Helip-Wooley A, Tolaymat A, Broeker C, Robinette SL, Reinders J, Peindl D, Renner K, Eberhart K, Assmann N, Oefner PJ, Dettmer K, Sterner C, Schroeder J, Zorger N, Witzgall R, Reinhold SW, Stanescu HC, Bockenhauer D, Jaureguiberry G, Courtneidge H, Hall AM, Wijeyesekera AD, Holmes E, Nicholson JK, O'Brien K, Bernardini I, Krasnewich DM, Arcos-Burgos M, Izumi Y, Nonoguchi H, Jia Y, Reddy JK, Ilyas M, Unwin RJ, Gahl WA, Warth R, Kleta R. Mistargeting of peroxisomal EHHADH and inherited renal Fanconi's syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2014; 370(2): 129-38. doi: 10.1056/NEJMoa1307581.

236) Ding S, Qiu H, Huang J, Chen R, Zhang J, Huang B, Zou X, Cheng O, Jiang Q. Activation of 20-HETE/PPARs involved in reno-therapeutic effect of naringenin on diabetic nephropathy. *Chemico-Biological Interactions*. 2019; 307: 116-24. doi: 10.1016/j.cbi.2019.05.004.

237) Sheridan AM, Fitzpatrick S, Wang C, Wheeler DC, Lieberthal W. Lipid peroxidation contributes to hydrogen peroxide induced cytotoxicity in renal epithelial cells. *Kidney International*. 1996; 49(1): 88-93. doi: 10.1038/ki.1996.12.

238) Al-Ghamdi SS, Chatterjee PK, Raftery MJ, Thiemermann C, Yaqoob MM. Role of cytochrome P4502E1 activation in proximal tubular cell injury induced by hydrogen peroxide. *Renal Failure*. 2004; 26(2):103-10. doi: 10.1081/jdi-120038483.

239) Singh D, Chander V, Chopra K. Protective effect of naringin, a bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. *Toxicology*. 2004; 201(1-3): 143-51. doi: 10.1016/j.tox.2004.04.018.

240) Gandhi GR, Vasconcelos ABS, Wu DT, Li HB, Antony PJ, Li H, Geng F, Gurgel RQ, Narain N, Gan RY. Citrus flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: a systematic review of in vitro and in vivo studies. *Nutrients*. 2020; 12(10): 2907. doi: 10.3390/nu12102907.

241) Chtourou Y, Aouey B, Aroui S, Kebieche M, Fetoui H. Anti-apoptoticand anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. *Chemico-Biological Interactions.* 2016; 243:1-9. doi: 10.1016/j.cbi.2015.11.019.

242) Miner JH. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatric Nephrology*. 2011; 26(9): 1413-7. doi: 10.1007/s00467-011-1785-1.

243) Kumar P. Grading of severity of the condition in burn patients by serum protein and albumin/globulin studies. *Annals of Plastic Surgery*. 2010. 65(1):74-9. doi: 10.1097/SAP.0b013e3181c47d71.

244) Lorente L, Martín MM, Abreu-González P, et al. Prognostic value of malondialdehyde serum levels in severe sepsis: a multicenter study. *PLoS One*. 2013;8(1): e53741. doi:10.1371/journal.pone.0053741

245) Taccone FS, Stordeur P, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Gamma-globulin levels in patients with community-acquired septic shock. *Shock*. 2009; 32(4): 379-85. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181a2c0b2.

246) Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biology and Chemistry*. 2003; 278(33):31426-33. doi: 10.1074/jbc.M212549200.

247) Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001; 30(11):1286-92. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00521-4.

248) Ahmad R, Tripathi AK, Tripathi P, Singh S, Singh R, Singh RK. Malondialdehyde and protein carbonyl as biomarkers for oxidative stress and disease progression in patients with chronic myeloid leukemia. *In Vivo*. 2008; 22(4):525-8.

249) Kovesdy CP, Ureche V, Lu JL, Kalantar-Zadeh K. Outcome predictability of serum alkaline phosphatase in men with pre-dialysis CKD. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010. 25(9): 3003-11. doi: 10.1093/ndt/gfq144.

250) Gerçek E. i sur. Biochemical changes and antioxidant capacity of naringin and naringenin against malathion toxicity in Saccharomyces cerevisiae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Toxicology & Pharmacology*. 2021. doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108969

251) Acaz-Fonseca E, Ortiz-Rodriguez A, Garcia-Segura LM, Astiz M. Sex differences and gonadal hormone regulation of brain cardiolipin, a key mitochondrial phospholipid. *Journal of Neuroendocrinology*. 2020; 32(1): e12774. doi: 10.1111/jne.12774.

252) Brady CW. Liver disease in menopause. *World Journal of Gastroenterology*. 2015; 21(25): 7613-7620. doi:10.3748/wjg.v21.i25.7613

253) Nathan L, Chaudhuri G. Antioxidant and prooxidant actions of estrogens: potential physiological and clinical implications. *Seminars in Reproductive Endocrinology*. 1998; 16(4): 309-14. doi: 10.1055/s-2007-1016289.

254) Maclusky, Neil J, Naftolin Frederick, Krey C. Lewis, Franks Stephen. The catechol estrogens. *Journal of steroid biochemistry*. 1981; 15: 111-124. https://doi.org/10.1016/0022-4731(81)90265-X

255) Torrens-Mas M, Pons DG, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. Sexual hormones regulate the redox status and mitochondrial function in the brain. Pathological implications. *Redox Biology*. 2020; 31:101505. doi: 10.1016/j.redox.2020.101505.

256) Duong P, Tenkorang MAA, Trieu J, McCuiston C, Rybalchenko N, Cunningham RL. Neuroprotective and neurotoxic outcomes of androgens and estrogens in an oxidative stress environment. *Biological Sex Differences*. 2020; 11(1): 12. doi:10.1186/s13293-020-0283-1.

257) Verma Y, Rana SV. Modulation of CYP4502E1 and oxidative stress by testosterone in liver and kidney of benzene treated rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008; 46(8): 568-72.

258) Teppner M, Boess F, Ernst B, Pähler A. Biomarkers of flutamide-bioactivation and oxidative stress in vitro and in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*. 2016; 44(4): 560-9. doi: 10.1124/dmd.115.066522.

259) Cruz-Topete D, Dominic P, Stokes KY. Uncovering sex-specific mechanisms of action of testosterone and redox balance. *Redox Biology*. 2020. 31:101490. doi: 10.1016/j.redox.2020.101490.

260) Zhang G, Cui R, Kang Y, Qi C, Ji X, Zhang T, Guo Q, Cui H, Shi G. Testosterone propionate activated the Nrf2-ARE pathway in ageing rats and ameliorated the age-related changes in liver. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 18619. doi: 10.1038/s41598-019-55148-0.

261) He H, Yang F, Liu X, Zeng X, Hu Q, Zhu Q, Tu B. Sex hormone ratio changes in men and postmenopausal women with coronary artery disease. *Menopause*. 2007;14(3 Pt 1):385-90. doi: 10.1097/01.gme.0000235369.24479.dd..

262) Turola E, Petta S, Vanni E, Milosa F, Valenti L, Critelli R, Miele L, Maccio L, Calvaruso V, Fracanzani AL, Bianchini M, Raos N, Bugianesi E, Mercorella S, Di Giovanni M, Craxì A, Fargion S, Grieco A, Cammà C, Cotelli F, Villa E. Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis. *Disease Models and Mechanisms*. 2015; 8(9): 1037-46. doi: 10.1242/dmm.019950.

263) Della Torre S. Beyond the X Factor: Relevance of sex hormones in NAFLD pathophysiology. *Cells*. 2021; 10(9): 2502. doi: 10.3390/cells10092502.

264) Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, Ortega ÁL, Pérez S. PGC-1α, inflammation, and oxidative stress: an integrative view in metabolism. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*. 2020;2020:1452696. doi:10.1155/2020/1452696

265) Ren Z, He H, Zuo Z, Xu Z, Wei Z, Deng J. The role of different SIRT1-mediated signaling pathways in toxic injury. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2019; 24:36. doi:10.1186/s11658-019-0158-9

266) Kim SY, Kim HJ, Lee MK, Jeon SM, Do GM, Kwon EY, Cho YY, Kim DJ, Jeong KS, Park YB, Ha TY, Choi MS. Naringin time-dependently lowers hepatic cholesterol biosynthesis and plasma cholesterol in rats fed high-fat and high-cholesterol diet. *Journal of Medical Food*. 2006; 9(4):582-6. doi: 10.1089/jmf.2006.9.582.

267) Kim T, & Yang Q. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. *World journal of cardiology*. 2013; 5(6): 164–74. https://doi.org/10.4330/wjc.v5.i6.164

268) Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Faivre B, Chastel O, Sorci G. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2007; 274(1611): 819-25. doi: 10.1098/rspb.2006.3764.

269) Pérez-Torres I, Roque P, El Hafidi M, Diaz-Diaz E, Baños G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radical Research*. 2009; 43(8): 761-71. doi: 10.1080/10715760903045296.

270) ÖzdemirKumral ZN, Kolgazi M, Üstünova S, KasımayÇakır Ö, Çevik ÖD, Şener G, Yeğen BÇ. Estrogen receptor agonists alleviate cardiac and renal oxidative injury in rats with renovascular hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2016; 38(6): 500-9. doi: 10.3109/10641963.2015.1116550.

271) Park YJ, Kim JM. Klotho and postmenopausal hormone replacement therapy in women with chronic kidney disease. *Journal of Menopausal Medicine*. 2018; 24(2): 75-80. doi:10.6118/jmm.2018.24.2.75

272) MedlinePlus. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); Lactate dehydrogenase test. https://medlineplus.gov/lab-tests/lactate-dehydrogenase-ldh-test/ Ažurirano 2020. Pristupljeno Ožujak 2022.

10 ŽIVOTOPIS DOKTORANDA

David Jutrić rođen je 1980. godine u Zagrebu (Republika Hrvatska). U Chicagu (SAD) je završio osnovnu školu. Srednju školu završava u A. J. Dimond High School u Anchorageu, (Alaska, SAD). Godine 1999. upisuje fakultet University of Alaska (Anchorage), smjer Biologija i predstudij medicine. 2001. godine u Los Angelesu (Northridge, CA, SAD) završava studij Biologije i diplomira 2004. godine. Od 2004. do 2007. godine radi na Sveučilištu California State University u Northridgeu kao laboratorijski asistent. Godine 2007. upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji završava 2013. godine te stječe zvanje doktor medicine. Od 2013. do 2014. godine obavlja staž u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice. Od lipnja do rujna 2014. radi u Hitnoj medicinskoj službi grada Šibenika. Od rujna 2014. do travnja 2015. radi kao sekundarac u Općoj bolnici Vukovar. U travnju 2015. počinje specijalizaciju iz hitne medicine u Kliničkoj bolnici Dubrava. Specijalizaciju završava u roku, a specijalistički ispit uspješno polaže 1. srpnja 2020. godine te stječe zvanje specijalist hitne medicine. Doktorski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2015. godine. Tijekom studija sudjelovao je na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima. Godine 2019. dobio je međunarodnu nagradu „Valentina De Castro“ za izvrsno predavanje i temu na 7. međunarodnoj konferenciji Mediteranskog društva za neuroznanost održanoj u Marakešu (Maroko). Do danas je zaposlen u KB Dubrava gdje radi na odjelu za hitni prijem. Autor je i koautor 5 znanstvenih radova i kongresnih priopćenja.

11 POPIS RADOVA

1) Jutrić D., Đikić D., Boroš A., Odeh D., Domjanić Drozdek, S. Gračan, R., Dragičević P., Crnić I., Landeka Jurčević I. The effects of valproate and naringin and their coadministration on the liver PPARα, PGC-1α, NFE2R2 and ACOX1 and cellular antioxidative parameters in C57Bl6 mice. *Archives of Industrial Hygieneand Toxicology* 2022; 73:71-82. doi: 10.2478/aiht-2022-73-3608

2) Oršolić N., Landeka Jurčević I., Đikić D., Rogić D., Odeh D., Balta V., Perak Junaković, E. Terzić S., & Jutrić D. (2019). Effect of Propolis on Diet-Induced Hyperlipidemia and Atherogenic Indices in Mice. *Antioxidants*. (Basel, Switzerland). 8(6): 156. https://doi.org/10.3390/antiox8060156

3) Špeljko T., Jutrić D., Šimić G. HSV1 in Alzheimer's disease: myth or reality? // *Translational Neuroscience*. (2011). 2(1): 61-68 doi:10.2478/s13380-011-0009-2 (međunarodna recenzija, pregledni rad, znanstveni)

4) Đikić D., Jutrić D., Dominko K.. The Dual Nature of the Antiepileptic Drug Valproic Acid // *Southeastern European Medical Journal.* (2017). 1(1): 74-89 (međunarodna recenzija, pregledni rad, znanstveni)

5) Jutrić D., Krajinović V. i Santini M. (2017). Images in Infectious Diseases: Tetanus originating from ulcerated breast cancer. *Infektološki glasnik*. 37(3-4) 115-116. Preuzeto s https://hrcak.srce.hr/220035

Aktivno sudjelovanje na međunarodnim konferencijama:

1) 03/2019 Opatija, Hrvatska 4. konferencija zdravstvenih profesija s međunarodnim sudjelovanjem.

Jutrić D., Jurić D., Marić E., Odeh D., Oršolić N., Landeka I., Đikić D. Učinci antiepileptika valproata i flavonona naringenina na antioksidacijski sustav obrane u mozgu u c57b16 miševa

2) 05/2019 Pula, Hrvatska Mind Brain Conference ABSTRACT BOOK 2019 / Mind&Brain – 59th INPC / Lectures; Usmeno izlaganje

Jutrić D., Đikić D., Jurić D., Marić E., Odeh D., Oršolić N., Landeka I.: Effects of the antiepileptic valproate and of the flavonone naringenin on the antioxidative defence system in the brain of c57bl6 mouse .

3) MEDILS SPLIT, HRVATSKA 2019 Advances in Biomedical Research III:
Jutrić D., Jurić D., Marić E., Odeh D., Oršolić N., Landeka I., Đikić D.

Effects of the antiepileptic valproate and of the flavonone naringenin on the antioxidative defence system in the brain of C57B16 mouse

4) 7th Conference of the Mediterranean Neuroscience Societyin Marrakech, Morocco
Jutrić D., Jurić D., Marić E., Odeh D., Oršolić N., Landeka I., Đikić D.

Effects of the antiepileptic valproate and of the flavonone naringenin on the antioxidativ edefence system in the brain of C57Bl6 mouse

5) Prague, Chech Republic EUSEM 2019 CPR / RESUSCITATION David Jutrić #18921 : David Jutrić, Igor Nikolic, Vedran Cesarec, Domagoj Đikić

The new indications in emergency thoracotomy

6) EUSEM 2020 ONLINE

Jutric, D., Andrić, D., Đikić, D. The Role of Hyperbaric Oxygen Therapy in Blunt Thoracic Trauma

7) 5 Kongres Hitne Medicine ONLINE 2020 - Pod pokroviteljstvom Hrvatskog Zavoda za hitnu medicinu

David Jutrić, Domagoj Đikić. Early intubation of elderly with acute respiratory failure saves lives

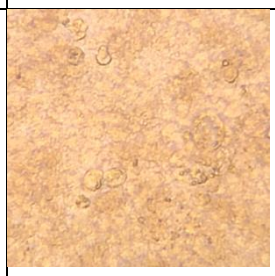
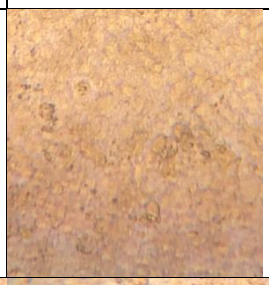
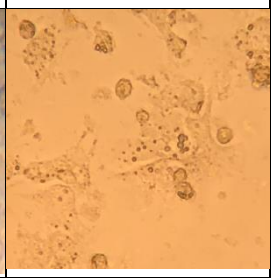
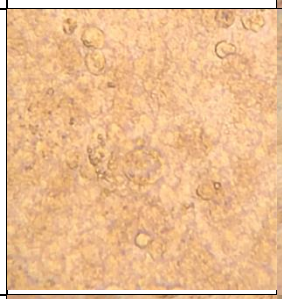
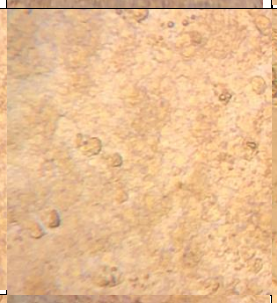
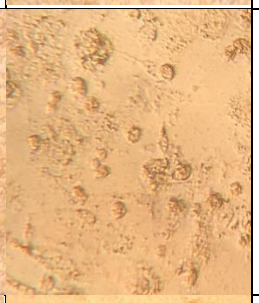
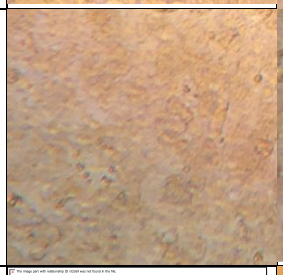
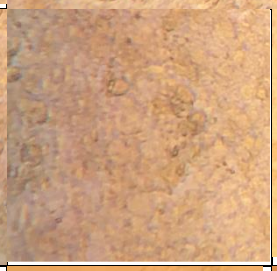
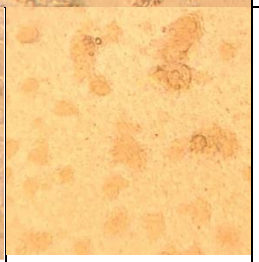
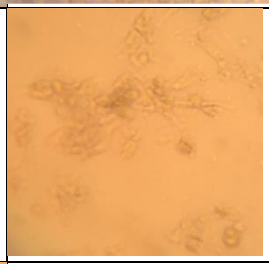
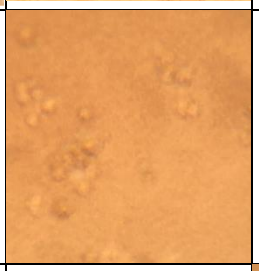
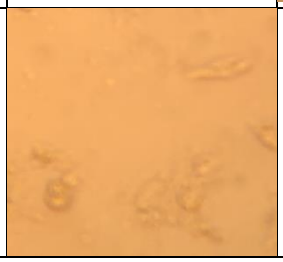
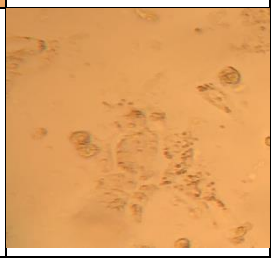
8) Lisabon, Portugal.EUSEM 10/2021CPR / RESUSCITATION Abstrakt:#26824 :

David Jutrić, Domagoj Đikić

Valproic Acid Could Be the New Wonder Drug for the Resuscitation of the Polytrauma Patient

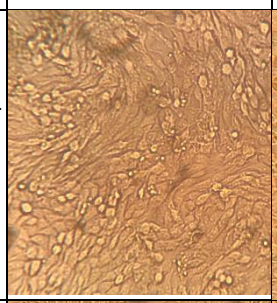
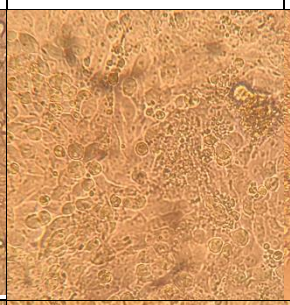
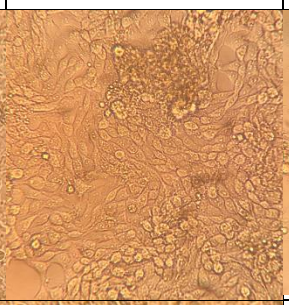
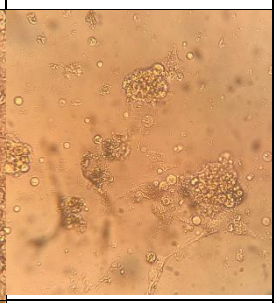
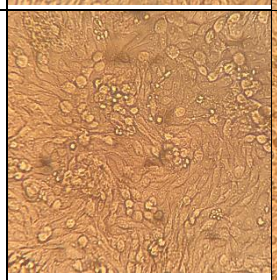
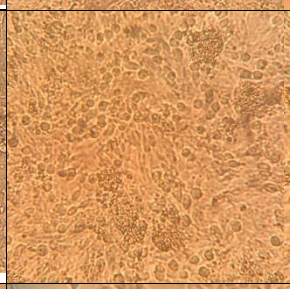
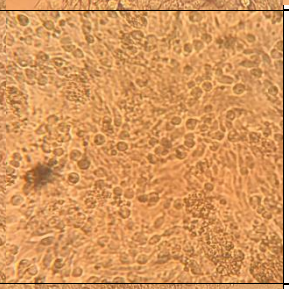
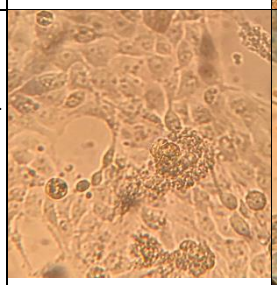
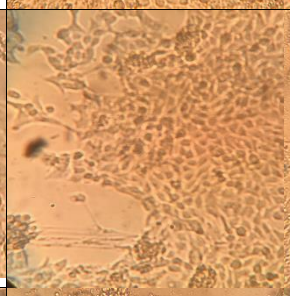
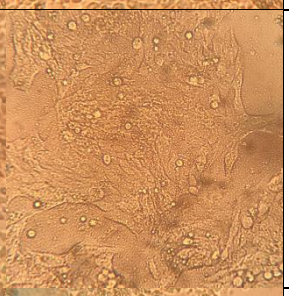
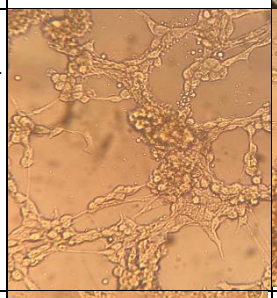
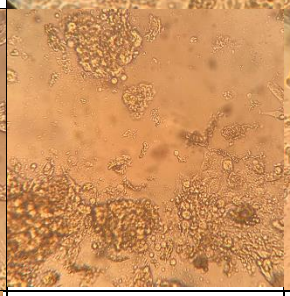
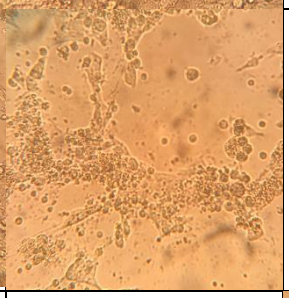
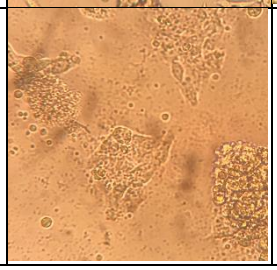
12 PRILOZI

PRILOG 1. Pokus *in vitro*, HepG 2 stanice jetre u kulturi

Hep G2 stanice	Valproat 0 mM/mL	Valproat 1 mM/mL	Valproat 5 mM/mL	Valproat 10 mM/mL
Naringin 0 mM/mL				
Naringin 0,1 mM/mL				
Naringin 1 mM/mL				
Naringin 5 mM/mL				
Naringin 10 mM/mL				

Slika P1. Izgled stanične kulture i vijabilnost stanica jetre HepG2 tretiranih različitim koncentracijama vaproata i naringina.

PRILOG 2 . Pokus *in vitro*, PK15 stanice bubrega u kulturi

PK stanice	Valproat 0 mM/mL	Valproat 1 mM/mL	Valproat 5 mM/mL	Valproat 10 mM/mL
Naringin 0 mM/mL				
Naringin 0,1 mM/mL				
Naringin 1 mM/mL				
Naringin 5 mM/mL				
Naringin 10 mM/mL				

Slika P2. Izgled stanične kulture i vijabilnost stanica bubrega PK15-stanice, tretiranih različitim koncentracijama valproata i naringina.