

Naslov projekta	„Učinak antiepileptika valproata na lipide i oksido-redukcijku ravnotežu i antioksidativni status <i>in vivo</i> “		
Trajanje projekta	3 godine trajanja projektnog prijedloga izrade disertacije U eksperimentalnom dijelu projekta (odnosno izravni eksperiment na životinjama) podijeljen je u II etape u kojima je izlaganje aktivnoj tvar predviđeno u trajanju: Prvi dio pokusa, ETAPA I: izlaganje 15 dana, i drugi dio pokusa, ETAPA II: 28 dana		
Ključne riječi (najviše do 5)	VPA, SCD1, Jajnik, Jetra, Mozak		
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika)		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
	1. Cilj je istražiti osnovne biomarkere oksidativnog stresa <i>in vivo</i> usporedbom dvaju različitih sojeva miševa sa različitim fenotipom biokemije lipida (razlika u ekspresiji ključnog enzima stearylCoA-desaturaze). Hipoteza je da će razlika u razini desaturaze utjecati na smanjenje lipidneperoksidacije, i razine antioksidacijskih enzima, a posredno time i staničnih oštećenja i nakupljanja nezasićenih masnih kiselina u tkivima jetre i jajnika. Biokemijski procesi u mozgu istih životinja, kao nezavisnog biokemijskog organa u sintezi kolesterola i prometu masnih kiselina, poslužiti će za usporedbu ovih biokemijskih procesa sa navedenim organima. U ovom dijelu istraživanja utvrđuje se najosjetljiviji soj i dinamika promjene tijekom vremena izloženosti (15 i 28 dana), koji će poslužiti za odabir modela za provođenje drugog dijela pokusa. 2. Drugi dio istraživanja za cilj ima ustanoviti protektivni učinak polifenolnog spoja naringenina na navedene biokemijske puteve, u modelu koji se pokaže kao najosjetljiviji u prvom dijelu istraživanja.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Iako je terapijski vrlo učinkovit i široko prepisivani antiepileptik, epidemiološki su zabilježene nuspojave vezane uz promet lipida (povećanje serumskih lipida, masnih kiselina, kolesterola i određenih signalnih adipokina). Uzimanjem valproata u ljudi epidemiološki je zabilježen signifikantni porast ukupne tjelesne mase i razvoj adipoznosti, hipertenzije, ateroskleroze. Tkiva različito reagiraju na promjene u prometu lipida, u jetri ljudi koji uzimaju valproat dolazi do nakupljanja lipida, masnih kiselina i kolesterola i razvoja steatoze i <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> , dok primjerice u mozgu dislipidemija i povećanje ili nakupljanje lipida nije toliko uznapredovalo (dokazano na <i>in vivo</i> modelima miš i štakor). Hepatotoksičnost uzrokovana steatozom i poremećajem prometa lipida uzrok je sporadične smrtnosti u odraslih (1/2000) dok su posebice osjetljiva djeca do pete godine života gdje je zabilježena smrtnost od 1/500 do 1/800 pacijenata, uglavnom zbog hepatotoksičnosti. Nadalje izraženi epidemiološki učinak zabilježen je u žena gdje je poremećaj smanjenje estrogena i povećanja pojavnosti polističkih jajnika, posebice u		

	pacijentica do 20 godine života. Biokemijski mehanizmi navedenih epidemioloških učinaka nisu do kraja razjašnjeni i uglavnom su provedeni na <i>invitro</i> istraživanjima. Postoje dokazi povećanju metabolizma masnih kiselina (enzimske aktivnosti <i>fatyacidsintetaze</i>, <i>carnitintransferaze</i> i <i>acetilaze</i>) u <i>invitrouvjetima</i>, ali u <i>in vivo</i> uvjetima ovi procesi nisu do kraja razjašnjeni. Također u jajnicima (policiistički jajnici) mehanizam djelovanja se povezuje sa inhibicijom CYP-enzima zaduženih za pretvorbu testosterona u estrogen i u povećanom prometu kolesterola. (Ouriqueetal. 2016a; Ouriqueetal. 2016b) Hipoteza i ciljevi rada baziraju se na novijim istraživanjima na izoliranim stanicama bubrega <i>in vitro</i> u kojim je pokazan poremećaj u redoks procesima i antioksidativnom sustavu obrane nefrocitaezimsikim sustavima promjena na razini reduciranog glutationa (GSH) dokazanim antioksidansomquercitinom. Također postoje dokazi da valproat djeluje na oksidoredukcijsku aktivnost mitohondrija i antioksidativne sustave obrane stanica (Jafarianetal. 2013, Komulainenetal. 2015) i ekspresiju gena odgovornih za antioksidacijsku obranu (Leone et al. 2014). Radovi koji povezuju mehanizme oksidoredukcijske ravnoteže i antioksidativnih enzima <i>in vivo</i> u jetri ili jajniku su rijetki (uglavnom <i>in vitro</i>). Nedavni pregledni radovi (koji uglavnom navode indicije oksidativne neravnoteže iz <i>in vitro</i> modela) zaključuju da je potrebno detaljnije istražiti ulogu oksidativnog stresa u mehanizmima toksičnosti valproata. Također, postoji nekoliko navoda u istraživanjima protektivnih učinaka antioksidansa na navedene antioksidativne i lipidne biokemijske puteve upotrebom poznatih antioksidansa primjerice astaksantina, folne kiseline, cinka, PUFA masnih kiselina (EPA, DHA) i quercitina (Al Aminetal. 2015;Chaudharyetal. 2015; El-Shenawy et al.2015; Ourique et al. 2016a; Ouriqueetal. 2016b), ali drugi polifenolni spojevi nisu istraživani, poput primjerice naringenina čiji je poznati učinak u interakciji sa lipidnim biokemijskim putevima u prevenciji debljine.
Keje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U <i>in vivo</i> studiji koristit će se miševi C57Bl6 i miševi BALB/C ili CBA. Ukupan broj životinja u pokusu je 144.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Primjenjivana doza valproata preračunata je iz preporučene dnevne doze za ljude prema formuli AED (Animal equivalent dose) i iznositi će 600 mg/kg životinje. Doza će se primjeniti <i>per os</i> u obliku vodene otopine jednom dnevno gastričkomkanilom. Vrijeme aplikacije biti će 15 i 28 dana prema standardima testiranja subkronične toksičnosti (Tablica 1), prema Standard OECD test oral repeated subchronic dose OECD 407. Nakon navedenog pokusnog razdoblja sve životinje će se uspavati injekcijom Xylapana 40mg/kg i Narketana 10 mg/kg te će se ovako anestezirane životinje usmrtniti finalnom dekapitacijom u anesteziranom stanju kako bi se prikupili organi za navedene biokemijske analize. Ukoliko se uoče nepovoljni učinci tijekom pokusa odredit će se endpoint, pri čemu će se postupati prema unaprijed određene humane krajnje točke (treba reći koje su te točke, npr reći da će se eutanazirati u slučaju da se pokažu 4 znaka boli druge razine prema „grimace scales“ http://www.m3a.org.uk/animalcare/407). Takve životinje će biti uklonjene iz pokusa te uspavane na isti navedeni način a organi će se prikupiti za određivanje patologije i navedenih biokemijskih

PROJEKAT IZ PREDMETNOG OPREMA ZA IZVEDBU IZOBILJEŽAVANJE

	parametara što također predstavlja bitan podatak u rasvjetljavanju toksičnosti valproata. Anestezija će biti primjenjivana prema AVMA <i>Guidelines for the Euthanasia of Animals 2013 Edition</i>, https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf Pokus se kvalificira kao nepovratan a težina pokusa je umjeren
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje	Apsorpcija i bioraspoloživost te antioksidativni status u plazmi i organima nakon aplikacije bioaktivnih spojevalproata može se odrediti samo u organizmu i nema zamjenskih staničnih ili <i>in vitro</i> modela koji mogu u realnom vremenu opisati procese u <u>mozeu, jetri i jajniku</u> i u plazmi.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	3R princip, sukladno statističkim izračunom prema dole navedenoj literaturi i programu G-power broj životinja sveden na najmanju a statistički pouzdanu moguću mjeru za srodene sojeve N = 6 životinja po grupi za navedene parametre ovisno o pojedinoj etapi pokusa, http://www.3rs-reduction.co.uk/assets/applets/Festing_Altman.pdf
3. Pобољшanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Prema farmakodinamici valproata u organizmu i epidemiološke nuspojave na određenom dijelu ljudi, model metabolizma apsorpcija i bioraspoloživost te korelacija sa antioksidativni status u plazmi i organima nakon aplikacije može se odrediti <u>samo</u> u organizmu i nema zamjenskih staničnih ili <i>in vitro</i> modela koji mogu u realnom vremenu opisati procese u crijevu, jetri, bubregu i plazmi. Životinje će biti u zasebnim kavezima kako bi se spriječila agresija. Okolina će biti obogaćena elementima za obogaćivanje okoliša namijenjenim za laboratorijske miševе. To su tuneli, kucice i gnijezda za miševе „twist“ (Harlan Laboratories Inc.) sukladno naputcima osobe odgovorne za dobrobit pokusnih životinja imenovane u insituciji u kojoj se provodi pokus. Životinjama se cijelo vrijeme pokusa u nastambama osiguravaju standardni tuneli i zakloni te „igračke“ radi oplemenjivanja okoline. U pokusu će se koristiti samo vaga za životinje „Sartorius“ jer se prati prirast životinja tijekom pokusnog razdoblja i gastrička mekana silikonska sonda za hranjenje biljnim izolatima. Nema drugih uređaja koji će se koristiti tijekom <i>in vivo</i> dijela pokusa.

