

Molecular mechanisms of valproic acid action and its potential neuroprotective effect

Molekularne mechanizmy działania kwasu walproinowego i ich wpływ na potencjalne działania neuroprotekcyjne

Elżbieta Bronisz, Jan Bembenek, Iwona Kurkowska-Jastrzębska

ABSTRACT

Valproic acid is a well-known drug long used in neurology as an antiepileptic drug and in psychiatry because of its mood-stabilising effect. Various mechanisms of valproic acid activity have been described (through gamma-aminobutyric acid system – GABA, glutamatergic activity, monoamines, ion channels, gene expression modulation and others), resulting in a decrease of neuronal activity but also affecting other processes, such as apoptosis, inflammation and differentiation of neurons. A wide range of possible activity mechanisms enables the potential use of this “old drug” in new indications. One

of the considered aspects of valproic acid activity is its neuroprotective effect, which has been noted so far both in the cellular and in the animal models. The aim of this article is to recapitulate current knowledge on the well-known and novel mechanisms of valproic acid activity in the context of its possible neuroprotective effect.

STRESZCZENIE

Kwas walproinowy jest lekiem znanym i od dawna stosowanym w neurologii, przede wszystkim jako lek przeciwpadaczkowy, a także w psychiatrii – w związku z działaniem stabilizującym nastroj. Obecnie prowadzone są badania mające na celu poznanie innych potencjalnych zastosowań kwasu walproinowego oraz mechanizmów leżących u ich podłoża. Dotychczas opisano różnorodne mechanizmy działania kwasu walproinowego (m.in. działanie poprzez układ kwasu gamma-aminomasłowego, aktywność glutaminergiczną, wpływ na monoaminy, kanały jonowe, modulację ekspresji genów), w konsekwencji mające wpływ nie tylko na aktywność komórek nerwowych, ale również na inne procesy, np. apoptozę, zapalenie oraz różnicowanie komórek nerwowych. Szerokie spektrum możliwych mechanizmów działania daje podstawę do potencjalnego zastosowania „starego” leku w nowych wskazaniach. Jednym z rozważanych aspektów działania kwasu walproinowego jest jego wpływ neuroprotekcyjny, dotychczas stwierdzany zarówno w modelach komórkowych, jak i zwierzęcych. Celem artykułu jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat dobrze znanych oraz nowych mechanizmów działania kwasu walproinowego w kontekście jego możliwego działania neuroprotekcyjnego.



Received 19.08.2015
Accepted 15.10.2015

AFFILIATION / AFILIACJA

Institute of Psychiatry and Neurology in Warsaw,
Second Department of Neurology

KEYWORDS

- neuroprotection
- valproic acid
- HDAC

SŁOWA KLUCZOWE

- neuroprotekcja
- kwas walproinowy
- deacetylazy histonowe

CORRESPONDENCE ADDRESS / ADRES DO KORESPONDENCJI

Elżbieta Bronisz

Instytut Psychiatrii i Neurologii, II Klinika Neurologiczna,
ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa, Poland
phone: +48 22 45 82 872, email: ebronisz@ipin.edu.pl

Introduction

Valproic acid is one of the most frequently used antiepileptic drugs. It was first used in the 1960s and it was synthesised at the end of the 19th century as an analogue of valeric acid. At present, valproic acid is applied as an antiepileptic in the treatment of all types of epileptic seizures as well as in some emergency cases in order to interrupt an epileptic state (Betjemann and Lowenstein 2015). The results of various studies suggest that valproic acid probably presents the widest spectrum of antiepileptic activity among the currently used medicines and is one of the most frequently prescribed antiepileptics (Ghodhe-Puranik *et al.* 2013; Ge *et al.* 2015). According to the Summary of Medicinal Product Characteristics, apart from epilepsy, valproic acid is also applied as a mood stabiliser in patients with the affective bipolar disease and in the treatment of mania episodes in patients who cannot be treated with lithium. Furthermore, valproic acid is effective in decreasing the frequency of aggressive behaviours and excitement in dementia patients (Sandborn *et al.* 1995), in the treatment of neuropathic pain (as the 3rd-line therapy - Worliczek *et al.* 2011), in chronic and acute migraine and in the prevention of migraine pains (Evans 2013; Rahimdel *et al.* 2014; Linde *et al.* 2013).

The main mechanism of the antiepileptic activity of valproic acid is believed to be its effect on the neurotransmitters systems; however, new possibilities have been postulated. The mechanisms which have been recognised so far include the following:

- an increase of activity of the gamma-aminobutyric acid system (GABA);
- a decrease of the glutamatergic activity through the regulation of NMDA receptors;
- the effect on the monoamines;
- blocking the voltage-dependent sodium channels;
- a decrease of activity of the T-type calcium channels and voltage-gated potassium channels.

Recently, it has been stressed that valproic acid may have a protective effect towards neurons. Its potential neuroprotective action may directly result from its antiepileptic activity; however, it seems that it mainly results from the following mechanisms: gene expression modulation – the activity through inhibition of histone deacetylases, modification of inflammatory processes and also the effect on cell signalling pathways, e.g. the kynurenine pathway (Johanessen and Johanessen 2003; Löscher 1999; Ximenes *et al.* 2012; Maciejak *et al.* 2013).

The effect on neurotransmitters systems

Valproic acid is successfully applied as a mood stabiliser by regulating the GABA-ergic system. The effect of valproic acid on the GABA-ergic system is

multidimensional, and it eventually results in the increase of the amount of this neurotransmitter. Various studies show that valproic acid quickly and significantly increases the GABA concentration in the brain (e.g. Löscher 1999). Valproic acid increases the activity of glutamic acid decarboxylase (GAD), which is necessary for the synthesis of γ -aminobutyric acid. Also, its possible effect on gene expression for GAD is highlighted by hyper-acetylation of histones (the epigenetic activity of valproic acid will be discussed below). Furthermore, it inhibits the activity of enzymes responsible for degradation of the γ -aminobutyric acid: GABA transaminase (GABA-T), succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) and inhibits and inactivates α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH). Apart from its effect on the synthesis and degradation of GABA, valproic acid decreases the turnover and reuptake of the γ -aminobutyric acid. The increase of GABA level by valproic acid leads to the increase of the GABA-dependent postsynaptic inhibition in neurons of mammals (Monti *et al.* 2009). Valproic acid also increases the GABA concentration in blood serum in humans (Löscher 1999). Furthermore, the effect of valproic acid on the increase of GABA binding to receptors has been described: GABA-A, where it probably acts on site of the binding for benzodiazepines (its effect is blocked in the presence of zolpidem), and GABA-B, where it increases the baclofen binding within hippocampus (Cunningham *et al.* 2003; Monti *et al.* 2009). Additionally, valproic acid inhibits the GABA-GAT1 transporter – the isoform, which is most frequent in nerve endings (Eckstein-Ludwig *et al.* 1999). Also, there are reports on a concentration-dependent effect of valproic acid on GABA release. Biggs *et al.* observed the inhibition of the release of this neurotransmitter in the presence of low concentration of valproic acid and the increase of release at higher concentration of the drug (Biggs *et al.* 1992).

Valproic acid inhibits depolarisation resulting from the activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and decreases the glutamatergic transmission (Johanessen and Johanessen 2003). This is one of the mechanisms reducing the excitability of neurones and increasing the epileptic threshold. The reduction of glutamatergic transmission may have a protective effect on neurones both in chronic neurodegeneration processes and in acute brain injuries (Calabresi *et al.* 2000; Barone and Feuerstein 1999). In the physiological conditions, glutamate is secreted to the synaptic spaces and is mainly removed by astrocytes. The glutamate-dependent excitotoxicity originates in the situation of its excessive amounts in the extracellular space, e.g. in the regions covered by ischaemia or injury, where there comes to an uncontrolled release of glutamate from the damaged cells (Leker and Shohami 2002) and the excessive activation of AMPA receptors (activated

by the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) as well as NMDA. The ion channel bound with the NMDA receptor transmits Na^+ and Ca^{2+} ions. The AMPA receptors control the initial depolarisation of cytomembrane caused by glutamate and have an effect on the opening of the NMDA receptors. Excessive or prolonged activation of glutamate-dependent receptors causes an increased mobilisation of intracellular calcium, which in turn leads to an increase of oxidative stress and the activation of lytic proteins whose action leads to cell death. The main mechanisms responsible for the damaging activity of glutamate is believed to be the intracellular accumulation of calcium and the decrease of the mitochondria electrochemical gradient (El Idrissi and Trenkner 1999; Calabresi *et al.* 2000). Inhibition of receptors for glutamate has a protective effect in various experimental models of brain injury. Valproic acid – apart from the NMDA receptor inhibition – also decreases glutamate release, which can be dependent on blocking of voltage-dependent sodium channels within the neurons of cerebral cortex and other subcortical structures (Cunningham *et al.* 2003). Valproic acid may also regulate the glutamate level through the increase of the reuptake of this neurotransmitter. In the neurones of the cerebral cortex of a rat, a long-term use of valproic acid inhibits the glutamate-dependent excitotoxicity and increases the life span of these cells (Hashimoto *et al.* 2002; Ren *et al.* 2004). Blocking the receptors for glutamate reduces

the death of neurones caused by ischaemia within the striatum (Le Peillet *et al.* 1992). Also, in the toxicity model induced by malonate – caused by the excessive accumulation of glutamate in the extracellular space – the neuroprotective activity of valproic acid was observed (Morland *et al.* 2004). In the *post mortem* studies in patients with mood disorders, cerebral atrophy and loss of the glutaminergic neurones were significantly lower in patients treated with valproic acid (or lithium) than in untreated patients (Hashimoto *et al.* 2002).

A chronic administration of valproic acid also influences the changes of the monoamines level. In their study, Meshki-Baf *et al.* (1994) observed an increase of noradrenaline level within hippocampus and brain stem with its drop within hypothalamus, an increase of dopamine level in the motor cortex, hypothalamus and hippocampus as well as an increase of serotonin level within striatum and brain stem with a drop of its level in cerebellum and hypothalamus.

Inhibition of sodium channels by valproic acid has an effect on a decrease of the number of neuronal discharges, which in turn may have an effect on the decrease of glutamate release and increase of the survival rate of neurones (Pullan 1995). The effect of valproic acid on the calcium channels (Todorovic and Lingle 1995) and the potassium channels (Van Erp *et al.* 1990) has also been observed. Valproic acid also has an effect on the decrease of spontaneous neuronal discharges (Gobbi and Janiri 2006).

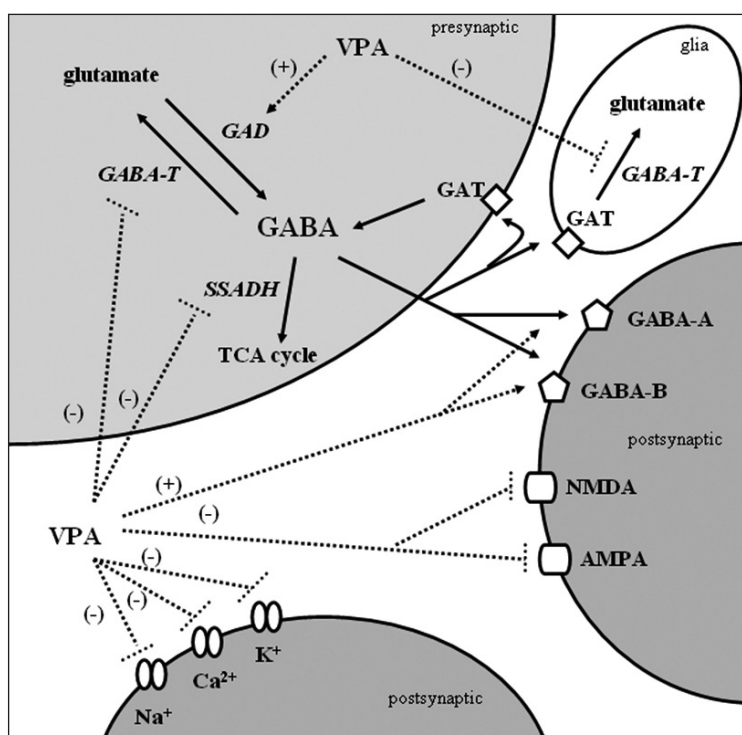


Figure 1 The effect of valproic acid on neurotransmission (valproic acid activity was marked with a dashed line; \downarrow represents inhibition; \rightarrow represents excitation)

Regulation of gene expression

One of a relatively recently discovered mechanisms of valproic acid activity is its action through epigenetic mechanisms and regulation of gene expression. The epigenetic mechanisms, which are activated by the environmental changes, such as DNA methylation, gene silencing linked with RNA or modification of histone conformation have an effect on the hereditary change in gene expression without inducing changes in DNA sequence (Egger *et al.* 2004). The remodeling of chromatin is caused by histone deacetylases (HDAC). These enzymes are engaged in modification of various cell components – mainly histones, but also transcription factors and reconstructive proteins for DNA, chaperones or proteins which take part in cell signals transmission (Chen *et al.* 2014). Because of hyper-acetylation of histone N-terminal tails, the interactions among histones and between histones and DNA are disturbed. In the state of hypo-acetylation, nucleosomes are tightly packed, therefore transcription cannot take place. The process of histone acetylation leads to the exposition of nucleosomes and makes transcription commencement possible (Lagace *et al.* 2004). The acetylation level depends on the balance between the activity of HDAC and histone acetyltransferase (Phiel *et al.* 2001). As Phiel *et al.* showed in 2001, valproic acid inhibits HDAC, hence it has an effect on the activation of transcription processes and modification of basic activities of a cell – it stimulates growth, differentiation, DNA epigenetic modification, inhibits apoptosis, influences interactions among cells as well as their migration (Monti *et al.* 2009).

HDAC are divided into three classes: class 1 consists of HDAC 1, 2, 3, and 8; class 2 includes HDAC 4, 5, 6, 7, 9, and 10, and class 3 includes HDACs, which are present in yeasts (classes 1 and 2 are present in humans). Valproic acid reduces the expression of proteins of class 1 and 2, HDAC (1, 2, 3, 8) and HDAC (4, 5, 7, 9) (Göttlicher *et al.* 2001). Through the impact on HDAC, valproic acid is engaged in the cell regulatory processes by glycogen synthase kinase-3 α , (GSK-3 α), glycogen synthase kinase-3 β , (GSK-3 β), the Akt signalling pathway, the extracellular signal-regulated kinase (ERK), the tricarboxylic acid cycle, the GABA system and the oxidative phosphorylation pathway (OXPHOS).

The phosphatidylinositol 3-kinase, (PI3K)/Akt signalling pathway was believed to be the main mechanism which supports survival and proliferation of cells. It was shown that valproic acid has an effect on GSK-3 β inactivation (De Sarno *et al.* 2002) by causing a gradual increase of its phosphorylation, both by acting on Akt and directly. Akt is a serine-threonine protein kinase, which mediates the cell survival processes and which was observed in human malignant cells in the phosphorylated form (Ximenes *et al.* 2012). It seems that phosphorylation of Akt – also referred to as protein kinase B – is connected with HDAC inhibition through the valproic acid.

The inactivation of GSK-3 β leads to the cytoprotective activity and at the same time activates the heat shock factor, i.e. the transcription factor for the heat shock protein 70 (HSP70). HSP70 is a chaperone protein, which helps other proteins to achieve a proper structure and degrade proteins of an irregular spatial arrangement. Furthermore, HSP70 shows a neuroprotective and anti-inflammatory activity. The mRNA level of HSP70 and its activity are increased by the HDAC inhibitors class I, such as valproic acid, through the PI3K/Akt signalling pathway as well as the activator proteins 1 (AP-1) (Marinova *et al.* 2009). AP-1 is one of the key transcription factors linked with the brain development, its plasticity and degradation (Ximenes *et al.* 2012). HSP70 has an inhibitory effect on the microglia activation, the nuclear factor kappa B (NF- κ B), interleukin 6, myeloperoxidase (MPO) as well as inducible nitric oxide synthase (iNOS), exerting an anti-inflammatory effect. HSP70 overexpression may also be connected with the inhibition of cytochrome 3-dependent activation of caspase-3 and may have an effect on a gradual reduction of an inflammatory response (Sinn *et al.* 2007). It seems that the induction of HSP70 as well as other histone deacetylases inhibitors by valproic acid is connected with inhibition of GSK-3.

It has been confirmed that indirect inhibition of GSK-3 causes induction of axon reconstruction and has an effect on the accumulation of proteins, which regulate the release of neurotransmitters (the so-called synapsins) in synapses (Hall *et al.* 2002). GSK-3 β plays an important function in the central nervous system by regulating various cytoskeleton proteins. By inhibition of GSK-3, valproic acid can block the synthesis of the proapoptotic factors, which promotes cell survival (Ximenes *et al.* 2012). Furthermore, a slight increase in the number and length of nervous processes has been observed, which is probably related to GSK-3 inhibition (Jeong *et al.* 2003).

HDAC inhibition also increases the acetylation of Sp1, the cytoprotective transcription factor. Sp1 belongs to the family of transcription factors that regulate apoptosis, and its level is increased as a response to the oxidative stress – either glutathione deficiency or presence of peroxides in the neurones. Hyperacetylation of Sp1 causes induction of enzymes, which have an anti-oxidative effect, and in consequence protection of cerebral cortex cells (Ryu *et al.* 2003). Furthermore, the HDAC-inhibiting medicines increase the Sp1-dependent gene expression, including HSP70 expression (Ren *et al.* 2004; Marinova *et al.* 2009). The results of the studies carried out so far suggest that adaptive changes in gene expression play an important role in the mood-stabilising activity of valproic acid in the affective bipolar disease (Brown *et al.* 2000). The observed activity of the drug in the course of the affective bipolar disease not directly upon its administration also suggests the presence of responsible changes at the genome level (Chen *et al.* 1999).

Other protein kinases connected with neurone survival are the mitogen-activated protein kinases (MAPK). Their abnormal functioning was found in patients suffering from tumours, diabetes and also in the course of inflammatory diseases. The most significant, and at the same time best-known representatives of MAPK kinases, are the ERK kinases. Valproic acid activates the ERK kinases by participating in the regulation of transcription factors and gene expression, among others through the RAS-RAF-ERK cascade, which regulates various physiological processes, e.g. having an effect on cell differentiation (Ximenes *et al.* 2012). It seems that valproic acid has an effect not only on the ERK signalling pathway, but also on the Ca^{2+} level (Lagace *et al.* 2004). Through the activation of the ERK signalling pathway also the ribosomal S6 kinase (RS6K) is activated, which in turn phosphorylates the cAMP response element-binding protein. The phosphorylated CREB protein increases the expression of the neuroprotective B-cell lymphoma protein-2 (Bcl-2) (Sinn *et al.* 2007) influencing the survival, growth and protection of neurones (Fukumoto *et al.* 2001).

The constant expression of the protein Bcl-2 increases the survival rate of cells upon exposure to various harmful factors. Furthermore, it has been shown that Bcl-2 promotes the regeneration of neurones. A chronic treatment with valproic acid doubles the amount of the protein Bcl-2 in the frontal lobes cortex in the studied rats (Chen *et al.* 1999). Another protein, whose expression is connected with the ERK signalling pathway, is the growth associated protein 43 (GAP 43). The effect of valproic acid was described on the expression of stress proteins of the endoplasmic reticulum: glucose-regulated protein 78 (GRP 78), glucose-regulated protein 94 (GRP 94) and calreticulin. These proteins play the role of chaperone proteins, capable of binding Ca^{2+} ions and preventing from the decrease of calcium level in the cell as well as abnormal protein aggregation which lead to the death of the cell (Brown *et al.* 2000). GRP 78 also inhibits accumulation of free oxygen radicals (Liu *et al.* 1997).

Another study showed the effect of valproic acid on the expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). BDNF plays an important role in the processes of survival, viability and plasticity of neurones. Stress, both acute and chronic, causes a decrease in the BDNF expression within hippocampus. A chronic administration of the medicine in rats led to the increase of BDNF expression within the frontal cortex and hippocampus, while the level of the glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) remained the same (Fukumoto *et al.* 2001). It seems that the expression of these proteins is affected by the HDAC inhibition (Wu *et al.* 2008).

The study of Ren *et al.* (2004) carried out on rats showed that valproic acid had a protective effect against the NMDA receptors-dependent excitotoxicity in mature granule cells of cerebellum in these animals through the increase of the expression of the heat shock proteins.

Another study revealed that inhibition of HDAC is connected with a reduced accumulation of the proapoptotic glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH) induced by excitotoxicity in the nucleus (Kanai *et al.* 2004). Another signalling pathway, through which valproic acid works, is the Wnt/ β -catenin pathway, participating in the regulation of embryogenesis and maintaining homeostasis of adult organisms (Wang *et al.* 2010). It also inhibits GSK-3 β , which has an effect on the modification of transmission on the Wnt/ β -catenin signalling pathway. The effect of valproic acid on this signalling pathway is connected with the induction of neuronal stem cells differentiation (Wang *et al.* 2015).

Furthermore, HDAC inhibition affects the induction of α -synuclein, a protein which participates in the formation and plasticity of synapse. The neuroprotective mechanism of its activity is based on the activation of the PI3K/Akt signalling pathway, suppression of protein p53 and c-Jun-N-terminal kinase (JNK). In granule cells of a rat cerebellum, valproic acid increases – in the course of exposure time – the protein level and mRNA for α -synuclein; therefore, it has a neuroprotective effect against the glutamate-dependent excitotoxicity (Leng and Chuang 2006). On the other hand, the deposits of α -synuclein oligomers have a neurotoxic effect and are important in pathogenesis of Parkinson's disease.

Valproic acid also controls the enzymatic pathway of oxidative phosphorylation OXPHOS. It is a system of five enzyme complexes which plays an important role in the energy generating processes, and it is also connected with various other processes. The OXPHOS pathway regulates a number of catalytic reactions and interacts with various receptors and ion channels, and – as a result – affects the regulation of gene expression (Kostrouchova *et al.* 2007). Valproic acid inhibits the activity of dihydrolipoyl dehydrogenase (DLDH) and inhibits the oxidative phosphorylation dependent on the glutamate as well as the α -ketoglutaric acid (Luis *et al.* 2007).

Moreover, valproic acid increases tryptophan concentration (TRP) and by this kynurenine (KYN) and kynurenic acid (KYNA) within the brain. It is probably connected with valproic acid blocking the site of TRP binding with plasma albumin, which increases the amount of free TRP in blood plasma and facilitates its permeability through the blood-brain barrier (Maciejak *et al.* 2013). It has been shown that KYNA reveals an antiepileptic and neuroprotective activity in the excitotoxicity models, ischaemia and encephalitis (Vamos *et al.* 2009).

The anti-inflammatory activity of valproic acid

An inflammatory condition is a causative and co-existing factor in various pathological states and central nervous system disorders. The immunological system cells, glia, vessel endothelial cells and neurones participate

in an inflammatory response. All of them secrete pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines, trophic and neurotoxic agents, such as free oxygen radicals. The regulation of an inflammatory response in the central nervous system is responsible for the size of damage in the course of acute processes (ischaemia, injury) and for the neurodegeneration progress in chronic processes. It has been shown in numerous studies that inhibition of the inflammatory response facilitates the reduction of damage in the course of various pathologies of the central nervous system.

Valproic acid modifies the inflammatory response through affecting the HDAC inhibition and causing hyperacetylation of histone and non-histone proteins. By this, it affects, e.g. the regulation of heat shock proteins, pro- and anti-inflammatory cytokines, enzymes released in the course of inflammatory processes and also modulation of hormone receptors, activation of various intracellular signalling pathways as well as transcription factors. In the cells connected with the inflammatory response, HDAC inhibition invokes a series of actions, both anti-inflammatory and exciting inflammation (Halili *et al.* 2009).

Valproic acid, as the HDAC inhibitor, reduces the release of myeloperoxidase and granulocyte migration, and also reduces the level of pro-inflammatory cytokines (Adcock 2006; Ximenes *et al.* 2012). Furthermore, as a result of inhibition, HDAC reduces the number of microglia cells inducing their death in the mechanism of apoptosis (Peng *et al.* 2005). The same study also reveals that in the situation of an exposure to LPS, valproic acid reduces production of the tumour necrosis factor α (TNF- α) in the dopaminergic cells. TNF- α is a cytokine, which participates in a number of processes connected with brain injury, e.g. it directly damages oligodendrocytes and facilitates demyelination in inflammatory processes and increases iNOS expression (Lee *et al.* 2014; Jain 2011). It has been shown that valproic acid reduces mRNA expression and the level of iNOS protein (Lee *et al.* 2014). Some authors suggest that valproic acid acts through a reduction of NF- κ B expression, by which it inhibits the production of TNF- α and IL-6 (Ichiyama *et al.* 2000). It can also directly affect the glia cells. The latter, while excited by LPS administration, under the influence of valproic acid lose the electrical potential of the mitochondrial membrane, undergo fragmentation and apoptosis (Chen *et al.* 2007). Faraco *et al.* stated that HDAC inhibition in glia cells in mice causes suppression of inflammatory response formation through modification of the transcription process (Faraco *et al.* 2009). On the other hand, valproic acid affects the change of microglia phenotype by reducing its differentiation and proliferation, by which it leads to the reduction of phagocytic action and, as a result, to the domination of inflammatory processes in the central nervous system (Gibbons *et al.* 2011).

The inflammasome also participates in the inflammatory processes within the nervous system. It is an

intracellular molecular platform which consists of various proteins and which controls secretion and activation of pro-inflammatory cytokines, e.g. IL-1 β and IL-18 responsible for activation of caspase 1 and pyroptosis process, i.e. the programmed cell death in response to an inflammation (Stowig *et al.* 2012). The inflammasome originates as a response to an acute injury within the central nervous system. HDAC inhibitors, such as valproic acid, may inhibit the creation and activation of inflammasomes (Chen *et al.* 2014).

Through the HDAC inhibition and reduction of matrix metalloproteinase 9 level (MMP-9) and suppression of tight-junction proteins degradation, valproic acid also reduced the damage of the blood-brain barrier and the oedema zone in the model of rat brain ischaemia (Wang *et al.* 2011).

Apart from the anti-inflammatory activity, valproic acid also shows an analgesic activity, mainly through the reduction of TNF- α expression, but also through the effect on the increase of GABA-ergic neurotransmission and NMDA receptors. In the animal model, it causes the reduction of the oedema zone, suppresses the leucocyte migration and release of myeloperoxidase, by which it reduces the pain sensation of an inflammatory origin. Moreover, to a lower degree, it reduces the neurogenic pain (Ximenes *et al.* 2013).

Valproic acid also has a proangiogenic activity, probably through the excitation of the release of the vascular endothelial growth factor (VEGF) or MMP-9 (Wang *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012). VEGF and MMP-9 are key factors of a proangiogenic action upon emergence of ischaemia. VEGF increases proliferation of endothelium cells and mediates the effects of other proangiogenic factors. On the other hand, MMP-9 removes the extracellular matrix, facilitating development of new endothelial cells. Therefore, both VEGF and MMP-9 play a double function as a response to ischaemia. In the acute phase, they increase permeability of the blood-brain barrier, while in the later period they promote angio- and neurogenesis (Zhang *et al.* 2000). Valproic acid, when used chronically, increases the levels of both VEGF and MMP-9 in the ischaemia model caused by the occlusion of the middle cerebral artery in rats through the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and also affects the reduction of the ischaemia zone and functional deficit (Wang *et al.* 2012).

Another significant issue is the antioxidative activity of valproic acid through modulation of antioxidative enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) or phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (px-GSH) (Zhang *et al.* 2012). Free oxygen radicals may increase the activity of stimulating amino acids and affect gene expression, which leads to lipid peroxidation and DNA oxidation, and as a result to apoptosis (Suda *et al.* 2013). Valproic acid prevents lipid peroxidation, which is induced by glutamates and protein oxidation,

e.g. through the increase of expression of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and increase of activity of this enzyme. GSTM1 is responsible for catalysing the synthesis of antioxidative glutathione with oxygenated compounds and generating non-toxic products. As a result, valproic acid inhibits cell atrophy and DNA fragmentation (Shao *et al.* 2005; Wang *et al.* 2004). In case of an acute ischaemia, during which the levels of enzymes which decompose free radicals decrease, valproic acid can also act through superoxide dismutases (Jornada *et al.* 2011). It has been observed that valproic acid prevents the damage of a rat cerebral cortex cells by oxidative stress (Shao *et al.* 2005). In the model of temporary ischaemia in rats, valproic acid had an effect on a decrease of lipid peroxidation as well as free radicals production, which was connected with the decrease of neurone apoptosis (Suda *et al.* 2013).

The neuroprotective activity of valproic acid

Recent studies have concentrated on the application of valproic acid as a neuroprotective medicine in a range of injuries of the nervous system. The phrase “neuroprotection” is defined as a set of actions undertaken to protect neurones against undesirable incidences, which take place at the cellular level in the event of a shortage of oxygen or glucose – or both of these essential agents (Sreedhar *et al.* 2003). Neuroprotection is also described as a strategy, whose aim is to counteract, interrupt or slow down the sequence of damaging incidences at the cellular or biochemical level, which – without implementation of any procedures – lead to an irreversible injury (Ginsberg 2008).

The neuroprotective activity of valproic acid was confirmed in the course of the action of various damaging factors – cerebral ischaemia (Ren *et al.* 2004; Kim *et al.* 2007), excitotoxicity (Hashimoto *et al.* 2002; Kanai *et al.*

2004), cellular stress (Kim *et al.* 2007), administration of amphetamine or neurotoxicity induced by amyloid accumulation (Alvarez *et al.* 1999; Ximenes *et al.* 2012).

In the cell models, valproic acid revealed the antiapoptotic activity in the neurones of a rat cortex through the histone hyperacetylation mechanisms. To a lesser degree, it also showed a protective action towards the natural age-related cell death (Jeong *et al.* 2003). Furthermore, cell cultures revealed a reduction of neuron damage in the course of oxygen and glucose deprivation within hippocampus in the case of administering larger doses of valproic acid (Rekling 2003). Valproic acid also protected mature cells of cerebellum against glutamate-dependent excitotoxicity in the HDAC inhibition mechanism (Kanai *et al.* 2004). Furthermore, the protective effect of valproic acid against the stress within endoplasmic reticulum and neurone death caused by inflammation in the mechanism of LPS-induced microglia activation have been described (Kim *et al.* 2007). In a different study, the application of valproic acid reduced the dopamine-dependent, LPS-induced neurotoxicity, partially through the initiation of the microglia cell apoptosis (Chen *et al.* 2007). Furthermore, the neuroprotective activity of valproic acid was confirmed upon the action of oxidative stress through inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation (Wang *et al.* 2003). Valproic acid also protected the granular cells of rat cerebellum against the hypokalaemia-induced, PI3K/Akt-dependent apoptosis (Mora *et al.* 2002).

Cerebral stroke

In the animal models of cerebral stroke, valproic acid reduced the injury induced by temporary cerebral ischaemia through HDAC inhibition and activation of heat shock proteins (Ren *et al.* 2004). Ren *et al.* assessed the effect of valproic acid administered upon a temporary occlusion of the middle cerebral artery in rats on the volume of

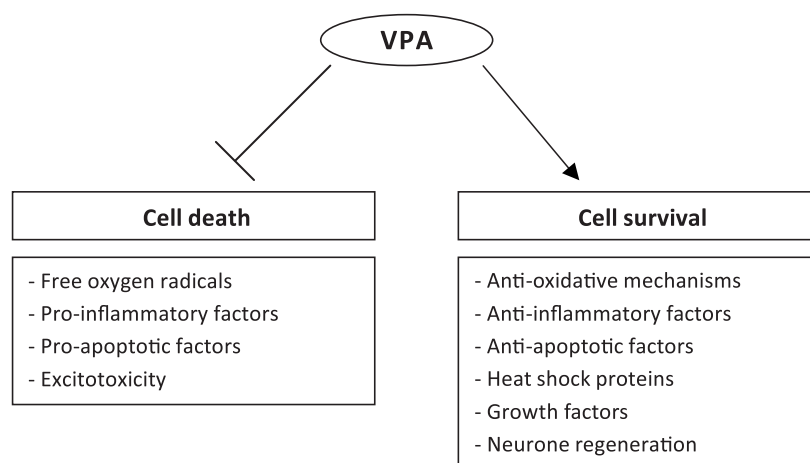


Figure 2 The effect of valproic acid on the balance of mechanisms promoting death and survival of neurones (⊥ represents inhibition; → represents excitation)

brain covered with ischaemia and the severity of neurological deficit. In animals, which underwent valproic acid treatment, both the presence of smaller ischaemic foci and lesser neurological deficit were observed. Medicine administration inhibited the kaspase-3 activation (in the form of 17 kDa and 19 kDa), which participates in damaging neurones after the occurrence of focal ischaemia. Valproic acid also increased the amount of acetylated histone H3 within cerebral cortex and striatum. Furthermore, an increase of HSP70 level was observed, which is connected with the resistance of neurones to damage. HSP70 has an antiapoptotic effect throughout various mechanisms, e.g. it inhibits the kaspase-3 activation, reduces the activity of the apoptosis-inducing factor, blocks the activity of JNK kinase, which is related to the cell death due to excitotoxicity, and also inhibits the activation of NF- κ B and pro-inflammatory gene expression. Additionally, HSP was described as a chaperone protein which binds with abnormally composed proteins and prevents their further aggregation and, in turn, cell death. It seems that HSP70 overexpression induced by valproic acid may play a key role in the neuroprotective activities, which were observed by these authors (Ren *et al.* 2004).

The subject of various mechanisms of the HDAC inhibitors actions in the model of middle cerebral artery occlusion in rats was also discussed by Kim *et al.* (2007). In their study with the middle cerebral artery occlusion, the effect of valproic acid on the reduction of the size of ischaemic focus and neurological deficit was confirmed. Furthermore, a decrease of activation and the number of microglia cells, monocyte cells/macrophages and also other inflammation markers were observed within the ischaemic brain tissue. Microglia activation and leucocyte inflow within the ischaemic nerve tissue lead to the release of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-2, TNF- α), nitrous oxide and free oxygen radicals. Their actions induce neurodegradation in the excitotoxicity mechanism. The authors also observed the HSP70 overexpression, the inhibition of middle cerebral artery occlusion-induced “down-regulation” of the phosphorylated form of Akt as well as the inhibition of “up-regulation” of protein p53, and also iNOS and cyclooxygenase 2 (COX-2). The HSP70 overexpression increases the expression of Bcl-2 and also reduces the activation of microglia and monocytes in the experimental model of a cerebral stroke. On the other hand, COX-2 catalyses the prostanoid synthesis and formation of free radicals which are responsible for the inflammatory process within the brain as well as excitotoxicity dependent on the ischaemia of cerebral cells (Kim *et al.* 2007). Furthermore, in the model of focal ischaemia, the suppression of DNA fragmentation in neurones, inhibition of neutrophil accumulation and microglia activation were described (Suda *et al.* 2014).

Another study revealed that administration of valproic acid upon the episode of a transient global cerebral

ischaemia in rats prevents neurones from death within the CA1 region of hippocampus and improves the spatial orientation of these animals. Valproic acid reduced the microglia cell activation, production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and also affected the HDAC inhibition and the increase of HSP70 levels, which was connected with its clinical results (Xuan *et al.* 2012).

In the model of temporary cerebral ischaemia, valproic acid may also affect the microRNA expression and by this additionally regulate protein expression; however, the mechanisms of such an action have not been specified yet (Hunsberger *et al.* 2012). In the case of a permanent middle cerebral artery occlusion in rats, administration of valproic acid upon the ischaemic episode increased neurogenesis and regulation of white matter and also affected the improvement of the neurological state. The study showed an increase of the glutamate transporter 1 (GLT-1), which was connected with the HDAC inhibition. The valproic acid-induced GLT-1 overexpression may be responsible for a drop in the oligodendroglia cell death rate through the removal of extracellular glutamate. It seems that HDAC inhibition is also linked with an increase of neuroblasts number within the ischaemic zone as well as induction of the oligodendroglia progenitor cell differentiation into mature oligodendrocytes, which may lead to increased axon regeneration in the ischaemic zone (Liu *et al.* 2012).

Valproic acid may have protective properties through histone hyperacetylation and an increase of expression of genes, which are involved in the neuronal plasticity and survival processes. Costa *et al.* (2006) observed the neuroprotective action of valproic acid in medium-size spiny cells of striatum through the effect on the electric field potential, however, in a dose which is higher than the safe dose for humans.

In retinal cells, upon an episode of a temporary ischaemia, valproic acid reduced the apoptosis of retinal ganglion cells and optic nerve axons (Zhang *et al.* 2012). The neuroprotective activity was connected with histone 3 hyperacetylation in the HSP70 promotor. Valproic acid increased HSP70 transcription and the HSP70 binding to the apoptotic protease activation factor 1 (APAF-1), inhibited apoptosome creation, translocation of cytochrome c from mitochondrion to cytosol and caspase-3 activation, and, consequently, reduced the retina damage in rats upon a temporary ischaemia (Zhang *et al.* 2012).

Valproic acid increased neurone survival rate upon a haemorrhagic shock and protected neurones from hypoxia-induced apoptosis in the mechanism of β -catenin hyperacetylation, and, as a result, an increase of Bcl-2 expression (Li *et al.* 2008).

Brain injury

In the mechanical brain injuries, valproic acid also revealed neuroprotective properties (Dash *et al.* 2010). The author also observed that rats, which received valproic

acid, were characterised by better cognitive skills upon the brain trauma as compared with the control group. Administration of the medicine had an effect on the increase of the amount of the microtubule-associated protein 2 (MAP2), which is significant for the integrity of hippocampus neuronal membranes as well as the reduction of the blood-brain barrier damage. These effects may be linked with the inhibition of HDAC and GSK-3 β (Dash *et al.* 2010). Furthermore, the neuroprotective properties of valproic acid were described in a traumatic cerebral injury through the ERK and Akt signalling pathways (Zhang *et al.* 2014). Administration of the medicine upon the injury reduced the cerebral oedema, the contusion zone and apoptosis intensification. The inducing effect of valproic acid on a slow activation of the Akt cell survival factor was also demonstrated (D Sarno *et al.* 2002).

Intracerebral haemorrhage

In the model of intracerebral haemorrhage, valproic acid induced the acetylation of histone H3 as well as pERK, pAkt, pCREB and HSP70. Furthermore, it affected the regulation of peptides engaged in apoptosis processes by causing an increase of proteins Bcl-2 and Bcl-XL as well as decrease of the amount of Bax, Fas-L (which is a Fas ligand, while Fas is a protein of the TNF family), and also the pro-inflammatory factors: MMP-9, the macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1), the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), the tissue plasminogen activator (tPA) and interleukin 6. Application of valproic acid in rats upon the episode of intracerebral haemorrhage was connected with the reduction of haemorrhage extent, brain atrophy as well as a faster improvement within neurological deficits. Valproic acid revealed a pleiotropic activity by affecting the inhibition of inflammatory reactions and apoptosis, including modification of cell survival signalling pathways (Sinn *et al.* 2007).

Spinal cord injury

In rats with a spinal cord injury, valproic acid reduced the injury-induced histone deacetylation, increased expression of HSP70 and Bcl-2, inhibited caspase-3 activation and apoptosis and, as a result, reduced the functional deficit (Lv *et al.* 2011). Another study revealed that valproic acid increased the BDNF and GDNF levels and decreased inflammatory reactions in the area of spinal cord injury, which was connected with an improvement within rats' motor functions (Abdanipour *et al.* 2012). On the other hand, different scientists report that valproic acid also has an effect on the reduction of the blood-spinal cord barrier damage caused by the spinal cord injury by "up-regulation" of neuroprotective proteins Akt, HSP27, HSP70 and "down-regulation" of protein p53 and also inhibition of secretion of inflammation mediators TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS and COX-2, reduction of the

amount and activity of MMP-9 and, to a lesser degree, MMP-2 and reduction of tight-junction proteins degradation (Lee *et al.* 2012).

The neuroprotective efficacy of valproic acid in the model of spinal muscular atrophy in mice was also demonstrated. Administration of the drug resulted in a better motor functioning, lower degeneration of spinal motor neurones, lesser muscle atrophy and better functioning of the nerve-muscle junction (Tsai *et al.* 2008).

Neurodegenerative processes

Also, various studies have revealed that chronic administration of valproic acid improves the long-term memory. These properties of the medicine are explained by its effect on the epigenetic regulation mechanisms. Modifications within histones cause dynamic changes in the chromatin structure and help to regulate the learning-induced gene expression. Changes in the chromatin structure induced by HDAC inhibitors and histone acetyltransferases may increase plasticity within synapsis. Upon an occurrence of a traumatic cerebral injury, administration of valproic acid led to the improvement of cognitive functions (Dash *et al.* 2010). In the mice model of Alzheimer disease, chronic treatment with valproic acid improved memory and reduced behavioural deficits, and additionally reduced the formation of amyloid concretions (Qing *et al.* 2008).

On the other hand, Hsieh *et al.* demonstrated the valproic acid-induced stimulation of the differentiation process of hippocampus progenitor nerve cells. Administration of valproic acid excited their differentiation towards nerve cells, while it inhibited the process of differentiation into the astro- and oligodendroglia cells through the transcription factors (Hsieh *et al.* 2004).

Another interesting property of valproic acid is the increase of migration and adhesion possibilities of mesenchymal stem cells. A potentially beneficial effect of the cerebral stroke treatment with mesenchymal stem cells may result from the effect on immunomodulation, angiogenesis, neurogenesis, neurotrophism and neuroprotection. Tsai *et al.* demonstrated a functional improvement, a reduction of the ischaemic zone and increase of angiogenesis in the occlusion model of the rat middle cerebral artery. In this study, administration of valproic acid increased migration of mesenchymal stem cells through the HDAC inhibition, which resulted in the increase of the chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) expression. However, it should be stressed out that only a small number of stem cells underwent differentiation into the nerve and glia cells (Tsai *et al.* 2011).

It seems that valproic acid is a medicine of a high therapeutic potential in various acute and chronic neurological diseases, which are linked together by the presence of oxidative stress, inflammatory mechanisms and activation of apoptotic processes (Nalivaeva *et al.* 2009).

Other properties of valproic acid

Valproic acid has an effect on proliferation and differentiation of various types of cells (e.g. endothelium cells, hematopoietic cells and nerve stem cells), including the malignant cells. So far, the suppressing effect of valproic acid was demonstrated on the growth of some types of malignant cells and their predisposition to metastasise and its promoting effect on differentiation of these cells (Blaheta and Cinatl 2002). The latter property was connected with apoptosis induction, both in the caspase-dependent and independent course and inhibition of angiogenesis within malignant cells (Monti *et al.* 2009). Valproic acid revealed the pro-apoptotic activity in malignant cells, which did not respond to other therapies before (Tang *et al.* 2004). It was also demonstrated that valproic acid intensifies the effect of the applied anti-tumour treatment (retinoic acid, interferon alpha, radiotherapy). A recent study has also proved that valproic acid has a cytotoxic activity against the ovary malignant cells (Kwiecińska 2013).

Different mechanisms may be responsible for the anti-tumour properties of valproic acid, such as the increase of the ERK-AP-1-regulated gene expression, reduction of protein kinase C activity (PKC), inhibition

of GSK-3 β , which regulates the Wnt signalling pathway, excitation of the peroxisome proliferator-activated receptors γ and δ (PPAR γ and δ) or HDAC inhibition.

Due to the pleiotropic effect, valproic acid regulates the processes of angiogenesis, migration, differentiation and growth of malignant cells. It has been observed so far that valproic acid may prevent from proliferation and induce cell differentiation, e.g. of embryonic neuroblastoma, acute myeloid leukaemia, erythroleukaemia, breast, skin, prostate, urinary bladder, lung, large intestine and uterine cervix cancers (Blaheta and Cinatl 2002; Ximenes *et al.* 2012).

In the pre-clinical phase, the effect of valproic acid was studied on various cells of embryonic neuroblastoma, glioma, germinal neoplasms as well as the malignant cell lines of prostate and breast. Growth inhibition, induction of differentiation, decrease of cell adhesion, angiogenesis and migration of malignant cells were observed. The chronically administered valproic acid induced terminal phases of differentiation of some malignant cells and in the irreversible way reduced their mitotic potential. Its effect on the decrease of proliferation was observed in the cell lines of large intestine, breast and prostate cancers (Blaheta and Cinatl 2002).

Table 1 The effect of valproic acid on molecular and transmission mechanisms in neurones

A system or molecular system	Elements of systems or molecular systems	Effect of valproic acid	Literature
GABA-ergic	GAD,	(+)	Biggs <i>et al.</i> 1992; Cunningham <i>et al.</i> 2003; Eckstein-Ludwig <i>et al.</i> 1999; Löscher 1999
	GABA-T,	(-)	
	SSADH,	(-)	
	α -KGDH	(-)	
glutamatergic	NMDA,	(-)	Cunningham <i>et al.</i> 2003; Hashimoto <i>et al.</i> 2002; Ren <i>et al.</i> 2004
	AMPA	(-)	
monoamine levels	NA,	(-)(+)	Meshki-Baf <i>et al.</i> 1994
	DA,	(+)	
	5-HT	(-)(+)	
ion channels	Na ⁺ ,	(-)	Löscher 1999; Remy <i>et al.</i> 2003; Todorovic and Lingle 1998; Van Erp <i>et al.</i> 1990
	Ca ²⁺ ,	(-)	
	K ⁺	(-)	
histone deacetylases	HDAC 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9	(-)	Göttlicher <i>et al.</i> 2001
PI3K/Akt signalling pathway	GSK-3 β ,	(-)	De Sarno <i>et al.</i> 2002; Marinova <i>et al.</i> 2009; Mora <i>et al.</i> 2002; Sinn <i>et al.</i> 2007; Zhang <i>et al.</i> 2014
	AP-1	(+)	
ERK signalling pathway	RAS-RAF-ERK,	(+)	Chen <i>et al.</i> 1999; Fukumoto <i>et al.</i> 2001; Sinn <i>et al.</i> 2007; Zhang <i>et al.</i> 2014
	RS6K,	(+)	
	CREB,	(+)	
	GAP43	(+)	
Wnt/β-catenine pathway	Wnt1,	(+)	Li <i>et al.</i> 2008; Wang <i>et al.</i> 2010; Wang <i>et al.</i> 2015
	Wnt2	(+)	
kynurenine pathway	TRP,	(+)	Maciejak <i>et al.</i> 2013
	KYN,	(+)	
	KYNA	(+)	

A system or molecular system	Elements of systems or molecular systems	Effect of valproic acid	Literature
OXPHOS pathway	DLDH	(-)	Kostrouchova <i>et al.</i> 2007; Luis <i>et al.</i> 2007
heat shock protein	HSP70, HSP27	(+) (+)	Ren <i>et al.</i> 2004; Kim <i>et al.</i> 2007; Lee <i>et al.</i> 2012; Lv <i>et al.</i> 2011; Xuan <i>et al.</i> 2012; Zhang <i>et al.</i> 2012
micro RNA		(+)	Hunsberger <i>et al.</i> 2012
anti-oxidative enzymes	SOD, CAT, px-GSH, GSTM1	(+) (+) (+) (+)	Marinova <i>et al.</i> 2009; Ryu <i>et al.</i> 2003; Shao <i>et al.</i> 2005; Suda <i>et al.</i> 2013; Wang <i>et al.</i> 2004; Zhang <i>et al.</i> 2012
RE stress proteins	GRP 78, GRP 94, calreticulin	(+) (+) (+)	Bown <i>et al.</i> 2000
inflammasome	IL-1 β , IL-18, caspase 1	(-) (-) (-)	Chen <i>et al.</i> 2014
microglia cells		(-)	Chen <i>et al.</i> 2007; Gibbons <i>et al.</i> 2011; Kim <i>et al.</i> 2007; Suda <i>et al.</i> 2014 Xuan <i>et al.</i> 2012
mediators inflammations	NF- κ B, IL-1 β , IL-6, MPO, iNOS, TNF- α , MIP-1, MCP-1, COX-2	(-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-)	Ichiyama <i>et al.</i> 2000; Kim <i>et al.</i> 2007; Lee <i>et al.</i> 2012; Peng <i>et al.</i> 2005; Sinn <i>et al.</i> 2007; Xuan <i>et al.</i> 2012
anti-apoptotic proteins	Bcl-2, Bcl-XL	(+) (+)	Chen <i>et al.</i> 1999; Kim <i>et al.</i> 2007; Li <i>et al.</i> 2008; Lv <i>et al.</i> 2011; Sinn <i>et al.</i> 2007
pro-apoptotic proteins	p53, Bax, Fas-L	(-) (-) (-)	Kim <i>et al.</i> 2007; Lee <i>et al.</i> 2012; Leng and Chuang 2006; Sinn <i>et al.</i> 2007
neurotrophic factors	BDNF, GDNF	(+) (+)(=)	Abdanipour <i>et al.</i> 2012; Fukumoto <i>et al.</i> 2001; Wu <i>et al.</i> 2008
cytoskeleton proteins		(+)	Hall <i>et al.</i> 2002; Jeong <i>et al.</i> 2003
blood-brain barrier	MMP-9, MAP2	(-) (+)	Lee <i>et al.</i> 2012; Wang <i>et al.</i> 2011; Dash <i>et al.</i> 2010
angiogenesis	HIF-1, VEGF, MMP-9, MMP-2	(+) (+) (+) (+)	Wang <i>et al.</i> 2011; Wang <i>et al.</i> 2012
neurogenesis	GLT1	(+)	Liu <i>et al.</i> 2012
migration of stem cells	CXCR4	(+)	Tsai <i>et al.</i> 2011

In the table, (+) represents excitation, (-) represents inhibition, while (=) represents no effect.

Clinical studies

A potential application of HDAC inhibitors, such as valproic acid, in the treatment of acute and chronic neurological diseases covers the treatment of cerebral stroke, diseases connected with prolongation of nucleotide triplets of glutamate (dentatorubral-pallidoluysian atrophy, Huntington's disease, Kennedy's syndrome, spinocerebellar ataxias), amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimer disease (Langley *et al.* 2005). Olesen *et al.* (2011) showed a reduced risk of ischaemic cerebral stroke and cardiac infarction in patients treated with valproic acid. Dregan *et al.* (2014) did not confirm a reduced risk of ischaemic cerebral stroke; however, they demonstrated a decreased risk of cardiac infarction in patients treated with valproic acid, which seems to be linked with its effect on HDAC inhibition. According to recent reports, the occurrence of a change within chromosome 7, probably in the place of a gene for HDAC 9, is connected with an increase of the thickness of intima-media complexes, the frequency of asymptomatic atheromatous plaques, and also the risk of a cerebral stroke on the basis of large vessels atherosclerosis (Markus *et al.* 2013; Traylor *et al.* 2012). HDAC 9 inhibition by valproic acid was therefore supposed to influence the reduction of occurrence of these factors and a reduction of the risk of their consequences – ischaemic cerebral stroke and cardiac infarction. However, the study of Dregan *et al.* did not confirm a reduction in the risk of ischaemic cerebral stroke in patients treated with valproic acid, which may result from a different cause of cerebral stroke in the studied patients than large vessels atherosclerosis. Furthermore, in both studies the control group included patients treated with other antiepileptics (carbamazepine, oxcarbazepine, lamotrigine, clonazepam, clobazam, phenytoin, phenobarbital or carbamazepine, phenobarbital and phenytoin), additionally other population groups were studied and these factors may be the reason of discrepancies.

There are on-going successful trials with valproic acid used to reduce the methamphetamine addiction. Also, the application of this drug has been considered in the combined anti-viral therapy against the human immunodeficiency virus (HIV), Duchenne muscular dystrophy and also in the bone marrow diseases (Chateauvieux *et al.* 2010).

Another studied aspect was the possibility of modulation of the process of mononuclear bone marrow cells

transplantation in the treatment of cerebral stroke by valproic acid. In the model of a transient middle cerebral artery occlusion in rats, the combined therapy had an effect on the increase of the anti-inflammatory activity and reduction of vessel damage, and it also increased the survival of transplanted cells and prolonged the possible period of the application of the therapy from the moment of the incident (Suda *et al.* 2014).

Conclusions

Valproic acid is a very effective antiepileptic and mood-stabilising medicine and despite a wide spectrum of its side-effects the safety profile is assumed to be positive. Its negative effect on cognitive functions is stressed, especially in children and elderly patients, as well as the teratogenic activity which is explained, e.g. in the HDAC inhibition. On the other hand, a multi-year period of observations (since the 1960s) makes all the side-effects well known, which in turn helps to control them in a sufficient way. The discovery of HDAC inhibition by valproic acid creates new perspectives, both for its application in oncology and probably in diseases based on an inflammatory process, such as in the rheumatoid arthritis, asthma, intestine inflammatory diseases and in the circulatory system diseases. Despite the fact that the studies conducted so far with the application of valproic acid in the prevention of cerebral stroke are not promising, it is possible that it will find its application as a neuroprotective medicine, which modulates the course upon an injury and in an acute phase of cerebral stroke. It should be stressed that there are still new optimistic reports on the neuroprotective properties of valproic acid in *in vitro* studies and in the animal models. The experimental studies demonstrate a multidirectional mechanism of valproic acid activity; however, it is possible that certain parts of this complicated system remain unknown. This leaves a lot of space for discovering and potential practical application of new properties of this – as it appears – only partially known medicine. Yet, it is too early to discuss the possibility of using valproic acid as a neuroprotective drug because the results of current clinical trials on humans are not very optimistic. There is a need of further research, which would assess its potential neuroprotective effect. Perhaps new findings will help introduce valproic acid as a common drug in completely new therapeutic indications. ■

Wprowadzenie

Kwas walproinowy jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwpadaczkowych. Początki jego używania datowane są na lata 60. XX wieku, a został zsyntetyzowany jeszcze pod koniec XIX wieku jako analog kwasu walerianowego. Obecnie kwas walproinowy stosowany jest jako lek przeciwpadaczkowy w leczeniu wszystkich rodzajów napadów padaczkowych oraz w niektórych sytuacjach nagłych w celu przerwania stanu padaczkowego (Betjemann i Lowenstein 2015). Wyniki licznych badań sugerują, że kwas walproinowy ma prawdopodobnie najszersze spektrum aktywności przeciwpadaczkowej wśród obecnie używanych leków i jest jednym z najczęściej przepisywanych leków przeciwpadaczkowych (Ghodke-Puranik i wsp. 2013; Ge i wsp. 2015). Poza padaczką, według Charakterystyk Produktów Leczniczych, kwas walproinowy znajduje zastosowanie jako stabilizator nastroju u pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową oraz w leczeniu epizodów manii u chorych, u których nie można zastosować litu. Poza tym kwas walproinowy jest skuteczny w zmniejszaniu częstości występowania zachowań agresywnych oraz pobudzenia u chorych z otępieniem (Sandborn i wsp. 1995), w leczeniu bólu neuropatycznego (jako lek III rzutu – Wordliczek i wsp. 2011) oraz przewlekłej i ostrej migrenie, a także w profilaktyce bólów migrenowych (Evans 2013; Rahimdel i wsp. 2014; Linde i wsp. 2013).

Za podstawowe mechanizmy działania przeciwpadaczkowego kwasu walproinowego uważa się jego wpływ na układy neurotransmiterów, ale postulowane są również zupełnie inne, nowe możliwości. Dotychczas dobrze poznane mechanizmy obejmują:

- wzrost aktywności układu kwasu gamma-aminomasłowego (GABA),
- zmniejszanie aktywności glutaminergicznej poprzez regulację receptorów NMDA,
- wpływ na układy monoamin,
- blokowanie napięciowo-zależnych kanałów sodowych,
- zmniejszenie aktywności kanałów wapniowych typu T oraz kanałów potasowych bramkowanych napięciem.

Ostatnio zwraca się uwagę na fakt, że kwas walproinowy może mieć działanie ochronne w stosunku do komórek nerwowych. Jego potencjalne działanie neuroprotektoryjne może bezpośrednio wynikać z działania przeciwdrgawkowego, ale wydaje się, że przede wszystkim wynika z mechanizmów, jakimi są: modulacja ekspresji genów – działanie poprzez hamowanie deacetylaz histonowych, modyfikacja procesów zapalnych, a także wpływ na szlaki sygnałowe komórek, m.in. szlak kinureninowy (Johanessen i Johanessen 2003; Löscher 1999; Ximenes i wsp. 2012; Maciejak i wsp. 2013).

Wpływ na układy neuroprzebieżników

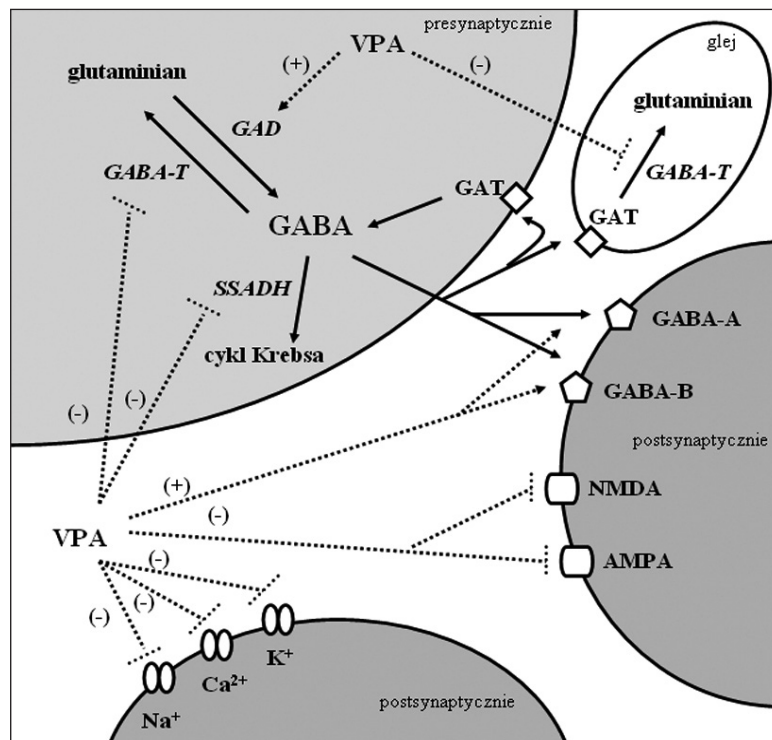
Kwas walproinowy jest skutecznie stosowany jako lek stabilizujący nastrój przez regulację układu GABA-ergicznego. Wpływ kwasu walproinowego na układ GABA-ergiczny jest wielokierunkowy, a jego ostatecznym efektem jest wzrost ilości tego neuroprzebieżnika. Liczne badania wskazują, że kwas walproinowy szybko i w stopniu istotnym zwiększa poziom GABA w mózgu (m.in. Löscher 1999). Kwas walproinowy zwiększa aktywność dekarboksylazy kwasu glutaminowego (*glutamic acid decarboxylase*, GAD), niezbędnej do syntezy kwasu γ -aminomasłowego, wskazuje się także na jego możliwy wpływ na ekspresję genu dla GAD poprzez hiperacetylację histonów (działanie epigenetyczne kwasu walproinowego zostanie omówione poniżej). Ponadto hamuje aktywność enzymów odpowiedzialnych za degradację kwasu γ -aminomasłowego: transaminazę GABA (*GABA transaminase*, GABA-T), dehydrogenazę semialdehydową kwasu bursztynowego (*succinic semialdehyde dehydrogenase*, SSADH) oraz hamuje i inaktywuje dehydrogenazę kwasu α -ketoglutowego (*α -ketoglutarate dehydrogenase*, α -KGDH). Poza wpływem na syntezę i degradację GABA, kwas walproinowy zmniejsza obrót oraz wychwyty zwrotny kwasu γ -aminomasłowego. Zwiększenie poziomu GABA przez kwas walproinowy powoduje zwiększenie postsynaptycznego hamowania zależnego od GABA w komórkach nerwowych ssaków (Monti i wsp. 2009). Kwas walproinowy zwiększa także poziom GABA w surowicy krwi u ludzi (Löscher 1999). Ponadto opisywano wpływ kwasu walproinowego na zwiększenie wiązania GABA do receptorów: GABA-A, gdzie oddziałuje prawdopodobnie w miejscu wiązania dla benzodiazepin (jego wpływ jest hamowany w obecności zolpidemu), oraz GABA-B, gdzie zwiększa wiązanie baklofenu w obrębie hipokampa (Cunningham i wsp. 2003; Monti i wsp. 2009). Kwas walproinowy blokuje także transporter GABA – GAT1, izoformę najczęściej występującą w zakończeniach nerwowych (Eckstein-Ludwig i wsp., 1999). Istnieją również doniesienia o zależnym od stężenia wpływie kwasu walproinowego na uwalnianie GABA. Biggs i wsp. zaobserwowali hamowanie uwalniania tego neuroprzebieżnika w obecności niskich stężeń kwasu walproinowego, a wzrost uwalniania przy wyższych stężeniach leku (Biggs i wsp. 1992).

Kwas walproinowy hamuje depolaryzację wynikającą z aktywacji receptorów N-metylo-D-asparagianinu (*N-methyl-D-aspartate*, NMDA) i zmniejsza przebieżnictwo glutaminergiczne (Johanessen i Johanessen 2003). Jest to jeden z mechanizmów zmniejszających pobudliwość neuronów i zwiększających próg padaczkowy. Zmniejszenie przebieżnictwa glutaminergicznego może wywierać ochronny wpływ na komórki nerwowe zarówno w przewlekłych procesach neurodegeneracyjnych, jak i ostrych uszkodzeniach mózgu (Calabresi i wsp. 2000; Barone i Feuerstein 1999). W warunkach fizjologicznych

glutaminian wydzielany do przestrzeni synaptycznych jest usuwany głównie przez astrocyty. Ekscytotoksyczność zależna od glutaminianu powstaje w sytuacji obecności nadmiernych jego ilości w przestrzeni pozakomórkowej, np. w obszarach objętych niedokrwieniem bądź urazem, gdzie dochodzi do niekontrolowanego uwalniania glutaminianu z uszkodzonych komórek (Leker i Shohami 2002) i nadmiernej aktywacji receptorów AMPA (aktywowanych przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) oraz NMDA. Kanał jonowy powiązany z receptorem NMDA przewodzi jony Na^+ i Ca^{2+} . Receptory AMPA kontrolują początkową depolaryzację błony komórkowej, spowodowaną przez glutaminian oraz wpływają na otwieranie się receptorów NMDA. Nadmierna lub przedłużona aktywacja receptorów zależnych od glutaminianu powoduje zwiększoną mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu stresu oksydacyjnego i aktywacji białek litycznych, których działanie prowadzi do śmierci komórki. Jako główne mechanizmy odpowiedzialne za uszkadzające działanie glutaminianu wskazuje się wewnątrzkomórkowe gromadzenie się wapnia oraz obniżenie elektrochemicznego gradientu mitochondriów (El Idrissi i Trenkner 1999; Calabresi i wsp. 2000). Blokowanie receptorów dla glutaminianu działa protekcyjnie w wielu modelach eksperymentalnych uszkodzenia mózgu. Kwas walproinowy, poza blokowaniem receptora NMDA, zmniejsza również uwalnianie glutaminianu, co może być zależne

od blokowania kanałów sodowych zależnych od napięcia w obrębie neuronów kory mózgu i innych struktur podkorowych (Cunningham i wsp. 2003). Kwas walproinowy może także regulować poziom glutaminianu poprzez zwiększenie wychwytu zwrotnego tego neuroprzekaźnika. W komórkach nerwowych kory mózgu szczura długotrwałe stosowanie kwasu walproinowego hamuje ekscytotoksyczność zależną od glutaminianu oraz zwiększa długość życia tych komórek (Hashimoto i wsp. 2002; Ren i wsp. 2004). Blokowanie receptorów dla glutaminianu zmniejsza spowodowaną przez niedokrwienie śmierć neuronów w obrębie prążkowiec (Le Peillet i wsp. 1992). Również w modelu toksyczności indukowanej przez malonian – spowodowanej nadmiernym gromadzeniem glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej – stwierdzano działanie neuroprotektoryjne kwasu walproinowego (Morland i wsp. 2004). W badaniach *post mortem* u chorych z zaburzeniami nastroju zaniki mózgu i utrata neuronów glutaminergicznych były dużo mniejsze u chorych leczonych kwasem walproinowym (bądź litem) niż u chorych nieleczonych (Hashimoto i wsp. 2002).

Przewlekłe podawanie kwasu walproinowego wpływa także na zmiany poziomu monoamin. W badaniu Meshki-Baf i wsp. (1994) obserwowali wzrost poziomu noradrenaliny w obrębie hipokampa i pnia mózgu, przy jego spadku w obrębie podwzgórza, wzrost poziomu dopaminy w korze ruchowej, podwzgórzu i hipokampie oraz zwiększenie poziomu serotoniny w obrębie prążkowiec i pnia mózgu przy spadku jej poziomu w mózdzku i podwzgórzu.



Rycina 1 Wpływ kwasu walproinowego na neuroprzekaźnictwo (działanie kwasu walproinowego zaznaczono linią przerywaną; | oznacza hamowanie; → oznacza pobudzenie)

Hamowanie kanałów sodowych przez kwas walproinowy wpływa na zmniejszenie ilości wyładowań neuronów, co z kolei może wpływać na zmniejszenie uwalniania glutaminianu oraz zwiększenie przeżywalności komórek nerwowych (Pullan 1995). Obserwowano także wpływ kwasu walproinowego na kanały wapniowe (Todorovic i Lingle 1998) oraz potasowe (Van Erp i wsp. 1990). Kwas walproinowy wpływał także na zmniejszenie spontanicznych wyładowań neuronów (Gobbi i Janiri 2006).

Regulacja ekspresji genów

Jednym z relatywnie niedawno odkrytych mechanizmów działania kwasu walproinowego jest działanie poprzez mechanizmy epigenetyczne i regulację ekspresji genów. Uaktywniane przez zmiany środowiskowe mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, wyciszenie genów powiązane z RNA czy modyfikacja konformacji histonów, wpływają na dziedziczną zmianę w ekspresji genów, bez wywoływania zmian w sekwencji DNA (Egger i wsp. 2004). Przebudowa chromatyny powodowana jest przez deacetylazy histonów (*histone deacetylases*, HDAC). Enzymy te są zaangażowane w modyfikację wielu składników komórkowych – przede wszystkim histonów, ale również czynników transkrypcyjnych oraz białek naprawczych dla DNA, białek opiekuńczych czy też biorących udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych (Chen i wsp. 2014). Pod wpływem hiperacetylacji N-końcowych fragmentów histonów zaburzeniu ulegają interakcje pomiędzy histonami, a także między histonami a DNA. W stanie hipoacetylacji nukleosomy są ściśle upakowane, stąd nie może dojść do transkrypcji. Proces acetylacji histonów prowadzi do odsłaniania nukleosomów i umożliwia rozpoczęcie transkrypcji (Lagace i wsp. 2004). Poziom acetylacji zależy od równowagi pomiędzy aktywnością HDAC a acetylotransferazy histonów (Phiel i wsp. 2001). Jak wykazał Phiel i wsp. w 2001 r., kwas walproinowy hamuje HDAC, przez co wpływa na aktywację procesów transkrypcyjnych i modyfikację podstawowych aktywności komórki – pobudza wzrost, różnicowanie, modyfikację epigenetyczną DNA, hamuje apoptozę, wpływa na interakcje pomiędzy komórkami oraz ich migrację (Monti i wsp. 2009).

HDAC dzielą się na trzy klasy: klasa I składa się z HDAC 1, 2, 3 i 8, klasa II to HDAC 4, 5, 6, 7, 9 oraz 10, do klasy III należą HDAC występujące u drożdży (klasy I i II to klasy występujące u ludzi). Kwas walproinowy obniża ekspresję białek klasy I i II, HDAC (1, 2, 3, 8) oraz HDAC (4, 5, 7, 9) (Göttlicher i wsp. 2001). Poprzez wpływ na HDAC, kwas walproinowy zaangażowany jest w procesy regulacyjne komórek przez kinazy syntezy glikogenu 3 α i 3 β (*glycogen synthase kinase-3 α* , GSK-3 α ; *glycogen synthase kinase-3 β* , GSK-3 β), szlak sygnałowy Akt, szlak sygnałowy kinazy regulowanej czynnikami zewnętrznymi (*extracellular signal-regulated kinase*,

ERK), cykl kwasu trójkarboksylowego, układ GABA oraz szlak fosforylacji oksydacyjnej (*oxidative phosphorylation*, OXPHOS).

Ścieżka sygnałowa kinazy-3 fosfatidyloinozytolu (*phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) /Akt została uznana za główny mechanizm wspierający przeżycie i proliferację komórek. Wykazano, że kwas walproinowy wpływa na inaktywację GSK-3 β (De Sarno i wsp. 2002), powodując stopniowy wzrost jej fosforylacji, zarówno poprzez działanie na Akt, jak i działając bezpośrednio. Akt jest białkową kinazą serynowo-treoninową, pośredniczącą w procesach przeżycia komórek, która w formie fosforylowanej obserwowana była w ludzkich komórkach rakowych (Ximenes i wsp. 2012). Wydaje się, że fosforylacja Akt, zwana też kinazą białkową B, związana jest z inhibicją HDAC przez kwas walproinowy.

Inaktywacja GSK-3 β prowadzi do działania cytoprotekcyjnego, a jednocześnie aktywuje czynnik szoku termicznego, czyli czynnik transkrypcyjny dla białka szoku termicznego 70 (*heat shock protein 70*, HSP 70). HSP70 jest białkiem opiekuńczym, ułatwiającym innym białkom osiągnięcie właściwej struktury i degradację nieprawidłowo ułożonych przestrzennie białek. HSP70 działa ponadto neuroprotekcyjnie i przeciwzapalnie. Poziom mRNA białka HSP70 i jego aktywność są zwiększane przez inhibitory HDAC klasy I, takie jak kwas walproinowy, poprzez szlak sygnałowy PI3K/Akt oraz białko aktywujące 1 (*activator protein 1*, AP-1) (Marinova i wsp. 2009). AP-1 jest jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych, powiązanych z rozwojem mózgu, jego plastycznością oraz degeneracją (Ximenes i wsp. 2012). HSP70 wpływa hamująco na aktywację mikrogleju, jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF- κ B), interleukiny 6, mieloperoksydazy (*myeloperoxidase*, MPO) oraz indukwalnej syntazy tlenu azotu (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS), wywierając działanie przeciwzapalne. Nadekspresja HSP70 może być także powiązana z hamowaniem aktywacji kaspazy-3, zależnej od cytochromu c, jak również wpływać na stopniowe zmniejszanie odpowiedzi zapalnej (Sinn i wsp. 2007). Wydaje się, że indukcja HSP70 oraz innych inhibitorów deacetylaz histonów przez kwas walproinowy powiązana jest z hamowaniem GSK-3.

Stwierdzano, że niebezpośrednie hamowanie GSK-3 powoduje indukcję przebudowy aksonów oraz wpływa na skupianie się białek regulujących uwalnianie neurotransmiterów (tzw. synapsyn) w synapsach (Hall i wsp. 2002). GSK-3 β pełni istotną funkcję w ośrodkowym układzie nerwowym, regulując różne białka cytoszkieletu. Poprzez inhibicję GSK-3 kwas walproinowy może blokować syntezę czynników proapoptotycznych, co promuje przeżycie komórki (Ximenes i wsp. 2012). Obserwowano także nieznaczny wzrost ilości i długości wypustek nerwowych, prawdopodobnie powiązany z hamowaniem GSK-3 (Jeong i wsp. 2003).

Inhibicja HDAC zwiększa także acetylację Sp1, cytoprotekcyjnego czynnika transkrypcyjnego. Sp1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych regulujących apoptozę, a jego poziom jest zwiększany w odpowiedzi na stres oksydacyjny – niedobór glutationu bądź obecność nadtlenków w komórkach nerwowych. Hiperacetylacja Sp1 powoduje indukcję enzymów działających przeciwutleniająco, a w efekcie ochronę komórek kory mózgu (Ryu i wsp. 2003). Ponadto leki hamujące HDAC zwiększają ekspresję genów zależnych od Sp1, w tym ekspresję HSP70 (Ren i wsp. 2004; Marinova i wsp. 2009). Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że zmiany adaptacyjne w ekspresji genów odgrywają istotną rolę w działaniu stabilizującym nastrój kwasu walproinowego w chorobie afektywnej dwubiegunowej (Bown i wsp. 2000). Obserwowane działanie leku w chorobie afektywnej dwubiegunowej niebezpośrednio po jego podaniu także sugeruje występowanie odpowiedzialnych za to zmian na poziomie genomu (Chen i wsp. 1999).

Inne kinazy białkowe związane z przeżyciem komórek nerwowych to kinazy aktywowane przez mitogen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK). Ich nieprawidłowe funkcjonowanie stwierdzano u chorych na nowotwory, cukrzycę, a także w przebiegu chorób zapalnych. Istotnymi, a zarazem najlepiej poznanymi przedstawicielami kinaz MAPK, są kinazy ERK. Kwas walproinowy aktywuje kinazy ERK, biorąc udział w regulacji czynników transkrypcyjnych i ekspresji genów, m.in. poprzez kaskadę RAS-RAF-ERK, regulującą wiele procesów fizjologicznych, np. wpływającą na różnicowanie komórek (Ximenes i wsp. 2012). Wydaje się, że kwas walproinowy wpływa nie tylko na ścieżkę sygnałową ERK, ale także na poziom Ca^{2+} (Lagace i wsp. 2004). Poprzez aktywację ścieżki sygnałowej ERK aktywowana zostaje również rybosomalna kinaza białkowa S6 (*ribosomal S6 kinase*, RS6K), która z kolei fosforyluje białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (*cAMP response element-binding protein*, CREB). Fosforylowane białko CREB zwiększa ekspresję neuroprotektynowego białka-2 specyficznego dla chłoniaka z komórek B (*B cell lymphoma protein-2*, *Bcl-2*) (Sinn i wsp. 2007), wpływając na przeżycie, wzrost i ochronę komórek nerwowych (Fukumoto i wsp. 2001).

Stała ekspresja białka Bcl-2 zwiększa przeżycie komórek po ekspozycji na różne czynniki uszkodzające. Wykazano również, że Bcl-2 promuje regenerację w komórkach nerwowych. Przewlekłe leczenie kwasem walproinowym podwaja ilość białka Bcl-2 w korze płatów czołowych u badanych szczurów (Chen i wsp. 1999). Innym białkiem, którego ekspresja jest powiązana ze ścieżką sygnałową ERK, jest powiązane ze wzrostem białko 43 (*growth associated protein 43*, GAP 43). Opisywano także wpływ kwasu walproinowego na ekspresję białek stresowych siateczki endoplazmatycznej: regulowanych przez glukozę białka 78 (*glucose-regulated protein 78*,

GRP 78), białka 94 (*glucose-regulated protein 94*, GRP 94) oraz kalretikuliny – pełniących funkcję białek opiekuńczych, zdolnych do wiązania jonów Ca^{2+} i zapobiegających spadkowi poziomu wapnia w komórce oraz nieprawidłowej agregacji białek, prowadzących do śmierci komórki (Bown i wsp. 2000). GRP 78 hamuje także akumulację wolnych rodników tlenowych (Liu i wsp. 1997).

W innym badaniu wskazywano na wpływ kwasu walproinowego na ekspresję czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF). BDNF odgrywa istotną rolę w procesie przeżywania, utrzymywania żywotności oraz plastyczności neuronów. Stres, zarówno ostry, jak i przewlekły, powoduje zmniejszenie ekspresji BDNF w obrębie hipokampa. Przewlekłe podawanie leku u szczurów powodowało zwiększenie ekspresji BDNF w obrębie kory czołowej oraz hipokampa, podczas gdy nie zmieniał się poziom czynnika neurotroficznego pochodzenia glejowego (*glial cell-derived neurotrophic factor*, GDNF) (Fukumoto i wsp. 2001). Wydaje się, że na ekspresję tych białek ma wpływ hamowanie HDAC (Wu i wsp. 2008).

W badaniu Rena i wsp. (2004), przeprowadzonym na szczurach, kwas walproinowy wywierał działanie ochronne w stosunku do ekscytotoksyczności zależnej od receptorów NMDA w dojrzałych komórkach ziarnistych mózdzku tych zwierząt poprzez wzrost ekspresji białek szoku termicznego. W innym badaniu stwierdzano, że hamowanie HDAC powiązane jest ze zmniejszoną akumulacją w jądrze komórkowym proapoptotycznej dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH), indukowanej przez ekscytotoksyczność (Kanai i wsp. 2004). Kolejnym szlakiem sygnałowym, przez który działa kwas walproinowy, jest szlak Wnt/ β -katenina, biorący udział w regulacji embriogenezy oraz utrzymywania homeostazy organizmu u osób dorosłych (Wang i wsp. 2010). Hamuje on także GSK-3 β , co wpływa na modyfikację przekazywania na szlaku sygnałowym Wnt/ β -katenina. Wpływ kwasu walproinowego na ten szlak sygnałowy powiązany jest z indukcją różnicowania nerwowych komórek macierzystych (Wang i wsp. 2015).

Hamowanie HDAC wpływa także na indukcję α -synukleiny, białka biorącego udział w formowaniu oraz plastyczności synapsy. Mechanizm neuroprotektynowy jej działania opiera się na aktywacji szlaku sygnałowego PI3K/Akt, supresji białka p53 oraz c-Jun-N-końcowej kinazy (*c-Jun N-terminal kinase*, JNK). W komórkach ziarnistych mózdzku szczura kwas walproinowy zwiększa, wraz z czasem trwania ekspozycji, poziom białka oraz mRNA dla α -synukleiny, przez co działa neuroprotektynicznie przeciwko ekscytotoksyczności zależnej od glutaminianu (Leng i Chuang 2006). Z drugiej strony złogi nieprawidłowych oligomerów α -synukleiny działają neurotoksycznie i są istotne w patogenezie choroby Parkinsona.

Kwas walproinowy kontroluje również szlak enzymatyczny fosforylacji oksydacyjnej OXPHOS. Jest to układ pięciu kompleksów enzymów, pełniący istotną funkcję w procesach generowania energii, ale także powiązany z różnorodnymi innymi procesami. Szlak OXPHOS reguluje wiele reakcji katalitycznych, wchodzi w interakcje z różnymi receptorami oraz kanałami jonowymi, w rezultacie wpływając na regulację ekspresji genów (Kostrouchova i wsp. 2007). Kwas walproinowy hamuje aktywność dehydrogenazy dwuwodoroliponowej (dihydrolipoyl dehydrogenase, DLDH) oraz hamuje fosforylację oksydacyjną zależną od glutaminianu oraz kwasu α -ketoglutazarowego (Luis i wsp. 2007).

Kwas walproinowy zwiększa także stężenie tryptofanu (*tryptophan*, TRP), a przez to kinureniny (*kynurenine*, KYN) oraz kwasu kinureninowego (*kynurenic acid*, KYNA) w obrębie mózgu. Prawdopodobnie jest to związane z blokowaniem przez kwas walproinowy miejsca wiązania TRP z albuminami osocza, co zwiększa ilość wolnego TRP w osoczu krwi i umożliwia jego przenikanie przez barierę krew-mózg (Maciejak i wsp. 2013). Wykazano, że KYNA ma działanie przeciwdrgawkowe oraz neuroprotektoryjne w modelach ekscytotoksyczności, niedokrwienia oraz zapaleniu mózgu (Vamos i wsp. 2009).

Działanie przeciwzapalne kwasu walproinowego

Stan zapalny jest czynnikiem sprawczym i współistniejącym w wielu różnych stanach patologicznych i chorobach ośrodkowego układu nerwowego. W odpowiedzi zapalnej biorą udział komórki układu immunologicznego, gładki, komórki śródbłonna naczyń oraz komórki nerwowe. Wszystkie one wydzielają cytokiny pro- i przeciwzapalne, chemokiny, czynniki troficzne i neurotoksyczne, jak np. wolne rodniki tlenowe. Regulacja odpowiedzi zapalnej w ośrodkowym układzie nerwowym jest odpowiedzialna za rozmiar uszkodzenia w przebiegu procesów ostrych (niedokrwienie, uraz) oraz za postęp neurodegeneracji w procesach przewlekłych. Wielokrotnie pokazano, że hamowanie reakcji zapalnej przyczynia się do ograniczenia uszkodzenia w przebiegu różnych patologii ośrodkowego układu nerwowego.

Kwas walproinowy modyfikuje odpowiedź zapalną poprzez wpływ na hamowanie HDAC i powodowanie hiperacetylacji białek histonowych i niehistonowych. W ten sposób wpływa m.in. na regulację białek szoku termicznego, cytokin pro- i przeciwzapalnych, enzymów uwalnianych w trakcie procesów zapalnych, a także na modulację receptorów hormonów, aktywację wielu wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych oraz czynników transkrypcyjnych. W komórkach powiązanych z odpowiedzią zapalną hamowanie HDAC wywołuje szereg działań, zarówno przeciwzapalnych, jak i pobudzających zapalenie (Halili i wsp. 2009).

Kwas walproinowy jako inhibitor HDAC zmniejsza uwalnianie mieloperoksydazy oraz migrację granulocytów, a także redukuje poziom cytokin prozapalnych (Adcock 2006; Ximenes i wsp. 2012). Ponadto poprzez inhibicję HDAC zmniejsza liczbę komórek mikrogleju, indukując ich śmierć w mechanizmie apoptozy (Peng i wsp. 2005). W tym samym badaniu opisano także, że w sytuacji narażenia na LPS kwas walproinowy zmniejsza produkcję czynnika martwicy nowotworów α (*tumor necrosis factor α* , TNF- α) w komórkach dopaminergicznych. TNF- α jest cytokiną biorącą udział w licznych procesach powiązanych z uszkodzeniem mózgu, m.in. bezpośrednio uszkadza oligodendrocyty i przyczynia się do demielinizacji w procesach zapalnych oraz zwiększa ekspresję iNOS (Lee i wsp. 2014; Jain 2011). Pokazano, że kwas walproinowy zmniejsza ekspresję mRNA i poziom białka iNOS (Lee i wsp. 2014). Niektórzy autorzy sugerują, że kwas walproinowy działa poprzez zmniejszenie ekspresji NF- κ B, przez co hamuje produkcję TNF- α oraz IL-6 (Ichiyama i wsp. 2000). Może wpływać także bezpośrednio na komórki gleju. Te ostatnie pobudzone podaniem LPS, pod wpływem działania kwasu walproinowego tracą potencjał elektryczny błony mitochondrialnej, ulegają fragmentacji i apoptozie (Chen i wsp. 2007). Faraco i wsp. stwierdzali, że inhibicja HDAC w komórkach glejowych u myszy powoduje hamowanie powstawania odpowiedzi zapalnej poprzez modyfikację procesu transkrypcji (Faraco i wsp. 2009). Z drugiej strony, kwas walproinowy wpływa na zmianę fenotypu mikrogleju, zmniejszając jego różnicowanie i proliferację, przez co prowadzi do zmniejszenia działania fagocytarnego, a w rezultacie do przewagi procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym (Gibbons i wsp. 2011).

W procesach zapalnych w obrębie układu nerwowego uczestniczy także inflamasom, czyli wewnątrzkomórkowa molekularna platforma, składająca się z wielu białek, kontrolująca wydzielanie i aktywację cytokin prozapalnych, m.in. IL-1 β i IL-18, odpowiedzialna za aktywację kaspazy 1 oraz procesu pyroptozy, czyli zaprogramowanej śmierci komórki w odpowiedzi na zakażenie (Strowig i wsp. 2012). Inflamasom tworzy się w odpowiedzi na ostre uszkodzenie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Inhibitory HDAC, takie jak kwas walproinowy, mogą hamować tworzenie i aktywację inflamasomów (Chen i wsp. 2014).

Poprzez inhibicję HDAC oraz zmniejszanie poziomu metaloproteiny 9 (*matrix metalloproteinase 9*, MMP-9) i hamowanie degradacji białek „ściśłych złącz”, kwas walproinowy zmniejszał także uszkodzenie bariery krew-mózg oraz strefy obrzęku w modelu niedokrwienia mózgu u szczurów (Wang i wsp. 2011).

Oprócz działania przeciwzapalnego kwas walproinowy wykazuje również działanie przeciwbólowe, w głównej mierze poprzez zmniejszenie ekspresji TNF- α , ale także wpływ na zwiększenie przekazywania GABA-ergicznego oraz receptory NMDA. W modelu zwierzęcym

powoduje zmniejszenie strefy obrzęku, hamuje migrację leukocytów oraz uwalnianie mieloperoksydazy, przez co zmniejsza odczuwanie bólu pochodzenia zapalnego. Ponadto, w mniejszym stopniu, redukuje ból neurogeny (Ximenes i wsp. 2013).

Kwas walproinowy działa także proangiogenicznie, prawdopodobnie poprzez pobudzenie uwalniania czynnika wzrostu śródbłoka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) oraz MMP-9 (Wang i wsp. 2011; Wang i wsp. 2012). VEGF oraz MMP-9 są kluczowymi czynnikami działającymi proangiogenicznie po wystąpieniu niedokrwienia. VEGF zwiększa proliferację komórek śródbłoka i pośredniczy w efektach innych czynników proangiogenicznych, MMP-9 z kolei usuwa macierz pozakomórkową, umożliwiając rozwój nowych komórek śródbłoka. Zarówno VEGF, jak i MMP-9 pełnią więc dwojaką funkcję w odpowiedzi na niedokrwienie. W ostrej fazie zwiększają przepuszczalność bariery krew-mózg, podczas gdy w późniejszym okresie promują angio- i neurogenezę (Zhang i wsp. 2000). Kwas walproinowy, stosowany przewlekle, zwiększa poziom zarówno VEGF, jak i MMP-9 w modelu niedokrwienia spowodowanym zamknięciem tętnicy środkowej mózgu u szczurów poprzez czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję 1 (*hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1), a także wpływa na zmniejszenie obszaru niedokrwienia oraz deficytu funkcjonalnego (Wang i wsp. 2012).

Istotne wydaje się także działanie przeciwutleniające kwasu walproinowego poprzez modulację enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza nadtlenkowa (*superoxide dismutase*, SOD), katalaza (*catalase*, CAT) czy wodoronadtlenkowa peroksydaza glutationowa fosfolipidów (*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*, px-GSH) (Zhang i wsp. 2012). Wolne rodniki tlenowe mogą zwiększać działanie aminokwasów pobudzających oraz wpływać na ekspresję genów, co prowadzi do peroksydacji lipidów i oksydacji DNA, a w konsekwencji do apoptozy (Suda i wsp. 2013). Kwas walproinowy zapobiega indukowanej przez glutaminiany peroksydacji lipidów oraz oksydacji białek, m.in. poprzez zwiększanie ekspresji S-transferazy glutationu M1 (*glutathione S-transferase M1*, GSTM1) oraz zwiększanie aktywności tego enzymu. GSTM1 odpowiada za katalizowanie syntezy działającego antyoksydacyjnie glutationu ze związkami utlenowanymi i generowanie nietoksycznych produktów. W rezultacie kwas walproinowy hamuje obumieranie komórek oraz fragmentację DNA (Shao i wsp. 2005; Wang i wsp. 2004). W sytuacji nagłego niedokrwienia, w trakcie którego poziomy enzymów rozkładających wolne rodniki spadają, kwas walproinowy może działać także poprzez dysmutazy nadtlenkowe (Jornada i wsp. 2011). Stwierdzano, że kwas walproinowy zapobiega uszkodzeniu komórek kory mózgu szczura przez stres oksydacyjny (Shao i wsp. 2005). W modelu przejściowego niedokrwienia u szczurów kwas walproinowy wpływał na zmniejszenie peroksydacji lipidów oraz produkcji wolnych rodników,

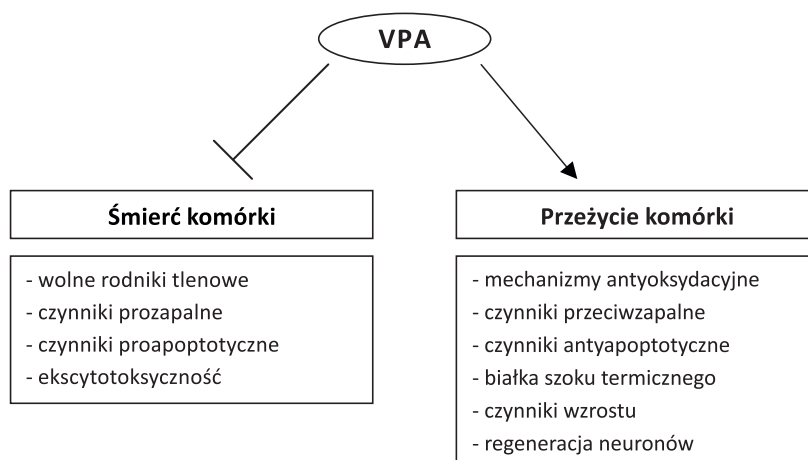
co wiązało się ze zmniejszeniem apoptozy komórek nerwowych (Suda i wsp. 2013).

Działanie neuroprotektoryjne kwasu walproinowego

W ostatnim czasie badania koncentrowały się na zastosowaniu kwasu walproinowego jako leku neuroprotektoryjnego w różnych rodzajach uszkodzeń układu nerwowego. Termin „neuroprotekcja” definiowany jest jako działania podjęte w celu ochrony komórek nerwowych przeciwko niepożądanym zdarzeniom zachodzącym na poziomie komórkowym w sytuacji niedoboru tlenu lub glukozy – bądź obydwu tych niezbędnych czynników (Sreedhar i wsp. 2003). Neuroprotekcja opisywana jest też jako strategia, której zadaniem jest przeciwdziałanie, przerwanie lub też spowolnienie sekwencji uszkadzających zdarzeń na poziomie komórkowym lub biochemicznym, które, jeśli nie wdroży się żadnego postępowania, doprowadzą do nieodwracalnego uszkodzenia (Ginsberg 2008).

Działanie neuroprotektoryjne kwasu walproinowego stwierdzano w przebiegu działania różnych czynników uszkadzających – niedokrwienia mózgu (Ren i wsp. 2004; Kim i wsp. 2007), ekscytotoksyczności (Hashimoto i wsp. 2002; Kanai i wsp. 2004), stresu komórkowego (Kim i wsp. 2007), podawania amfetaminy czy neurotoksyczności powodowanej przez akumulację amyloidu (Alvarez i wsp. 1999; Ximenes i wsp. 2012).

W modelach komórkowych kwas walproinowy wykazywał działanie antyapoptotyczne w komórkach nerwowych kory szczurów, działając poprzez mechanizm hiperacetylacji histonów. Wykazywał także w mniejszym stopniu działanie ochronne wobec naturalnej śmierci komórek związanej z wiekiem (Jeong i wsp. 2003). Ponadto w hodowlach komórkowych stwierdzano zmniejszenie uszkodzenia komórek nerwowych w przebiegu deprywacji tlenu i glukozy w obrębie hipokampa w przypadku podania większych dawek kwasu walproinowego (Rekling 2003). Kwas walproinowy zabezpieczał także dojrzałe komórki mózdzku przed ekscytotoksycznością zależną od glutaminianu w mechanizmie hamowania HDAC (Kanai i wsp. 2004). Opisywano także działanie protektoryjne walproinianu przeciwko stresowi w obrębie siateczki endoplazmatycznej oraz śmierci neuronów spowodowanej zapaleniem w mechanizmie aktywacji mikrogleju indukowanej LPS (Kim i wsp. 2007). W innym badaniu stosowanie walproinianu zmniejszało neurotoksyczność zależną od dopaminy indukowaną przez LPS, częściowo przez powodowanie apoptozy komórek mikrogleju (Chen i wsp. 2007). Ponadto stwierdzano działanie neuroprotektoryjne kwasu walproinowego po zadziałaniu stresu oksydacyjnego poprzez hamowanie peroksydacji lipidów oraz utleniania białek (Wang i wsp. 2003). Kwas walproinowy zabezpieczał także komórki ziarniste mózdzku szczurów przed apoptozą indukowaną hipokaliemią, zależną od szlaku sygnałowego PI3K/Akt (Mora i wsp. 2002).



Rycina 2 Wpływ kwasu walproinowego na równowagę mechanizmów promujących śmierć i przeżycie komórek nerwowych (⊣ oznacza hamowanie; → oznacza pobudzenie)

Udar mózgu

W modelach zwierzęcych udaru mózgu kwas walproinowy zmniejszał uszkodzenie spowodowane przejściowym niedokrwieniem mózgu poprzez hamowanie HDAC oraz aktywację białek szoku termicznego (Ren i wsp. 2004). Ren i wsp. oceniali wpływ zastosowania kwasu walproinowego podanego po przejściowym zamknięciu tętnicy środkowej mózgu u szczurów na wielkość obszaru mózgu objętego niedokrwieniem oraz ciężkość deficytu neurologicznego. U zwierząt, które otrzymały leczenie kwasem walproinowym, stwierdzano występowanie zarówno mniejszych ognisk niedokrwienych, jak i deficytu neurologicznego. Podanie leku hamowało aktywację kaspazy-3 (w formie 17 kDa i 19 kDa), biorącej udział w uszkodzeniu neuronów po wystąpieniu ogniskowego niedokrwienia. Kwas walproinowy zwiększał także ilość acetylowanego histonu H3 w obrębie kory mózgu oraz prążkowie. Ponadto stwierdzano zwiększenie poziomu HSP70, którego poziom powiązany jest z odpornością komórek nerwowych na uszkodzenie. HSP70 działa antyapoptotycznie przez różnorodne mechanizmy – m.in. hamuje aktywację kaspazy-3, zmniejsza aktywność czynnika indukującego apoptozę, blokuje działanie kinazy JNK, powiązanej ze śmiercią komórki w związku z ekscytotoksycznością, a także hamuje aktywację NF- κ B oraz ekspresję genów prozapalnych. Opisywano także działanie HSP jako białka opiekuńczego, wiążącego się do nieprawidłowo złożonych białek i zapobiegającego ich dalszej agregacji, a co za tym idzie, śmierci komórki. Wydaje się, że nadekspresja HSP70 powodowana przez kwas walproinowy może odgrywać główną rolę w obserwowanych przez tych autorów działaniach neuroprotektynowych (Ren i wsp. 2004).

Temat różnorodnych mechanizmów działania inhibitorów HDAC w modelu zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczurów był także podjęty przez Kima i wsp. (2007). W badaniu, z zastosowaniem zamknięcia tętnicy

środkowej mózgu, potwierdzono wpływ stosowania kwasu walproinowego na zmniejszenie rozmiaru ogniska niedokrwienego oraz deficytu neurologicznego. Ponadto stwierdzano zmniejszenie aktywacji oraz ilości komórek mikrogleju, komórek monocytarnych/makrofagów, a także innych markerów zapalenia w obrębie niedokrwionej tkanki nerwowej. Aktywacja mikrogleju i napływ leukocytów w obrębie niedokrwionej tkanki nerwowej prowadzi do uwolnienia cytokin prozapalnych (IL-1, IL-2, TNF- α), tlenku azotu oraz wolnych rodników tlenowych. Ich działania prowadzą do neurodegeneracji w mechanizmie ekscytotoksyczności. Autorzy ci obserwowali także nadekspresję HSP70, blokowanie indukowanej przez zamknięcie tętnicy środkowej mózgu „regulacji w dół” fosforylowanej formy Akt oraz blokowanie „regulacji w górę” białka p53, a także iNOS oraz cyklooksygenazy 2 (*cyclooxygenase 2*, COX-2). Nadekspresja HSP70 zwiększa ekspresję Bcl-2 oraz zmniejsza aktywację mikrogleju oraz monocytów w eksperymentalnym modelu udaru mózgu. COX-2 z kolei katalizuje syntezę prostanoidów oraz tworzenie wolnych rodników, odpowiadających za proces zapalny w obrębie mózgu oraz ekscytotoksyczność zależną od niedokrwienia komórek mózgu (Kim i wsp. 2007). Ponadto w modelu ogniskowego niedokrwienia opisywano supresję fragmentacji DNA w neuronach, hamowanie gromadzenia się neutrofilów oraz aktywacji mikrogleju (Suda i wsp. 2014).

W innym badaniu stwierdzono, że podanie kwasu walproinowego po wystąpieniu przejściowego globalnego niedokrwienia mózgu u szczurów zapobiega śmierci komórek nerwowych w regionie CA1 hipokampa oraz poprawia orientację w przestrzeni tych zwierząt. Kwas walproinowy zmniejszał aktywację komórek mikrogleju, produkcję cytokin prozapalnych IL-1 β i TNF- α , a także wpływał na inhibicję HDAC i zwiększenie poziomów HSP70, co było powiązane z jego efektami klinicznymi (Xuan i wsp. 2012).

W modelu przejściowego niedokrwienia mózgu kwas walproinowy może również mieć wpływ na ekspresję mikroRNA i w ten sposób dodatkowo regulować ekspresję białek, chociaż nie sprecyzowano dotąd mechanizmów takiego działania (Hunsberger i wsp. 2012). W przypadku trwałego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczurów podawanie kwasu walproinowego po wystąpieniu niedokrwienia zwiększało neurogenezę i regenerację istoty białej, a także wpływało na poprawę stanu neurologicznego. W badaniu stwierdzano wzrost ekspresji glejowego transportera glutaminianu 1 (*glutamate transporter 1*, GLT-1), co było związane z inhibicją HDAC. Nadekspresja GLT-1 przez kwas walproinowy może być odpowiedzialna za zmniejszenie śmiertelności komórek oligodendroglu poprzez usuwanie zewnątrzkomórkowego glutaminianu. Wydaje się, że hamowanie HDAC wiąże się także ze zwiększeniem ilości neuroblastów w obszarze objętym niedokrwieniem oraz indukcją różnicowania komórek progenitorowych oligodendroglu w dojrzałe oligodendrocyty, co może prowadzić do zwiększonej regeneracji aksonów w strefie niedokrwienia (Liu i wsp. 2012).

Kwas walproinowy może działać ochronnie poprzez hiperacetylację histonów i zwiększenie ekspresji genów zaangażowanych w procesy plastyczności i przeżycia neuronów. Costa i wsp. (2006) stwierdzali działanie neuroprotektoryjne kwasu walproinowego w średnich komórkach kolcowych prądkowia przez wpływ na potencjał pola elektrycznego, jednak w dawce wyższej niż bezpieczna stosowana u ludzi.

W komórkach siatkówki po wystąpieniu przejściowego niedokrwienia kwas walproinowy zmniejszał apoptozę komórek zwojowych siatkówki oraz aksonów nerwu wzrokowego (Zhang i wsp. 2012). Działanie neuroprotektoryjne było powiązane z hiperacetylacją histonu 3 w promotorze HSP70. Kwas walproinowy zwiększał transkrypcję HSP70 oraz wiązanie HSP70 do czynnika aktywującego proteazy związane z apoptozą 1 (*apoptotic protease activating factor 1*, APAF-1), hamował powstawanie apoptosomu, translokację cytochromu c z mitochondrium do cytozolu oraz aktywację kaspazy-3, a w rezultacie zmniejszał uszkodzenie siatkówki u szczurów po wystąpieniu przejściowego niedokrwienia (Zhang i wsp. 2012).

Kwas walproinowy zwiększał przeżywalność komórek nerwowych po wystąpieniu wstrząsu krwotocznego oraz chronił je przed apoptozą spowodowaną przez hipoksję w mechanizmie hiperacetytacji β -kateniny, a w konsekwencji zwiększenia ekspresji Bcl-2 (Li i wsp. 2008).

Uraz mózgu

W urazach mechanicznych mózgu kwas walproinowy działał również neuroprotektoryjnie (Dash i wsp. 2010). Dash stwierdził także, że szczury, które otrzymywały kwas walproinowy, cechowały się lepszymi zdolnościami poznawczymi po wystąpieniu uszkodzenia mózgu w porównaniu z grupą kontrolną. Podanie leku wpływało

na zwiększenie ilości białka 2 związanego z mikrotubulami (*microtubule-associated protein 2*, MAP2), istotnego dla integralności błon komórek nerwowych hipokampa, oraz zmniejszało uszkodzenie bariery krew-mózg. Te efekty mogą być powiązane z inhibicją HDAC i GSK-3 β (Dash i wsp. 2010). Opisano również neuroprotektoryjne działanie kwasu walproinowego w urazowym uszkodzeniu mózgu poprzez ścieżki sygnałowe ERK i Akt (Zhang i wsp. 2014). Podanie leku po wystąpieniu urazu zmniejszało obrzęk mózgu, obszar objęty stłuczeniem oraz nasilenie apoptozy. Udowodniono indukujący wpływ działania kwasu walproinowego na powolną aktywację czynnika przeżycia komórki Akt (De Sarno i wsp. 2002).

Krwotok śródmózgowy

W modelu krwotoku śródmózgowego kwas walproinowy powodował acetylację histonu H3, jak również pERK, pAkt, pCREB oraz HSP70. Ponadto wpływał na regulację białek zaangażowanych w proces apoptozy, powodując zwiększenie ilości białek Bcl-2 i Bcl-XL oraz zmniejszenie ilości Bax, Fas-L (będącego ligandem Fas, podczas gdy Fas jest białkiem z rodziny TNF), a także czynników prozapalnych: MMP-9, białka zapalnego makrofagów (*macrophage inflammatory protein 1*, MIP-1), białka chemotaktycznego dla monocytów (*monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1), tkankowego aktywatora plazminogenu (*tissue plasminogen activator*, tPA) oraz interleukiny 6. Zastosowanie kwasu walproinowego u szczurów po wystąpieniu krwotoku śródmózgowego wiązało się z ograniczeniem rozległości krwotoku, zaników mózgu oraz szybszą poprawą w zakresie deficytów neurologicznych. Kwas walproinowy wykazywał działanie plejotropowe, wpływając na hamowanie reakcji zapalnych oraz apoptozy, a także modyfikację ścieżek sygnałowych przeżycia komórki (Sinn i wsp. 2007).

Uszkodzenie rdzenia kręgowego

U szczurów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego, kwas walproinowy zmniejszał deacetylację histonów, indukowaną uszkodzeniem, zwiększał ekspresję HSP70 i Bcl-2, hamował aktywację kaspazy-3 i apoptozę, a w efekcie zmniejszał deficyt funkcjonalny (Lv i wsp. 2011). W innym badaniu kwas walproinowy zwiększał poziomy BDNF i GDNF oraz zmniejszał reakcje zapalne w miejscu uszkodzenia rdzenia kręgowego, co wiązało się z poprawą w zakresie funkcji motorycznych szczurów (Abdanipour i wsp. 2012). Inni badacze donoszą, że kwas walproinowy wpływa także na zmniejszenie uszkodzenia bariery krew-rdzeń kręgowy, spowodowanego przez uraz rdzenia kręgowego, poprzez „regulację w górę” białek neuroprotektoryjnych Akt, HSP27, HSP70 oraz „regulację w dół” białka p53, a także hamowanie wydzielania mediatorów zapalenia TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS i COX-2, zmniejszenie ilości i aktywności MMP-9 i, w mniejszym stopniu, MMP-2 oraz zmniejszenie degradacji białek „ściśłych złącz” (Lee i wsp. 2012).

Wykazano także skuteczność działania neuroprotektynowego kwasu walproinowego w modelu rdzeniowego zaniku mięśni u myszy. Podawanie leku wiązało się z lepszym funkcjonowaniem motorycznym, mniejszą degeneracją rdzeniowych neuronów ruchowych, mniejszym zanikiem mięśni i lepszym funkcjonowaniem złączy nerwowo-mięśniowych (Tsai i wsp. 2008).

Procesy neurodegeneracyjne

W badaniach pokazano również, że przewlekłe podawanie kwasu walproinowego poprawia pamięć długoterminową. Działanie leku tłumaczy się jego wpływem na mechanizmy regulacji epigenetycznej. Modyfikacje w obrębie histonów powodują dynamiczne zmiany w strukturze chromatyny i pomagają regulować ekspresję genów indukowaną uczeniem. Zmiany w strukturze chromatyny powodowane przez inhibitory HDAC i acetylotransferazy histonów mogą zwiększyć plastyczność w obrębie synapsy. Po wystąpieniu urazowego uszkodzenia mózgu podanie kwasu walproinowego powodowało poprawę funkcji poznawczych (Dash i wsp. 2010). W mysim modelu choroby Alzheimera przewlekłe leczenie walproinianem sodu poprawiało pamięć oraz zmniejszało deficyty behawioralne, zmniejszało także formowanie złogów amyloidu (Qing i wsp. 2008).

Z kolei Hsieh i wsp. wskazywali na pobudzenie przez kwas walproinowy procesu różnicowania progenitorowych komórek nerwowych hipokampa. Stosowanie kwasu walproinowego pobudzało ich różnicowanie w kierunku komórek nerwowych, hamowało natomiast proces różnicowania w komórki astro- i oligodendrogleju poprzez czynniki transkrypcyjne (Hsieh i wsp. 2004).

Innym interesującym działaniem kwasu walproinowego jest zwiększanie możliwości migracyjnych i osadniczych komórek macierzystych mezenchymy. Potencjalny korzystny wpływ leczenia udaru mózgu komórkami macierzystymi mezenchymy może wynikać z wpływu na immunomodulację, angiogenezę, neurogenezę, neurotrofizm oraz neuroprotekcję. Tsai i wsp. stwierdzali poprawę funkcjonalną, zmniejszenie obszaru objętego niedokrwieniem oraz zwiększenie angiogenezy w modelu okluzji tętnicy środkowej mózgu u szczurów. W badaniu tym podawanie kwasu walproinowego zwiększało migrację komórek macierzystych mezenchymy poprzez inhibicję HDAC, czego efektem był wzrost ekspresji receptora 4 chemokiny CXC (*chemokine (C-X-C motif) receptor 4*, CXCR4). Jednak podkreślić należy, że tylko niewielka ilość komórek macierzystych uległa różnicowaniu w komórki nerwowe i glejowe (Tsai i wsp. 2011).

Wydaje się, że kwas walproinowy jest lekiem o dużych potencjalnych możliwościach leczenia różnorodnych ostrych i przewlekłych chorób neurologicznych, powiązanych z występowaniem stresu oksydacyjnego, mechanizmów zapalnych czy też aktywowania procesów apoptotycznych (Nalivaeva i wsp. 2009).

Inne działania kwasu walproinowego

Kwas walproinowy wpływa na proliferację i różnicowanie komórek różnego rodzaju (m.in. komórek śródbłonna, hematopoetycznych, macierzystych komórek nerwowych), w tym komórek nowotworowych. Dotychczas wskazywano na hamujący wpływ kwasu walproinowego na wzrost niektórych rodzajów komórek nowotworowych i ich skłonność do dawania przerzutów oraz jego wpływ promujący różnicowanie tych komórek (Blaheta i Cinatl 2002). To drugie działanie było powiązane z indukcją apoptozy, zarówno na drodze zależnej, jak i niezależnej od kaspaz, oraz hamowaniem angiogenezy w obrębie komórek nowotworowych (Monti i wsp. 2009). Kwas walproinowy wykazywał działanie proapoptotyczne w komórkach nowotworowych niereagujących na inne terapie (Tang i wsp. 2004). Wskazywano również, że kwas walproinowy wzmacnia efekt zastosowanego leczenia przeciwnowotworowego (kwas retinowy, interferon alfa, radioterapia). W ostatnio przeprowadzonych badaniach udowodniono też, że walproinian ma działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych jajnika (Kwiecińska 2013).

Za przeciwnowotworowe działanie kwasu walproinowego odpowiedzialne mogą być różne mechanizmy, takie jak zwiększenie ekspresji genów regulowanych przez szlak sygnałowy ERK-AP-1, zmniejszenie aktywności kinazy białkowej C (*protein kinase C*, PKC), hamowanie GSK-3 β , regulującego szlak sygnałowy Wnt, pobudzenie receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów γ i δ (*peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR γ i δ), czy też inhibicja HDAC.

Dzięki plejotropowemu wpływowi kwas walproinowy reguluje procesy angiogenezy, migracji, różnicowania oraz wzrostu komórek nowotworowych. Dotychczas stwierdzano, że kwas walproinowy może zapobiegać proliferacji i indukować różnicowanie m.in. komórek nerwiaka zarodkowego, ostrej białaczki szpikowej, erytroleukemii, raka piersi, skóry, prostaty, pęcherza moczowego, płuca, jelita grubego i szyjki macicy (Blaheta i Cinatl 2002; Ximenes i wsp. 2012).

W fazie przedklinicznej badano wpływ kwasu walproinowego na różne komórki nerwiaka zarodkowego, glejaka, nowotworów germinalnych, linie komórek nowotworowych prostaty i piersi. Stwierdzano zahamowanie wzrostu, indukcję różnicowania, zmniejszenie adhezji komórek, angiogenezy oraz migracji komórek nowotworowych. Przewlekłe stosowany kwas walproinowy indukował końcowe fazy różnicowania niektórych komórek nowotworowych i w sposób nieodwracalny zmniejszał ich potencjał mitotyczny. Obserwowano jego wpływ na zmniejszenie proliferacji w liniach komórkowych raka jelita grubego, piersi oraz prostaty (Blaheta i Cinatl 2002).

Tabela 1 Wpływ kwasu walproinowego na mechanizmy molekularne i przekaźnikowe w komórkach nerwowych

Układ lub system molekularny	Elementy układów lub systemów molekularnych	Wpływ kwasu walproinowego	Piśmiennictwo
GABA-ergiczny	GAD, GABA-T, SSADH, α -KGDH	(+) (-) (-) (-)	Biggs i wsp. 1992; Cunningham i wsp. 2003; Eckstein-Ludwig i wsp. 1999; Löscher 1999
glutaminergiczny	NMDA, AMPA	(-) (-)	Cunningham i wsp. 2003; Hashimoto i wsp. 2002; Ren i wsp. 2004
poziomy monoamin	NA, DA, 5-HT	(-)(+) (+) (-)(+)	Meshki-Baf i wsp. 1994
kanały jonowe	Na ⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺	(-) (-) (-)	Löscher 1999; Remy i wsp. 2003; Todorovic i Lingle 1998; Van Erp i wsp. 1990
deacetylazy histonów	HDAC 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9	(-)	Göttlicher i wsp. 2001
szlak sygnałowy PI3K/Akt	GSK-3 β , AP-1	(-) (+)	De Sarno i wsp. 2002; Marinova i wsp. 2009; Mora i wsp. 2002; Sinn i wsp. 2007; Zhang i wsp. 2014
szlak sygnałowy ERK	RAS-RAF-ERK, RS6K, CREB, GAP43	(+) (+) (+) (+)	Chen i wsp. 1999; Fukumoto i wsp. 2001; Sinn i wsp. 2007; Zhang i wsp. 2014
szlak Wnt/β-katenina	Wnt1, Wnt2	(+) (+)	Li i wsp. 2008; Wang i wsp. 2010; Wang i wsp. 2015
szlak kinureninowy	TRP, KYN, KYNA	(+) (+) (+)	Maciejak i wsp. 2013
szlak OXPHOS	DLDH	(-)	Kostrouchova i wsp. 2007; Luis i wsp. 2007
białka szoku termicznego	HSP70, HSP27	(+) (+)	Ren i wsp. 2004; Kim i wsp. 2007; Lee i wsp. 2012; Lv i wsp. 2011; Xuan i wsp. 2012; Zhang i wsp. 2012
mikro RNA		(+)	Hunsberger i wsp. 2012
enzymy przeciwutleniające	SOD, CAT, px-GSH, GSTM1	(+) (+) (+) (+)	Marinova i wsp. 2009; Ryu i wsp. 2003; Shao i wsp. 2005; Suda i wsp. 2013; Wang i wsp. 2004; Zhang i wsp. 2012
białka stresu RE	GRP 78, GRP 94, kalretikulina	(+) (+) (+)	Bown i wsp. 2000
inflamasom	IL-1 β , IL-18, kaspaza 1	(-) (-) (-)	Chen i wsp. 2014
komórki mikrogleju		(-)	Chen i wsp. 2007; Gibbons i wsp. 2011; Kim i wsp. 2007; Suda i wsp. 2014; Xuan i wsp. 2012

Układ lub system molekularny	Elementy układów lub systemów molekularnych	Wpływ kwasu walproinowego	Piśmiennictwo
mediatory zapalenia	NF-κB, IL-1β, IL-6, MPO, iNOS, TNF-α, MIP-1, MCP-1, COX-2	(-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-)	Ichiyama i wsp. 2000; Kim i wsp. 2007; Lee i wsp. 2012; Peng i wsp. 2005; Sinn i wsp. 2007; Xuan i wsp. 2012
białka antyapoptotyczne	Bcl-2, Bcl-XL	(+) (+)	Chen i wsp. 1999; Kim i wsp. 2007; Li i wsp. 2008; Lv i wsp. 2011; Sinn i wsp. 2007
białka proapoptotyczne	p53, Bax, Fas-L	(-) (-) (-)	Kim i wsp. 2007; Lee i wsp. 2012; Leng i Chuang 2006; Sinn i wsp. 2007
czynniki neurotroficzne	BDNF, GDNF	(+) (+)(=)	Abdanipour i wsp. 2012; Fukumoto i wsp. 2001; Wu i wsp. 2008
białka cytoszkieletu		(+)	Hall i wsp. 2002; Jeong i wsp. 2003
bariera krew-mózg	MMP-9, MAP2	(-) (+)	Lee i wsp. 2012; Wang i wsp. 2011; Dash i wsp. 2010
angiogeneza	HIF-1, VEGF, MMP-9, MMP-2	(+) (+) (+) (+)	Wang i wsp. 2011; Wang i wsp. 2012
neurogeneza	GLT1	(+)	Liu i wsp. 2012
migracja komórek macierzystych	CXCR4	(+)	Tsai i wsp. 2011

W tabeli (+) oznacza pobudzanie, (-) oznacza hamowanie, natomiast (=) oznacza brak wpływu.

Badania kliniczne

Potencjalne użycie inhibitorów HDAC, takich jak kwas walproinowy, w leczeniu ostrych i przewlekłych chorób neurologicznych obejmuje leczenie udarów mózgu, chorób związanych z wydłużaniem trójek nukleotydowych glutaminianu (zanik jądra zębatego, jądra czerwienego, gałki bladej i jądra niskowzgórzowego, choroba Huntingtona, choroba Kennedy'ego, ataksje rdzeniowo-mózdzkowe), stwardnienia zanikowego bocznego czy choroby Alzheimera (Langley i wsp. 2005). Olesen i wsp. (2011) wykazali zmniejszone ryzyko udaru niedokrwienego mózgu oraz zawału mięśnia sercowego u chorych leczonych kwasem walproinowym. Dregan i wsp. (2014) nie potwierdzili zmniejszonego ryzyka udaru niedokrwienego mózgu, natomiast wykazali zmniejszone ryzyko zawału mięśnia sercowego u chorych leczonych kwasem walproinowym, co wydaje się być powiązane z jego wpływem na hamowanie HDAC. Według ostatnich doniesień wystąpienie zmiany w obrębie chromosomu 7, prawdopodobnie w miejscu genu dla HDAC 9, wiąże się ze zwiększeniem grubości kompleksów intima-media, częstości występowania bezobjawowych blaszek miażdżycowych,

a także ryzyka wystąpienia udaru mózgu na podłożu miażdżycy dużych naczyń (Markus i wsp. 2013; Traylor i wsp. 2012). Hamowanie HDAC 9 przez kwas walproinowy miało zatem wpłynąć na zmniejszenie występowania tych czynników oraz zmniejszenie ryzyka wystąpienia ich konsekwencji – udaru niedokrwienego mózgu oraz zawału mięśnia sercowego. W badaniu Dregana i wsp. nie potwierdzono jednak zmniejszonego ryzyka udaru niedokrwienego mózgu u chorych leczonych kwasem walproinowym, co może wynikać z innej niż miażdżycy dużych naczyń przyczyny wystąpienia udaru mózgu u badanych chorych. Ponadto w obu badaniach grupą kontrolną byli chorzy leczeni innymi lekami przeciwpadaczkowymi (karbamazepina, okskarbamazepina, lamotrygina, klonazepam, klobazam, fenytoina i fenobarbital lub karbamazepina, fenobarbital i fenytoina), badane były także różne grupy populacyjne, co może być przyczyną rozbieżności.

Prowadzone są z powodzeniem próby stosowania kwasu walproinowego w zmniejszaniu uzależnienia od metamfetaminy, rozważano również zastosowanie leku w antywirusowej terapii łączonej przeciwko ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (*human immunodeficiency*

virus, HIV), dystrofii mięśniowej Duchenne'a, a także w chorobach szpiku (Chateauvieux i wsp. 2010).

Badano także możliwość modulacji przez kwas walproinowy procesu transplatacji jednojądrzastych komórek pochodzących ze szpiku w leczeniu udaru mózgu. W modelu przejściowego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczurów zastosowanie łączonej terapii wpływało na zwiększenie działania przeciwzapalnego i zmniejszenie uszkodzenia naczyń, a także zwiększało przeżycie przeszczepianych komórek oraz wydłużało możliwy okres zastosowania terapii od wystąpienia zdarzenia (Suda i wsp. 2014).

Podsumowanie

Kwas walproinowy jest bardzo skutecznym lekiem przeciwpadaczkowym i stabilizującym nastrój i pomimo szerokiego spektrum działań niepożądanych profil bezpieczeństwa może zostać uznany za pozytywny. Podkreśla się jego niekorzystny wpływ na funkcje poznawcze, szczególnie u dzieci i osób starszych, oraz działanie teratogenne, które znajduje swoje wyjaśnienie m.in. w hamowaniu HDAC. Z drugiej strony wieloletni okres obserwacji (od lat 60. XX wieku) powoduje, że działania niepożądane kwasu walproinowego są dobrze poznane, co pozwala kontrolować je w sposób wystarczający. Odkrycie hamowania

HDAC przez kwas walproinowy stwarza nowe perspektywy, zarówno dla stosowania go w onkologii, jak i być może w chorobach, u podłoża których istotny jest proces zapalny, jak np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów, astmie, zapalnych chorobach jelit oraz w chorobach układu krążenia. Mimo iż dotychczasowe badania z zastosowaniem kwasu walproinowego w prewencji udaru mózgu nie są obiecujące, być może znajdzie on swoje miejsce jako lek neuroprotektoryjny i modulujący przebieg po urazie i w ostrej fazie udaru mózgu. Warto zwrócić uwagę, że wciąż ukazują się nowe, optymistyczne doniesienia o działaniu neuroprotektoryjnym kwasu walproinowego w badaniach *in vitro* oraz w modelach zwierzęcych. Badania eksperymentalne wskazują na wielokierunkowy mechanizm działania kwasu walproinowego, nie można także wykluczyć, że część elementów tego skomplikowanego układu pozostaje niepoznana. Pozostawia to wiele przestrzeni na poznanie i potencjalne zastosowanie w praktyce nowych działań tego, jak się okazuje, częściowo tylko znanego nam leku. Jest jednak zbyt wcześnie, żeby mówić o możliwości użycia kwasu walproinowego jako leku neuroprotektoryjnego, gdyż wyniki obecnie przeprowadzanych badań klinicznych u ludzi nie są już tak optymistyczne. Potrzebne są dalsze badania oceniające jego potencjalny wpływ neuroprotektoryjny. Być może ich wyniki pozwolą na wprowadzenie kwasu walproinowego do powszechnego użycia w nowych dla niego wskazaniach. ■

Conflict of interest and financial support non declared. / Nie zgłoszono konfliktu interesów oraz dofinansowania artykułu.

The work described in this article has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. / Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helseńskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Authors' contributions / Wkład autorów: EB – basic study design, data collection and interpretation, literature search / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy, zebranie danych i ich interpretacja, zebranie piśmiennictwa; JB – study design, data collection and interpretation, critical reviewing / zebranie danych i ich interpretacja, krytyczne recenzowanie pod kątem istotnej zawartości intelektualnej; IK-J – data collection and interpretation, critical reviewing, acceptance of final manuscript version / zebranie danych i ich interpretacja, krytyczne recenzowanie pod kątem istotnej zawartości intelektualnej, akceptacja ostatecznej wersji do opublikowania

References / Piśmiennictwo

1. Abdanipour A, Schluesener HJ, Tiraihi T, Effects of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, on improvement of

locomotor function in rat spinal cord injury based on epigenetic science. *Iran Biomed J.* 2012; 16 (2): 90–100.

- Adcock IM, Histone deacetylase inhibitors as novel anti-inflammatory agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7 (11): 966–73.
- Alvarez G, Muñoz-Montaño JR, Satrustegui J, Avila J, Bogónez W, Díaz-Nido J, Lithium Protects Cultured Neurons against Beta-Amyloid-Induced Neurodegeneration. *FEBS Letters* 1999; Vol. 453, No. 3: 260–264.
- Barone FC, Feuerstein GZ, Inflammatory Mediators and Stroke: New Opportunities for Novel Therapeutics. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1999; 19: 819–834.
- Betjemann JP, Lowenstein DH, Status epilepticus in adults. *Lancet Neurol.* 2015 Jun; 14 (6): 615–24.
- Biggs CS, Pearce BR, Fowler LJ, Whitton PS, The effect of sodium valproate on extracellular GABA and other amino acids in the rat ventral hippocampus: an *in vivo* microdialysis study. *Brain Research* 1992; Vol 594, Issue 1, 23 October 1992: 138–142.
- Blaheta RA, Cinatl J Jr, Anti-tumor mechanisms of valproate: A novel role for an old drug. *Medicinal Research Reviews* 2002; 22 (5): 492–511.
- Bown ChD, Wang J, Young LT, Increased expression of endoplasmic reticulum stress proteins following chronic valproate treatment of rat C6 glioma cells. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2162–2169.
- Calabresi P, Picconi B, Saulle E, Centonze D, Is Pharmacological Neuroprotection Dependent on Reduced Glutamate Release? *Stroke* 2000; 31: 766–772.

10. Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M, Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 479364.
11. Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Zhao ZH *et al.*, The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem.* 1999; 72 (2): 879–882.
12. Chen PS, Wang CC, Bortner CD, Peng GS, Wu X, Pang H *et al.*, Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience* 2007; 149 (1): 203–12.
13. Chen S, Wu H, Klebe D, Hong Y, Zhang J, Valproic Acid: A New Candidate of Therapeutic Application for the Acute Central Nervous System Injuries. *Neurochemical Research* 2014; 39 (9): 1621–1633.
14. Costa C, Martella G, Picconi B, Prosperetti C, Pisani A, Di Filippo M *et al.*, Multiple Mechanisms Underlying the Neuroprotective Effects of Antiepileptic Drugs Against In Vitro Ischemia. *Stroke* 2006; 37: 1319–1326.
15. Cunningham MO, Woodhall GL, Jones RS, Valproate modifies spontaneous excitation and inhibition at cortical synapses in vitro. *Neuropharmacology* 2003; 45 (7): 907–17.
16. Dash PK, Orsi SA, Zhang M, Grill RJ, Pati S, Zhao J *et al.*, Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. *PLoS One* 2010; 5 (6): e11383.
17. De Sarno P, Li X, Jope RS, Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology* 2002; 43(7): 1158–64.
18. Dregan A, Charlton J, Wolfe CDA, Gulliford MC, Markus HS, Is Sodium Valproate, an HDAC inhibitor, associated with reduced risk of stroke and myocardial infarction? A nested case-control study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2014; 23: 759–767.
19. Eckstein-Ludwig U, Fei J, Schwarz W, Inhibition of uptake, steady-state currents, and transient charge movements generated by the neuronal GABA transporter by various anticonvulsant drugs. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 92–102.
20. Egger, G., Liang G, Aparicio A, Jones PA, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457–463.
21. El Idrissi A, Trenkner E, Growth Factors and Taurine Protect against Excitotoxicity by Stabilizing Calcium Homeostasis and Energy Metabolism. *The Journal of Neuroscience* 1999; 19 (21): 9459–9468.
22. Evans RW, A rational approach to the management of chronic migraine. *Headache.* 2013 Jan; 53(1): 168–76.
23. Faraco G, Pittelli M, Cavone L, Fossati S, Histone Deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Neurobiol of Disease* 2009; 36 (2): 269–279.
24. Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S, Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology* 2001; 158: 100–106.
25. Ge Y, Yu P, Ding D, Wang P, Shi Y, Zhao T *et al.*, Etiologic features and utilization of antiepileptic drugs in people with chronic epilepsy in China: Report from the Epilepsy Cohort of Huashan Hospital (ECoH). *Epilepsy Res.* 2015 Oct; 116: 99–104.
26. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, Altman RB *et al.*, Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2013 Apr; 23 (4): 236–41.
27. Gibbons HM, Smith AM, Teoh HH, Bergin PM, Meed EW, Faull RL *et al.*, Valproic acid induces microglial dysfunction, not apoptosis, in human glial cultures. *Neurobiology of Disease* 2011; 41 (1): 96–103.
28. Ginsberg MD, Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008; 55(3): 363–89.
29. Gobbi G, Janiri L, Sodium- and magnesium-valproate in vivo modulate glutamatergic and GABAergic synapses in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 185 (2): 255–62.
30. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S *et al.*, Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001; 20 (24): 6969–78.
31. Halili MA, Andrews MR, Sweet MJ, Fairlie DP, Histone deacetylase inhibitors in inflammatory disease. *Curr Top Med Chem.* 2009; 9 (3): 309–19.
32. Hall AC, Brennan A, Goold RG, Cleverley K, Lucas FR, Gordon-Weeks PR *et al.*, Valproate Regulates GSK-3-Mediated Axonal Remodeling and Synapsin I Clustering in Developing Neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2002; 20 (2): 257–270.
33. Hashimoto R, Hough C, Nakazawa T, Yamamoto T, Chuang DM, Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *J Neurochem.* 2002; 80 (4): 589–97.
34. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH, Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101 (47): 16659–16664.
35. Hunsberger JG, Fessler EB, Wang Z, Elkahoul AG, Chuang DM, Post-insult valproic acid-regulated microRNAs: potential targets for cerebral ischemia. *Am J Transl Res.* 2012; 4 (3): 316–32.
36. Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S, Sodium valproate inhibits production of TNF- α and IL-6 and activation of NF- κ B. *Brain Res.* 2000; 857: 246–251.
37. Jain KK, Neuroprotection in Cerebrovascular Disease. In: Jain KK, *The Handbook of Neuroprotection*, Humana Press, London, 2011; 141–216.
38. Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, Fujimaki K, Ren M, Lee MS *et al.*, Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS* 2003; 542: 74–78.
39. Johanssen CU, Johanssen SI, Valproate: Past, Present, and Future. *CNS Drug Reviews* 2003; 9 (2): 199–216.
40. Jornada LK, Valvassori SS, Steckert AV, Moretti M, Mina M, Ferreira CL *et al.*, Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *J. Psychiatr. Res.* 2011; 45: 162–168.
41. Kanai H, Sawa A, Chen RW, Leeds P, Chuang DM, Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogenomics J.* 2004; 4: 336–344.
42. Kim HJ, Rowe M, Ren M, Hong JS, Chen PS, Chuang DM, Histone Deacetylase Inhibitors Exhibit Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects in a Rat Permanent Ischemic Model of Stroke: Multiple Mechanisms of Action. *Journal*

- of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2007; 321 (3): 892–901.
43. Kostrouchová M, Kostrouch Z, Kostrouchová M, Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biol.* 2007; 53 (2): 37–49.
 44. Kwiecińska P, Porównanie mechanizmu działania kwasu walproinowego i lewetiracetamu na modelu nowotworu jajnika OVCAR-3. Praca doktorska wykonana w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytut Zoologii UJ, Kraków, 2013.
 45. Lagace DC, O'Brien WT, Gurchich N, Nachtigal MW, Klein PS, Valproic acid: how it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research* 2004; 4: 215–225.
 46. Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR, Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; 4(1): 41–50.
 47. Lee JY, Kim HS, Choi HY, Oh TH, Ju BG, Yune TY, Valproic acid attenuates blood–spinal cord barrier disruption by inhibiting matrix metalloproteinase-9 activity and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry* 2012; 121 (5): 818–829.
 48. Lee JY, Maeng S, Kang SR, Choi HY, Oh TH, Ju BG *et al.*, 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): 582–594.
 49. Leker RR, Shohami E, Cerebral ischemia and trauma–different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Research Reviews* 2002; 39: 55–73.
 50. Leng Y, Chuang DM, Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurosci.* 2006; 26 (28): 7502–12.
 51. Li Y, Liu B, Sailhamer EA, Yuan Z, Shults C, Velmahos GC *et al.*, Cell protective mechanism of valproic acid in lethal hemorrhagic shock. *Surgery* 2008; 144: 217–224.
 52. Linde M, Mulleners WM, Chronicle EP, McCrory DC, Valproate (valproic acid or sodium valproate or a combination of the two) for the prophylaxis of episodic migraine in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jun 24; 6: CD010611.
 53. Liu H, Bowes RC, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL, Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca2 disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 21751–21759.
 54. Liu XS, Chopp M, Kassiss H, Jia LF, Hozeska-Solgot A, Zhang RL *et al.*, Valproic acid increases white matter repair and neurogenesis after stroke. *Neuroscience* 2012; 220: 313–21.
 55. Löscher W, Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol.* 1999; 58 (1): 31–59.
 56. Luís PBM, Ruitter JPN, Aires CCP, Sovera G, Tavares de Almeida I, Duran M *et al.*, Valproic acid metabolites inhibit dihydrolipoyl dehydrogenase activity leading to impaired 2-oxoglutarate-driven oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 2007; 1767 (9): 1126–1133.
 57. Lv L, Sun Y, Han X, Xu CC, Tang YP, Dong Q, Valproic acid improves outcome after rodent spinal cord injury: Potential roles of histone deacetylase inhibition. *Brain Research* 2011; 1396: 60–68.
 58. Maciejak P, Szyndler J, Turzyńska D, Sobolewska A, Kołosowska K, Lehner M *et al.*, The kynurenine pathway: a missing piece in the puzzle of valproate action? *Neuroscience.* 2013; 234: 135–45.
 59. Marinova Z, Ren M, Wendland JR, Leng Y, Liang MH, Yasuda S *et al.*, Valproic acid induces functional heat-shock protein 70 via Class I histone deacetylase inhibition in cortical neurons: a potential role of Sp1 acetylation. *J Neurochem* 2009; 111: 976–987.
 60. Markus HS, Makela KM, Bevan S, *et al.*, Evidence HDAC9 genetic variant associated with ischemic stroke increases risk via promoting carotid atherosclerosis. *Stroke* 2013; 44: 1220–1225.
 61. Meshki-Baf MH, Subhash MN, Madepalli Lakshamana K, Sridhara Rama Rao BS, Sodium valproate induced alterations in monoamine levels in different regions of the rat brain. *Neurochem Int* 1994; 1: 67–72.
 62. Monti B, Polazzi E, Contestabile A, Biochemical, Molecular and Epigenetic Mechanisms of Valproic Acid Neuroprotection. *Current Molecular Pharmacology* 2009; 2 (1): 95–109.
 63. Mora A, Sabio G, Alonso JC, Soler G, Centeno F, Different dependence of lithium and valproate on PI3K/PKB pathway. *Bipolar Disorders* 2002; 4 (3): 195–200.
 64. Morland C, Boldingh KA, Iversen EG, Hassel B, Valproate is Neuroprotective Against Malonate Toxicity in Rat Striatum: An Association With Augmentation of High-Affinity Glutamate Uptake. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2004; 24: 1226–1234.
 65. Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ, Sodium valproate: an old drug with new roles, *Trends Pharmacol Sci.* 2009; Oct; 30 (10): 509–14.
 66. Olesen JB, Abildstrøm SZ, Erdal J, Gislason GH, Weeke P, Andersson C *et al.*,
 67. Effects of epilepsy and selected antiepileptic drugs on risk of myocardial infarction, stroke, and death in patients with or without previous stroke: a nationwide cohort study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2011; 20: 964–97.
 68. Le Peillet E, Arvin B, Moncada C, Meldrum BS, The non-NMDA antagonists, NBQX and GYKI 52466, protect against cortical and striatal cell loss following transient global ischaemia in the rat. *Brain Res.* 1992; 571: 115–120.
 69. Peng GS, Li G, Tzeng NS, Chen PS, Chuang DM, Hsu YD *et al.*, Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 134 (1): 162–9.
 70. 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. *J Biol Chem.* 2001; 276(39): 36734–41.
 71. Pullan LM, Neuroprotective strategies for treatment of acute ischemic stroke. W: Pullan LM, Patel J, *Neurotherapeutics: Emerging Strategies*, Humana Press, NJ, 1995; 275–323.
 72. Qing H, He G, Ly PTT, Fox CJ, Staufenbiel M, Cai F *et al.*, Valproic acid inhibits Aβ production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J. Exp. Med.* 2008; 205 (12): 2781–2789.
 73. Rahimdel A, Mellat A, Zeinali A, Jafari E, Ayatollahi P, Comparison between Intravenous Sodium Valproate and Subcutaneous Sumatriptan for Treatment of Acute Migraine Attacks; Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Iran J Med Sci.* 2014 Mar; 39 (2 Suppl): 171–177.
 74. Rekling JC, Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 2003; 335: 167–170.
 75. Remy S, Urban BW, Elger CE, Beck H, Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na⁺-channels in hippocampal

- neurons of control and chronically epileptic rats. *European Journal of Neuroscience* 2003; 17: 2648–2658.
76. Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM, Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J. Neurochem.* 2004; 89: 1358–1367.
 77. Ryu H, Junghee L, Olofsson BA, Mwidau A, Deodoglu A, Escudero M *et al.*, Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *PNAS* 2003; (100) 7: 4281–4286.
 78. Sandborn WD, Bendfeldt F, Hamdy R, Valproic acid for physically aggressive behavior in geriatric patients. *Am J Geriatr Psychiatry* 1995; 3: 239–42.
 79. Sinn DI, Kim SJ, Jung KH, Lee ST, Valproic Acid-Mediated Neuroprotection in Intracerebral Hemorrhage via Histone Deacetylase Inhibition and Transcriptional Activation. *Neurobiology of Disease* 2007; Vol. 26, No. 2: 464–472.
 80. Shao L, Young LT, Wang JF, Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol. Psychiatry* 2005; 58: 879–884.
 81. Sreedhar R, Gadhinglajkar SV, Pharmacological Neuroprotection. *Indian Journal of Anaesthesia* 2003; 47 (1): 8–22.
 82. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R, Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012; 481: 278–86.
 83. Suda S, Katsura KI, Kanamaru T, Saito M, Katayama Y, Valproic acid attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat brain through inhibition of oxidative stress and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2013; 707 (1–3): 26–31.
 84. Suda S, Katsura KI, Saito M, Kamiya N, Katayama Y, Valproic acid enhances the effect of bone marrow-derived mononuclear cells in a rat ischemic stroke model. *Brain Res.* 2014; 1565: 74–81.
 85. Tang R, Faussat AM, Majdak P, Perrot JY, Chaoui D, Legrand O *et al.*, Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1. *Leukemia* 2004; 18 (7): 1246–51.
 86. Todorovic SM, Lingle CJ, Pharmacological properties of T-type Ca²⁺ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol.* 1998; 79(1): 240–52.
 87. Traylor M, Farrall M, Holliday EG, *et al.* Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the metastroke collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol* 2012; 11: 951–962.
 88. Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, Li H, Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J Mol Med Berl.* 2008; 86 (11): 1243–54.
 89. Tsai L, Wang Z, Munasinghe J, Leng Y, Leeds P, Chuang D, Mesenchymal Stem Cells Primed With Valproate and Lithium Robustly Migrate to Infarcted Regions and Facilitate Recovery in a Stroke Model. *Stroke* 2011; 42 (10): 2932–2939.
 90. Vamos E, Pardutz A, Klivenyi P, Toldi J, Vecsei L, The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sci* 2009; 283: 21–27.
 91. Van Erp MG, Van Dongen AM, Van den Berg RJ, Voltage-dependent action of valproate on potassium channels in frog node of Ranvier. *Eur J Pharmacol.* 1990; 184 (1): 151–61.
 92. Wang JF, Azzam JE, Young LT, Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. *Neuroscience* 2003; 116: 485–489.
 93. Wang JF, Shao L, Sun X, Young LT, Glutathione S-transferase is a novel target for mood stabilizing drugs in primary cultured neurons. *J Neurochem* 2004; 88: 1477–1484.
 94. Wang L, Liu Y, Li S, Long ZY, Wu YM, Wnt signaling pathway participates in valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8 (1): 578–585.
 95. Wang Z, Leng Y, Tsai LK, Leeds P, Chuang DM, Valproic acid attenuates blood-brain barrier disruption in a rat model of transient focal cerebral ischemia: the roles of HDAC and MMP-9 inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2011; 31: 52–57.
 96. Wang Z, Tsai L, Munasinghe J, Leng Y, Bame Fessler E, Chibane F *et al.*, Chronic Valproate Treatment Enhances Post-ischemic Angiogenesis and Promotes Functional Recovery in a Rat Model of Ischemic Stroke. *Stroke* 2012; 43 (9): 2430–2436.
 97. Wang Z, Xu L, Zhu X, Cui W, Sun Y, Nishijo H *et al.*, Demethylation of specific Wnt/ β -catenin pathway genes and its upregulation in rat brain induced by prenatal valproate exposure. *Anat Rec (Hoboken).* 2010; 293 (11): 1947–53.
 98. Wordliczek J, Zajaczkowska R, Dobrogowski J, Farmakologiczne leczenie bólu neuropatycznego. *Polski Przegląd Neurologiczny* 2011; 7 (1): 39–48.
 99. Wu X, Chen PS, Dallas S, Wilson B, Block ML, Wang CC *et al.*, Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2008; 11: 1123–1134.
 100. Ximenes JC, de Oliveira Gonçalves D, Siqueira RM, Neves KR, Santos Cerqueira G, Correia AO *et al.*, Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2013; 386 (7): 575–87.
 101. Ximenes JC., Verde ECL, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, de Barros Viana GS, Valproic Acid, a Drug with Multiple Molecular Targets Related to Its Potential Neuroprotective Action. *Neuroscience & Medicine* 2012; 3: 107–123.
 102. Xuan A, Long D, Lic J, Ji W, Hong L, Zhang M *et al.*, Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia in rats. *Life Sciences* 2012; 90: 463–468.
 103. Zhang C, Zhu J, Zhang J, Lia H, Zhao Z, Liao Y *et al.*, Neuroprotective and anti-apoptotic effects of valproic acid on adult rat cerebral cortex through ERK and Akt signaling pathway AT acute phase of traumatic brain injury. *Brain Research* 2014; 1555: 1–9.
 104. Zhang Z, Qin X, Tong N, Zhao X, Gong Y, Shi Y *et al.*, Valproic acid-mediated neuroprotection in retinal ischemia injury via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation. *Exp Eye Res.* 2012; Jan 94 (1): 98–108.
 105. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C *et al.*, VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000; 106: 829–38.