



Perkembangan Anak Tikus (F1) Asal Induk Penerima Asam Valproat sebagai Model Diabetes Mellitus

(Development of Rats Filial (F1) Born From Valproic Acid-Treated Female Rats as a Diabetic Mellitus Model)

HADI SUNARYO^{1,2*}, WASMEN MANALU³, ADI WINARTO³, BAMBANG KIRANADI³

¹Program Studi Ilmu Faal dan Khasiat Obat, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

²Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. Hamka, Jln. Delima II Klender, Jakarta Timur 13460.

³Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680.

Diterima 24 April 2014, Disetujui 14 Agustus 2014

Abstrak: Untuk melakukan penelitian dan pengembangan obat antidiabetes diperlukan hewan model yang sesuai dengan kondisi diabetes. Tujuan penelitian ini ialah untuk mengembangkan model diabetes yang sesuai kondisi patofisiologi diabetes. Induk tikus yang telah bunting dibagi dalam 2 kelompok, satu kelompok diberi asam valproat 250 mg/kg bb per oral pada kebuntingan hari ke-9 dan kelompok lain sebagai kontrol. Pada umur anak tikus (F1) 8, 16 dan 24 minggu diambil sampel darah untuk dianalisis kadar glukosa, kadar insulin dan trigliserida. Pada waktu yang sama, jaringan pankreas diambil dalam kondisi teranestesi untuk dilakukan immunohistokimia. Hasil pengukuran kadar glukosa dan histologi pada tikus (F1) umur 8 minggu belum menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dibanding kontrol normal. Pada tikus (F1) umur 16 dan 24 minggu kadar glukosa darah dan konsentrasi insulin serum menunjukkan peningkatan yang signifikan, sedangkan sel yang positif insulin menurun. Dapat diambil kesimpulan pemberian asam valproat pada tikus pada hari ke-9 kebuntingan dapat menghambat fungsi sel β pankreas. Dengan demikian dapat disimpulkan tikus (F1) yang induknya diberi asam valproat pada masa kebuntingan dapat menyebabkan sindrom metabolik yang dimulai pada umur 16 minggu dan berlanjut sampai usia tua.

Kata kunci: asam valproat, sel- β , diabetes mellitus.

Abstract: To do research and development of antidiabetic drugs, animal models of diabetes in accordance with the conditions is required. The aim of this research was to develop a diabetic model that is fit to the pathophysiology of diabetic condition. The pregnant female rats were divided into 2 groups, one group was orally treated by a single dose of valproic acid (250 mg/kg bw) on day 9th of pregnancy and the other was a control. At the ages of 8, 16 and 24 weeks the blood samples of litters (F1) were taken for glucose, insulin and triglyceride determination. At the same time, pancreatic tissues were collected under deep anesthetic condition for immunohistological study. Results of blood glucose concentrations and histological finding of litters (F1) indicated that at the age of 8 weeks both had showed a similar pattern as compared to control. At the ages of 16 and 24 weeks, blood glucose and insulin level showed a significant increase, while positive insulin cells slightly decreased in number. It can be concluded that treating rat with valproic acid on days 9 of gestation will inhibit pancreatic β cells function. There is an indication that F1 of valproic acid treated pregnant mother start showing a metabolic syndrome at 16 weeks and being pronounce by aging.

Keywords: valproic acid, β -cell, diabetes mellitus.

* Penulis korespondensi, Hp. 085810627215
e-mail: hadi_itb@yahoo.com



PENDAHULUAN

KEJADIAN diabetes mellitus pada saat ini banyak dimulai pada usia dewasa dan biasanya ada faktor genetik yang memperkuat. Kondisi ini diawali dengan resistensi insulin yang kemudian akan diikuti oleh penurunan jumlah sel β sehingga sekresi insulin tidak dapat memenuhi kebutuhan⁽¹⁾. Meskipun upaya penelitian dalam satu dekade dilakukan intensif, dasar genetik dalam peristiwa patogenesis diabetes masih kurang dipahami. Diabetes adalah sindrom multigenik kompleks terutama karena disfungsi sel β pankreas yang berhubungan dengan tingkat resistensi insulin⁽²⁾.

Hewan model diabetes ada 2 kategori yaitu tipe diabetes karena genetika dan tipe diabetes karena dapatan yang diperoleh dengan induksi diabetagon seperti aloksan ataupun streptozotisin⁽³⁾. Untuk model diabetes yang diperoleh dari seleksi perkawinan dan rekayasa genetika tingkat keberhasilannya kurang dari 50% dan memerlukan waktu lama serta biaya yang sangat mahal. Sementara itu, untuk model yang diperoleh dengan induksi diabetagon, kondisi kerusakan sel pada pankreas ada yang bersifat reversibel dan ada yang permanen. Tetapi kerusakan yang permanen menimbulkan kerusakan sel pankreas yang sangat parah. Kondisi ini tidak dapat menggambarkan kejadian diabetes yang diinginkan, karena tidak dihasilkan lagi insulin atau jumlahnya sangat kurang yang lebih identik dengan diabetes tipe 1⁽⁴⁾.

Kerusakan sel β pankreas dapat terjadi sejak dimulai organogenesis di rahim, bersamaan dengan perkembangan *neuronal tube* sebagai awal perkembangan sel saraf⁽⁵⁾. Tahapan permulaan organogenesis pankreas bergantung pada interaksi pensinyalan dengan jaringan di sekelilingnya. Inisiasi pertumbuhan organ dan akibat ekspresi marker molekuler pada tahap awal pertumbuhan pankreas selama embriogenesis tikus dari embrionik hari ke-8,5 sampai hari ke-14,5. Perkembangan saluran cerna ventral, termasuk liver dan pankreas ventral, bergantung pada ekspresi endodermal *homeobox gene* Hhex yang mengarahkan proliferasi endoderm ventral dan kontrol transisi morfogenetik sel endodermal epitelial⁽⁶⁾.

Pada masa embrional, asam valproat mempunyai kemampuan untuk menghambat deasetilasi histon (inhibitor HDAC). Asam valproat menyebabkan hiperasetilasi histon pada sel kultur dan *in vivo*. Secara *in vitro*, asam valproat menghambat aktivitas HDAC dengan mengikat pusat katalisis dari HDACs dan akibatnya asam valproat menekan differensiasi sel⁽⁷⁾. Pada *stem cell* pemberian asam valproat di hari ke-9 terjadi hambatan pada pengarah differensiasi sel pankreas⁽⁸⁾.

Melihat kronologi pembentukan organ pankreas selama pertumbuhan embrio, maka dapat diprediksi bahwa gangguan pertumbuhan pankreas pada tikus akan menghasilkan kerusakan pada sel β tikus⁽⁹⁾. Oleh karena itu, perlu diinvestigasi kemungkinan pembuatan tikus diabetes dengan menghambat perkembangan sel atau organ pada tahap embrio.

Penelitian ini dirancang untuk mempelajari pengaruh pemberian obat atau senyawa kimia yang dapat mempengaruhi organogenesis, terutama pada perkembangan sel β pankreas. Obat yang dipakai adalah asam valproat yang memiliki mekanisme kerja menghambat deasetilasi histon⁽⁷⁾. Ketika terjadi gangguan perkembangan sel β pankreas maka diharapkan akan menjadi hewan model yang dapat menggambarkan patogenesis diabetes mellitus yang mirip dengan kejadian di manusia.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan hewan model yang sesuai dengan patofisiologi diabetes dan mampu mengekspresikan gejala klinis diabetes. Dengan pemberian asam valproat pada tikus bunting hari ke-9, diharapkan akan dihasilkan anak tikus (F1) yang mendekati kondisi diabetes.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Tikus yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* L) galur Sparague-Dawley betina usia 3-4 bulan dan bobot badan 200-300 g sebagai indukan. Bahan induksi adalah asam valproat diberikan pada induk bunting dengan dosis tunggal 250 mg/kg BB per oral pada umur kebuntingan 9 hari. Anak yang di dapat disusukan ke induk hingga masa sapih. Selanjutnya anakan dipisah diberi pakan standar dan air minum ad libitum.

Tahap persiapan untuk kebuntingan induk dengan program *time mating* menyatukan seekor tikus betina estrus dan jantan dalam satu kandang. Hari pertama kebuntingan ditetapkan bila *vaginal plug* terdeteksi keberadaannya pada keesokan harinya.

Induk bunting yang telah diberi asam valproat dipelihara sampai melahirkan dan membesarkan anaknya hingga lepas sapih. Anak yang telah terpisah dari induknya dibesarkan dan dilakukan pengambilan sampel darah dan jaringan pada umur 8, 16 dan 24 minggu untuk pengukuran kadar glukosa, kadar insulin dan kadar trigliserida. Jaringan pankreas digunakan untuk pembuatan sediaan histomorfologi guna melihat perubahan sel endokrin pankreas yaitu sel β dan sel α . Pengambilan sampel darah dan jaringan dilakukan dalam kondisi teranestesi. Jumlah Tikus (F1) untuk kelompok uji 12 ekor.

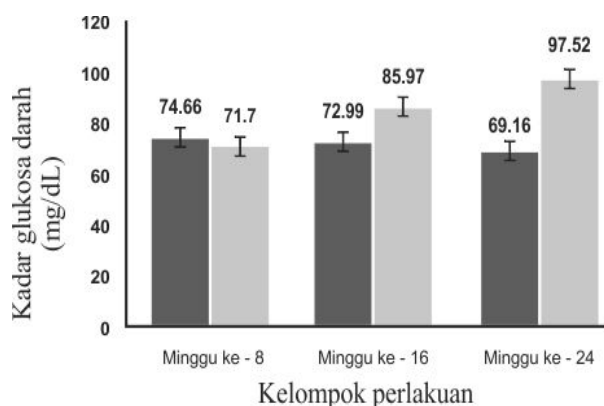
Pengukuran kadar glukosa menggunakan metode



tes kolorimetri enzimatis yaitu *Glucose Kits Based/ GOD-PAP*. Kadar insulin darah pada serum diukur dengan metode ELISA menggunakan *Ultra Sensitive Rat Insulin Immunoassay Kit*. Kadar trigliserida darah diukur menggunakan metode tes kolorimetri enzimatis GPO-PAP dengan *Lipid Clearing Factor (LCF)*. Pewarnaan jaringan pankreas secara immunohistokimia menggunakan Ab anti insulin dan Ab anti glukagon, kemudian divisualisasikan dengan diamino benzin (DAB).

HASIL DAN PEMBAHASAN

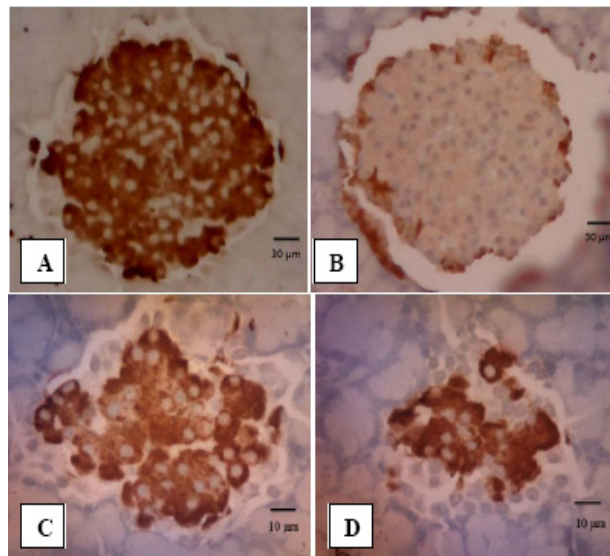
Hasil pengamatan kadar glukosa darah tikus F1 umur 8 minggu dari induk yang diberi asam valproat pada kebuntingan hari ke-9 belum menunjukkan adanya peningkatan kadar glukosa dibandingkan kontrol normal ($p > 0,05$). Pada tikus F1 umur 16 minggu ada peningkatan kadar glukosa darah dibandingkan kelompok kontrol normal ($p < 0,05$). Pada tikus F1 umur 24 minggu ada peningkatan kadar glukosa darah dibandingkan kelompok kontrol normal ($p < 0,05$) (Gambar 1).



Gambar 1. Rata-rata kadar glukosa darah tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat 250 mg/kg bb per oral pada minggu ke-8 ($p > 0,05$), ke-16 ($p < 0,05$) dan ke-24 ($p < 0,05$). ■: kontrol normal, □: tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat.

Pengamatan pulau langerhans pankreas tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat pada umur 8 minggu belum menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dibanding kontrol normal dilihat dari hasil reaktivitas imunnya (Gambar 2A dan 2C). Sel-sel yang positif insulin dengan persentase warna cokelat yang hampir sama menunjukkan gambaran sel β yang masih mampu menghasilkan insulin pada usia tikus F1 umur 8 minggu dengan kemampuan yang sama.

Tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat pada umur 8 minggu dilihat dari parameter kadar glukosa dan histologi pankreas belum menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan



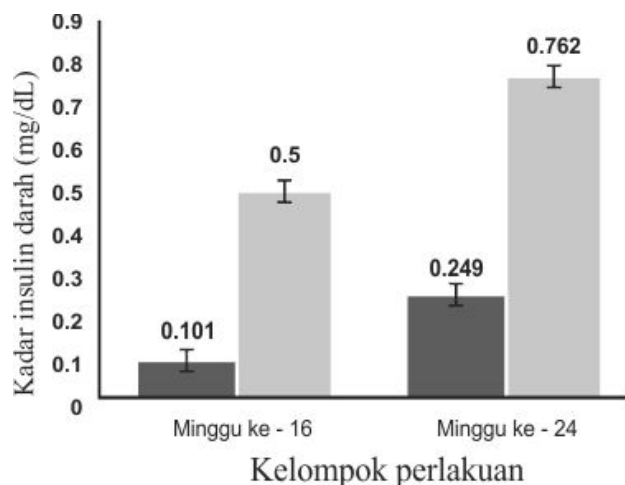
Gambar 2. Hasil pewarnaan immunohistokimia sel endokrin pankreas tikus (F1). A: Sel positif insulin jumlahnya banyak tersebar di tengah secara merata pada kontrol normal. B: Sel positif glukagon jumlahnya sedikit berada di tepi pada kontrol normal. C: Sel endokrin pankreas tikus F1 yang induknya diberi asam valproat pada pengamatan umur 8 minggu, populasi sel yang positif insulin masih dominan disebagian besar pulau Langerhans. D: Sel endokrin pankreas tikus F1 yang induknya diberi asam valproat pada pengamatan umur 16 minggu, terjadi pengurangan populasi sel yang positif insulin.

kontrol normal. Kondisi fisiologi antara tikus F1 yang induknya diberi asam valproat pada masa kehamilan dengan tikus kontrol normal juga menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna jika dilihat kadar glukosa darah. Kondisi ini menunjukkan sel β pankreas masih cukup secara jumlah dan kemampuan menghasilkan insulin sehingga kadar glukosa darah masih dapat terkontrol (Gambar 2C).

Hasil pengukuran kadar insulin darah tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat pada minggu ke-16 ($p < 0,05$) dan 24 ($p < 0,05$) menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi insulin dalam darah dibanding kontrol normal (Gambar 3). Kondisi ini menunjukkan adanya hiperinsulinemia yang terjadi karena adanya usaha mengontrol kenaikan kadar glukosa darah (Gambar 1). Hasil ini sejalan dengan perubahan histomorfologi sel β yang menunjukkan penurunan immuno reaktivitas sel β terhadap antibodi anti insulin. Kondisi demikian menggambarkan bahwa sel β berusaha melepas hormon insulin ke sirkulasi darah sehingga kadar insulin yang tertinggal dalam sel menurun (Gambar 2D). Peningkatan kadar insulin dalam darah sangat mungkin terkait dengan upaya menjaga nilai kadar glukosa.

Glukosa akan masuk ke dalam sel β pankreas melalui tranporter glukosa (GLUT-2). Glukosa akan mengalami metabolisme membentuk ATP. ATP akan menyebabkan menutupnya kanal ion K^+





Gambar 3. Rata-rata kadar insulin tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat 250 mg/kg bb per oral pada minggu ke-16 ($p < 0,05$) dan ke-24 ($p < 0,05$), $n = 12$ ekor. ■: kontrol normal, □: tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat.

sehingga terjadi depolarisasi pankreas, yang diikuti masuknya Ca^{2+} ke dalam sel β sehingga menyebabkan terjadinya sekresi insulin dari sel β dan menyebabkan meningkatnya konsentrasi insulin pada darah.

Penyerapan glukosa ke dalam sel dimulai dari ditangkapnya insulin oleh reseptor pada membran sel, kemudian kompleks insulin-reseptor akan mengaktifkan ATP-ase membran sehingga memecah ATP menjadi ADP. Kompleks insulin-reseptor ini akan memberi signal untuk mengaktifkan tranporter glukosa (GLUT-4) sehingga siap untuk menerima dan memindahkan glukosa dari luar ke dalam sel⁽¹⁰⁾. Pada pengamatan pulau langerhans tikus normal, hasil reaktivitas imun sel yang positif insulin menggambarkan sebagian besar sel pulau langerhans pankreas tikus positif insulin (Gambar 2A). Dari hasil reaktivitas imunnya, terlihat bahwa sel yang positif glukagon tampak berderet di bagian tepi pulau Langerhans pankreas (Gambar 2B).

Pewarnaan pada pulau langerhans pankreas tikus F1 umur 16 minggu dari induk yang diberi asam valproat, menunjukkan hasil reaktivitas imun terhadap anti insulin yang menurun. Hal ini terkait dengan ditemukannya sel endokrin dengan warna coklat pudar yang dibandingkan dengan kontrol normal (Gambar 2D). Lebih dari itu populasi sel yang positif terhadap anti insulin yang kuat tidak sebanyak yang ditemukan pada minggu sebelumnya.

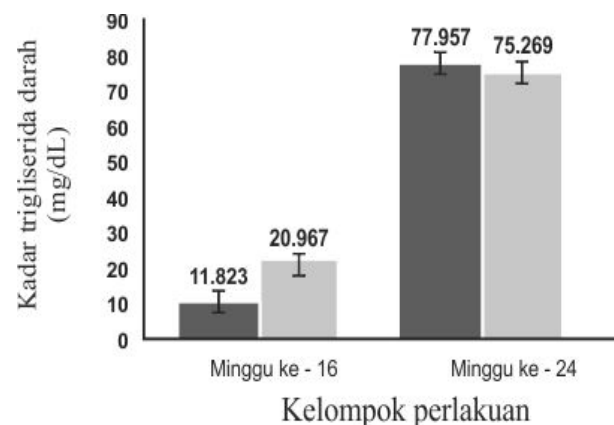
Hasil pengamatan terhadap reaktivitas imun anti glukagon menunjukkan gambaran yang tidak berbeda dari kontrol. Gambaran imunohistokimia sel pankreas yang menghasilkan glukagon menunjukkan bahwa pada kelompok tikus F1 yang induknya diberi asam valproat, sel yang menghasilkan glukagon hanya terdapat pada bagian tepi saja sama dengan

kontrol normal⁽¹³⁾. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok tikus F1 yang induknya diberi asam valproat kerusakan sel pulau langerhans pankreas terjadi pada sel β penghasil insulin. Ada kemungkinan perubahan aktivitas HDAC dapat mempengaruhi faktor transkripsi atau modifikasi histon ekspresi gen yang menginduksi pre-insulin dalam sekresi insulin⁽¹⁴⁾. Asam valproat mempengaruhi ekspresi gen *cyp3a4* dan gen *mdr1*⁽¹⁵⁾.

Penurunan populasi sel endokrin yang menghasilkan insulin pada tikus F1 umur 16 minggu dapat terjadi karena adanya dua kemungkinan, pertama karena sel-sel β pulau langerhans pankreas tikus sudah tidak mampu menghasilkan insulin atau karena adanya peningkatan sekresi insulin ke darah untuk mengontrol kadar gula darah yang meningkat. Kedua hal ini bisa terjadi bersamaan sehingga kerusakan sel β pankreas akan semakin parah. Hal ini mengindikasikan bahwa tikus F1 mengalami perubahan yang mendekati kondisi kejadian diabetes. Hasil evaluasi parameter glukosa darah, kadar insulin dan gambaran histologis sel endokrin pada umur 16 dan 24 minggu mengindikasikan bahwa metabolisme glukosa tikus F1 mulai terganggu pada umur 16 minggu (dewasa).

Kondisi inilah yang biasanya terjadi pada penderita diabetes tipe 2 yang proses kerusakan sel β pankreas awalnya terjadi perlahan, tetapi terus berlangsung sehingga pada saat usia tertentu sel β pankreasnya sudah tidak mampu lagi mensintesis dan mensekresikan hormon insulin.

Pengamatan kadar trigliserida darah tikus F1 pada umur 16 minggu dari induk yang diberi asam valproat menunjukkan adanya peningkatan. Tetapi pada umur 24 minggu tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dibanding kelompok kontrol normal (Gambar 4).



Gambar 3. Rata-rata kadar trigliserida darah tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat 250 mg/kg bb per oral pada minggu ke-16 ($p < 0,05$) dan ke-24 ($p < 0,05$), $n = 12$ ekor. ■: kontrol normal, □: tikus F1 dari induk yang diberi asam valproat.

Hipertrigliseridemia merupakan salah satu faktor risiko terjadinya sindrom metabolik^(11,12). Peningkatan kadar trigliserida darah pada tikus F1 umur 16 minggu dapat terjadi karena tidak efektifnya kerja insulin. Salah satu efek insulin adalah untuk merangsang pembentukan lipoprotein lipase (LPL), suatu enzim yang melekat ke sel endotel kapiler di otot dan jaringan adiposa. Insulin seharusnya merangsang sel adiposa untuk mensintesis dan menyekresikan LPL, yang menghidrolisis trigliserida dalam kilomikron VLDL. Pada kondisi hewan percobaan ini, kadar insulin darah tinggi tetapi kadar glukosa darah tetap meningkat. Hal ini menunjukkan kemungkinan terjadinya resistensi insulin. Sehingga efek insulin dalam merangsang pembentukan LPL juga menurun, yang menyebabkan hidrolisis trigliserida dalam kilomikron dan VLDL berkurang dan menimbulkan hipertrigliseridemia⁽¹⁾.

Asam valproat akan mempengaruhi *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPARs). PPARs adalah ligan faktor transkripsi aktivasi yang memodulasi target ekspresi gen dalam ligan endogen dan eksogen. Mekanismenya melibatkan *receptor-dependent*, dengan pendekatan *gene silencing*⁽¹⁶⁾. PPAR α dan PPAR γ tidak spesifik untuk derivat asam valproat, PPAR δ spesifik untuk teratogenik derivat asam valproat, tetapi tidak ada ikatan langsung antara asam valproat dan PPAR δ ⁽¹⁷⁾. Hubungan struktur-aktivitas menunjukkan bahwa induksi asam valproat menyebabkan gangguan perkembangan embrio secara *in vivo*. Sifat teratogenik asam valproat mungkin terkait dengan program seluler yang kompleks dan regulasi berbagai kegiatan gen. PPAR δ memainkan peranan utama dalam mekanisme aksi respons seluler terhadap asam valproat. PPAR δ yang diaktifkan secara selektif oleh asam valproat merupakan faktor pembatas dalam pengendalian diferensiasi sel⁽¹⁸⁾.

SIMPULAN

Anak tikus (F1) dari induk yang menerima asam valproat dosis 250 mg/kg bb memperlihatkan gejala klinis diabetes yang ditunjukkan dengan meningkatnya kadar glukosa darah, insulin darah, dan trigliserida darah pada pengamatan umur 16 dan 24 minggu. Pada umur 16 minggu mulai terjadi penurunan populasi sel β pankreas yang menghasilkan insulin. Sehingga dapat dikatakan berpotensi berkembang menjadi tikus diabetes.

DAFTAR PUSTAKA

- Marks DB, Marks AD, Smith CM. Basic medical biochemistry: A clinical approach. William and Wilkins; 2000. 381-578.
- Gray SG, De Meyts P. Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005.21:416-33. doi: 10.1002/dmrr.559.
- Nugroho AE. Animal models of diabetes mellitus: Pathology and mechanism of some diabetogenics, *Biodiversitas*. 2006.7(4):378-82.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001.50:536-46.
- Kuwabara T, Kagalwala M, Akizuki S, Warashina M, Sanosaka T, Nakashima K, Gage FH, Asashima M. De novo insulin biosynthesis from newborn cells in adult hippocampus and pancreas. *NSC IPC*. 2009.
- Jorgensen MC, Ahnfelt RJ, Hald J, Madsen OD, Serup P, Hecksher-Sorensen J. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocrine Reviews*. The Endocrine Society; 2007.28(6):685-705.
- Christensen DP, Dahllof M, Lundh M, Rasmussen DN, Nielsen MD, Billestrup N, Grunnet LG, Maundrup PT. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Mol Med*. 2011. 17(5-6):378-90.
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Coco FL, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO Journal*. 2001. 20(24): 6969-78.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994.
- Lienhard GE, Slout JW, James DE, Mueckler M. How cells absorb glucose. *Journal of Scientific American*. 2002.3:235-8.
- Holt RIG, Hanley A. *Essential endocrinology and diabetes*. 5th Ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2007. 216-63.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanism linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *nature*. 2006. 444(14):840-6.
- Riedel MJ, Asadi A, Wang R, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ. Immunohistochemical characterization of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. *Diabetologia*. 2012. 55:372-81.
- Larsen LM, Tonnesen SG, Stirling RJ, Jorgensen S, Mascagni P, Dinarcello CA, *et al*. Inhibition of histone deacetylases prevents cytokine-induced toxicity in beta cells. *Diabetologia*. 2007. 50:779-89.
- Cervený L, Svecova L, Azenbacherova E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, *et al*. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007. 35(7):1033-41.
- Peraza MA, Burdick AD, Marin HE, Gonzales FJ, Peters JM. The toxicology of ligands for peroxisome



284 SUNARYO *ET AL.*

Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia

- proliferator-activated receptors (PPAR). *Toxicological Sciences*. 2006. 90(2):269–95.
17. Lampen A, Carlberg C, Nau H. Peroxisome proliferator-activated receptor δ is a specific sensor for teratogenic valproic acid derivatives. *European Journal of Pharmacology*. 2001. 431:25-33.
 18. Werling U, Siehler S, Litfin M, Nau H, Gottlicher M. Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ by valproic acid and its teratogenic derivatives. *Mol Pharmacol*. 2001. 59:1269-76.

