

# Utjecaj valproata na postimplantacijski zametak u ex vivo modelu razvoja štakora

---

Plazibat, Milvija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:949579>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**MILVIJA PLAZIBAT**

**Utjecaj valproata na postimplantacijski  
zametak u *ex vivo* modelu razvoja štakora**

**DOKTORSKI RAD**



**Zagreb, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**MILVIJA PLAZIBAT**

**Utjecaj valproata na postimplantacijski  
zametak u *ex vivo* modelu razvoja štakora**

**DOKTORSKI RAD**



**Zagreb, 2020.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, Istraživačka jedinica Biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja te uz potporu projekta „Reproduktivna i regenerativna medicina – istraživanja novih platformi i potencijala” kojeg sufinancira Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj, u okviru Operativnog programa Konkurentnost i kohezija, pod brojem ugovora KK.01.1.1.01.0008.

Voditelj rada (mentor): doc. dr. sc. Ana Katušić Bojanac

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Ani Katušić Bojanac, na izdvojenom vremenu i nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.*

*Prof. dr. sc. Bulić-Jakuš Floriani veliko hvala na zainteresiranosti i nesebičnom dijeljenju znanja tijekom višegodišnjeg rada na disertaciji.*

*Kolegama i suradnicima Zavoda za medicinsku biologiju i Zavoda za histologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dugujem zahvalnost na suradnji i pomoći pri izradi ovoga rada.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima, posebno mojoj djeci, na podršci i razumijevanju.*

*Rad posvećujem mojim roditeljima.*

## POPIS OZNAKA I KRATICA

A - površina elipse (engl. *area*)

BSA - (engl. *bovine serum albumin*)

DAB - 3,3'-diaminobenzidin

DMSO - dimetil-sulfoksid

DNMT - DNA metiltransferaza

EC - embrionalni karcinom (engl. *embryonal carcinoma*)

ES - embrionalna matična stanica (engl. *embryonic stem cell*)

FTIR spektroskopija - (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GFAP - glijalni kiseli fibrilarni protein

HAT - histonska acetilaza

HDAC/HDACi - histonska deacetilaza/inhibitor histonske deacetilaze

HE - hemalaun eozin

HESC - humana embrionalna matična stanica

H3ac - acetilirani histon H3

H3k9ac - acetilacija lizina 9 histona H3

mM - milimol

NF - neurofilament

PBS - (engl. *phosphate buffered saline*)

PCNA - nuklearni antigen proliferirajućih stanica

TSA - trihostatin A

VPA - valproat

Vv - volumenska gustoća

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD I SVRHA RADA</b>	<b>1</b>
1.1.	RAZVOJ ZAMETKA I POSTELJICE U SISAVACA.....	2
1.2.	ANIMALNI MODELI U ISTRAŽIVANJU TERATOGENA.....	5
1.2.1	Animalni <i>ex vivo</i> modeli.....	7
1.3.	REGULACIJA STANIČNOG CIKLUSA – ULOGA RB I PCNA PROTEINA.....	10
1.4.	EPIGENETIČKI MEHANIZMI .....	13
1.4.1	Metilacija DNA.....	15
1.4.2	Modifikacije histona.....	19
1.4.3	RNA interferencija.....	23
1.5.	EPIGENETIČKI LIJEKOVI.....	24
1.5.1.	Valproat.....	26
1.6.	SVRHA RADA.....	32
<b>2.</b>	<b>HIPOTEZA</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>CILJEVI RADA</b>	<b>33</b>
3.1.	OPĆI CILJ.....	33
3.2.	SPECIFIČNI CILJEVI.....	33
<b>4.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	<b>34</b>
4.1.	EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE.....	34
4.2.	EKSPERIMENTI <i>EX VIVO</i> .....	34
4.2.1.	Izolacija zametaka, zametnih štitova i ekto-placentalnih konusa.....	34
4.2.2.	Kultivacija eksplantata u <i>in vitro</i> modelu kulture organa	35
4.2.3.	Osnovni medij za kultivaciju.....	36
4.2.4.	Tretman s valproatom.....	37
4.2.5.	Analiza preživljenja eksplantata.....	37
4.2.6.	Mjerenje rasta eksplantata.....	37
4.3.	FIKSACIJA I KLASIČNA HISTOLOŠKA ANALIZA.....	38
4.4.	IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA.....	39
4.4.1.	Primarna protutijela.....	39

4.4.2.	Imunohistokemijska metoda.....	40
4.5.	ODREĐIVANJE PROLIFERACIJSKOG INDEKSA.....	42
4.6.	STEREOLOŠKA METODA ODREĐIVANJA VOLUMENSKJE GUSTOĆE .....	42
4.7.	WESTERN BLOTTING ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA.....	43
4.7.1.	Homogenizacija tkiva.....	43
4.7.2.	Mjerenje koncentracije proteina.....	44
4.7.3.	Semikvantitativna Western blotting metoda.....	45
4.8.	ANALIZA METILACIJE DNA PIROSEKVENCIJANJEM	47
4.8.1.	Homogenizacija tkiva i mjerenje koncentracije DNA.....	47
4.8.2.	Bisulfitna konverzija genomske DNA.....	48
4.8.3.	Pirosekvenciranje.....	49
4.9.	STATISTIČKA ANALIZA.....	50
<b>5.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>51</b>
5.1.	RAZVOJ ŠTAKORSKIH ZAMETAKA TRETIRANIH VALPROATOM <i>IN VITRO</i> .....	51
5.1.1.	Preživljenje štakorskih zametaka u kulturi <i>in vitro</i> s valproatom.....	52
5.1.2.	Rast štakorskih zametaka u kulturi <i>in vitro</i> s valproatom	53
5.1.3.	Diferencijacija štakorskih zametaka u dvotjednoj kulturi <i>in vitro</i> s valproatom.....	54
5.1.4.	Incidencija diferenciranih tkiva u kulturi <i>in vitro</i> s valproatom.....	62
5.1.5.	Ekspresija markera diferencijacije zametnih listića nakon <i>in vitro</i> kulture svalproatom.....	65
5.1.6.	Proliferacija stanica u štakorskim zamecima nakon <i>in vitro</i> kulture s valproatom.....	71
5.1.7.	Ekspresija Rb proteina u štakorskim zamecima nakon <i>in vitro</i> kulture s valproatom.....	74
5.1.8.	Apoptoza u štakorskim zamecima u trodnevnoj kulturi <i>in vitro</i> s valproatom.....	77
5.2.	EPIGENETIČKE PROMJENE U ŠTAKORSKIM ZAMECIMA U <i>IN VITRO</i> KULTURI S VALPROATOM.....	81
5.2.1.	Imunohistokemijsko određivanje acetiliranog histona u kultiviranim zamecima.....	81



5.2.2.	Globalna acetilacija histona u štakorskim zamecima nakon kulture <i>in vitro</i> s valproatom.....	83
5.2.3.	Globalna metilacija u štakorskim zamecima nakon kulture <i>in vitro</i> s valproatom.....	85
5.3	RAZVOJ EKTOPLACENTALNIH KONUSA TRETIRANIH VALPROATOM IN VITRO	86
5.3.1.	Preživljenje ektoplacentalnih konusa u kulturi <i>in vitro</i> s valproatom.....	86
5.3.2.	Rast ektoplacentalnih konusa u kulturi <i>in vitro</i> s valproatom.....	87
5.3.3.	Diferencijacija ektoplacentalnih konusa u kulturi <i>in vitro</i> s valproatom.....	87
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK</b>	<b>102</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>103</b>
<b>10.</b>	<b>POPIS LITERATURE</b>	<b>104</b>
<b>11.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>136</b>

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Reprodukcija i prenatalni razvoj sisavaca od temeljnog su značaja za buduće zdravlje jedinke, pa se postavila hipoteza o razvojnom porijeklu zdravlja i bolesti. U okviru te hipoteze sagledava se i istražuje kako različiti vanjski faktori kojima je zametak izložen u trudnoći dovode do podložnosti različitim bolestima odrasle jedinke, kao što npr. prenatalna hipoksija vodi kardiovaskularnim poremećajima (1-3). Naime, u razvoju jedinki, a to se posebno odnosi na sisavce, u prenatalnom i ranom postnatalnom periodu postoji niz „kritičnih perioda“, od gastrulacije do organogeneze. Ta razdoblja su izuzetno osjetljiva na vanjske čimbenike kao što su temperatura, lijekovi, virusi, kemijske supstance koji mogu teratogeno djelovati, tj. poremetiti razvoj, što se u najgorim slučajevima iskazuje pojavom izrazitih kongenitalnih malformacija (4, 5).

Neće svaka supstanca djelovati teratogeno. Osim što je bitna i jačina molekularnog oštećenja kojim djeluje teratogen, veliku ulogu ima sposobnost majke da eliminira proteratogene u svrhu embrioprotekcije, kao i sposobnost samog embrija da detoksicira reaktivne molekularne međuprodukte, što se može očitovati i na staničnoj razini, budući da stanice imaju mehanizme popravka oštećenja na makromolekulama (6). Problem nastaje kad, npr. stanične makromolekule ireverzibilno vežu elektrofilne međuprodukte teratogenog djelovanja stvarajući s njima kovalentnu, stabilnu vezu. Na taj način dolazi do nepovratne oksidacije makromolekula (DNA, lipida i proteina), odnosno oksidacijskog stresa, što možemo označiti kao početak teratogeneze (6, 7).

U definiranju kritičnih perioda osjetljivosti na teratogene znanstvenici su se u posljednje vrijeme orijentirali na praćenje molekularnih mehanizama i puteva koji usklađeno orkestriraju razvojne procese, kao što su ukupni rast, proliferacija, apoptoza i diferencijacija. U prenatalnom razvoju oni predstavljaju dinamičke i mjerljive biološke parametre aktivno prisutne u zametku tijekom trudnoće i osjetljive na okolišne promjene.

Istraživanje razvojnih procesa poput rasta, diferencijacije i morfogeneze tijekom razvoja sisavaca i njihove regulacije vanjskim faktorima iz okoliša, koji mogu mijenjati

potrebnu usklađenu ekspresiju gena, daje nam uvid u mehanizme nastanka kongenitalnih malformacija (2, 8) ili čak tumorigeneze u kojoj su također poremećeni procesi kao što su proliferacija, apoptoza, diferencijacija i preživljenje stanica (9, 10). Usklađena ekspresija gena postiže se djelovanjem epigenetičkih mehanizama na molekularnoj razini, stoga je potrebno istraživati utjecaj supstanci, posebno onih sa teratogenim djelovanjem, na očuvanje epigenetički reguliranih procesa u razvoju.

## 1.1. RAZVOJ ZAMETKA I POSTELJICE U SISAVACA

Razvoj zametka počinje spajanjem jajne stanice i spermija, pri čemu nastaje zigota. Mitotičkom diobom zigote nastaju blastomere koje se dalje dijele te ovaj stadij nazivamo brazdanje. Do stupnja od četiri ili osam blastomera (morula), blastomere nemaju polarnost (ne postoji razlika u građi i/ili funkciji dijelova stanica). Nakon toga dolazi do procesa kompakcije, gdje se blastomere na površnim dijelovima čvrsto povezuju kadherinom dok se u unutrašnjosti komunikacija među stanicama odvija putem *gap junctions* (5). U slijedećoj fazi stvara se blastocista u koju ulazi tekućina, a blastomere koje su još uvijek u kontaktu s zonom pelucidom usmjeravaju se u trofoblast tj. liniju trofoblastnih (trofektodermalnih) stanica koje kasnije stvaraju placentu i embrionalne ovojnice. U unutrašnjem dijelu blastociste se organizira tzv. embrioblast ili embrionalni čvorić (engl. *inner cell mass*, ICM), od kojeg se stvaraju sva embrionalna tkiva (5). Nakon implantacije blastociste, u embrioblastu se razlikuju dva sloja stanica, gornji sloj epiblast (primitivni ektoderm) te donji hipoblast (primitivni endoderm) (5). U zametku čovjeka epiblast i hipoblast imaju oblik plosnatog diska, a u štakora, čiji je zametak cilindričnog oblika prsta rukavice (engl. *egg-cylinder*), zapravo dolazi do inverzije zametnih listića pa se tzv. zametni cilindar ili zametni štit štakora (prema Švajgeru kada se cilindar zareže, nalik je na štit) sastoji s unutarnje strane od epiblasta, a s vanjske od hipoblasta te je odvojen od ekstraembrionalnog dijela amnionom (11).

Epiblast (primitivni ektoderm) potom ulazi u proces gastrulacije, koji je najkritičniji period razvoja zametka obzirom na najveću osjetljivost zametka prema teratogenima. Morfogenetičkim gibanjem stanica iz epiblasta se razvijaju tri zametna

listića (definitivni ektoderm, mezoderm i endoderm) koji u štakora tvore tzv. zametni štiti. Gastrulacija štakorskog zametka započinje 9. dana, pojavljivanjem primitivne pruge u središnjem dijelu posteriornog epiblasta uz zadebljanje njena prednja kraja što odgovara 14. danu u čovjeka. Stanice epiblasta mijenjaju svoj oblik u oblik boce (engl. *bottle cells*) te aktivno migriraju i poniru duž primitivne pruge i smještaju se razmičući hipoblast da bi formirali još dva sloja (mezoderm i endoderm) (5). Iz hipoblasta konačno nastaje žumanjčana vreća. Stanice koje migriraju u unutrašnjost zametka na anteriornom kraju primitivne pruge postaju mezodermalne stanice koje su preteča tzv. prekordalne ploče tvoreći primitivni skelet zametka (5).

Kasnije, u organogenezi, međusobnim indukcijskim interakcijama triju zametnih listića (ektoderma, mezoderma i endoderma) nastaju tkiva i organi zametka (12). Primarnom indukcijom nastaje neuralna ploča, pa žlijeb i cijev, a ostale interakcije su sekundarne indukcijske interakcije. Od ektoderma se razvija koža i živčani sustav (13). Mezoderm je osnova za razvoj mišićnokoštanog, krvožilnog i urogenitalnog sustava, dok od endoderma nastaje probavni sustav i žlijezde sa unutarnjim izlučivanjem (14, 15).

Iz trofoblasta, paralelno s diferencijacijom zametnih listića, diferencira se placenta ili posteljica. Trofoblast se sastoji od muralnog i polarnog trofoblasta. U muralnom trofektodermu koji okružuje šupljinu blastocela dolazi do zaustavljanja proliferacije stanica koje se potom diferenciraju u primarne trofoblastične divovske stanice neposredno nakon implantacije. Polarni trofektoderm smješten do embrioblasta (embrionalnog čvorića) formira tzv. ektoplacentalni konus i invadira deciduu. Rubni i središnji dio ektoplacentalnog konusa se diferenciraju u (sekundarne) trofoblastične divovske stanice, odnosno spongiotrofoblast, a zatim taj cijeli sloj stanica tvori bazalni sloj (bazalnu zonu) (16). Korion, koji se nalazi na dijelu ektoplacentalnog konusa koji strši prema embrioblastu, stapa se s alantoidom nastalim iz posteriornog crijeva zametka i potom se diferencira u zonu labirinta. U endometriju, stanice strome se razvijaju u decidualne stanice tzv. procesom decidualizacije (stimulacijom apozicije blastociste, odnosno njenog pronalaska mjesta prihvatanja za endometriju i implantacije) i formiraju osnovnu strukturu decidualnog matriksa. Decidua brzo raste i popunjava lumen maternice, uzrokujući upalu, edeme, zagušenja i krvarenja. Fetalni dio pak sadrži zonu labirinta i bazalni dio. Također, uz

to postoje dvije različite membrane koje okružuju fetus, vani se nalazi žumanjčana vreća, a unutra amnion.

U gestaciji sisavaca nalazimo stoga dvije vrste posteljice, posteljica žumanjčane vreće i korioalantoična placenta. Žumanjčana vreća aktivno apsorbira hranjive tvari iz koriona i korionske šupljine, te ih transportira u zametak kroz cirkulaciju žumanjčane vreće i kao takva ima ulogu prolazne placente tijekom rane postimplantacijske faze prije uspostavljanja alantoične cirkulacije (17, 18). Kod većine sisavaca, uključujući čovjeka, posteljica žumanjčane vreće postaje vestigijalna nakon prvog tromjesečja. S druge strane, u štakora dolazi do inverzije žumanjčane vreće koja na kraju prekriva plod i doprinosi posebnim funkcijama kao posteljica žumanjčane vreće do okota. Korioalantoična placenta je glavna placenta kod sisavaca tijekom srednje do kasne gestacije, a nastaje iz endometrija majke i embrionalnog trofektoderma. Definitivna korioalantoična posteljica ima mnoštvo različitih oblika u raznim vrsta a kod čovjeka i glodavaca je diskoidalnog oblika (19). Nadalje, prema odnosu koji je uspostavljen između koriona i stijenke maternice čovjek i glodavac (štakor) imaju hemokorijalni tip posteljice (20, 21) što znači da je endotel fetalnih kapilara u korionskim resicama u indirektnom kontaktu s krvlju majke preko trofoblasta koji prekriva korionske resice.

Pretpostavka o mogućem utjecaju na razvoj, putem ometanja izmjene plinova i nutrijenata u posteljici između majke i fetusa, do u konačnici degenerativnih promjena kako umbilikalnih žila i samog fetusa bila je istraživana na glodavcima krajem prošlog stoljeća (22). U navedenoj studiji istraživao se teratogeni učinak valproata u trudnoći štakora datog jednokratno 13. dana. Nađeno je da valproat djeluje teratogeno kao inhibitor angiogeneze stvarajući vaskularne lezije i time reducirajući izmjenu hrane i plinova (23). Ovisno o koncentraciji pokazale su različit stupanj resorpcije, redukciju broja i smanjenje težine fetusa uz degenerativne promjene u smislu tromboze, angiektazije, nekrozu citotrofoblasta i supresiju proliferacije fetalnih kapilara (22).

Toksična koncentracija valproata, no ne i terapijska, izazvala je morfološke promjene tkiva placente, mikrovaskularnu degeneraciju citoplazme, atrofiju sinciciotrofoblasta, te nekrozu nekih mezenhimalnih stanica (24).

Istraživanje utjecaja raznih agensa koji mogu dovesti do komplikacija u trudnoći djelujući na placentu ujedno doprinose razumjevanju humanog razvoja (25). Model posteljice štakora je u istraživanjima utjecaja lijekova i kemijskih agenasa bio od velike vrijednosti jer postoje sličnosti u razvoju posteljice štakora i čovjeka (26). Ipak, postoje i razlike kao što su omjer embrionalnog i fetalnog perioda, tip implantacije, funkcija placente žumančane vreće, struktura placente i endokrina sinteza (27-29).

## 1.2. ANIMALNI MODELI U ISTRAŽIVANJU TERATOGENA

Animalni modeli embrionalnog razvoja koriste se ne samo za istraživanje normalnog razvoja nego o i svrhu istraživanja poremećenog razvoja uzrokovanih vanjskim utjecajima. Poremećaje u razvoju u formi kongenitalnih malformacija (30) izazivaju kemijske ili fizičke supstance koje nazivamo teratogeni (grč. teras, odnosno nakaznost) i nekoliko ih je definirano prema principima teratologije iz 60-ih godina prošlog stoljeća (31). Abnormalan razvoj humanog fetusa kao posljedica izlaganja teratogenu očituje se kao smrt, malformacije, usporavanje rasta ili funkcionalni poremećaj. Ti poremećaji uključuju neurološka oštećenja, poput mentalne retardacije, i imaju dugoročne učinke na kogniciju i ponašanje, koji se mogu pojaviti kasnije u djetinjstvu. Drugo načelo teratologije kaže da osjetljivost na teratogenezu varira prema razvojnom stadiju u vrijeme izlaganja, a treće načelo tvrdi da manifestacije abnormalnosti u razvoju ovise o koncentraciji i trajanju teratogene izloženosti. Oni ukazuju na to da nisu sve izloženosti koje se smatraju teratogenima cijelo vrijeme zapravo teratogene; vrijeme i koncentracija određene izloženosti tijekom trudnoće često određuju vrstu i opseg njegove teratogene potencije (32). U pokusima na eksperimentalnim životinjama dokazano je oko 1500 kemijskih i fizikalnih teratogenih čimbenika, od kojih je samo 40 potvrđeno u ljudi (33). U eksperimentalnoj teratologiji potvrđena je ovisnost o periodu intrauterinog razvoja i o primjenjenoj koncentraciji, te specifičan mehanizam teratogenog djelovanja, dok za humane malformacije još u potpunosti nije razjašnjen način utjecaja vanjskih okolišnih čimbenika (33). Različite kemikalije i lijekovi mogu djelovati teratogeno, primjerice retinoična kiselina (34, 35), talidomid (7, 36, 37), 5-azacitidin (38-40) ili fizikalni agensi poput hipertermije (4, 30), zračenja (41) ili potencijalnog teratogena – dijagnostičkog ultrazvuka (33).

U istraživanju teratogenog utjecaja na zametak koriste se niz godina razni modelni organizmi, kralješnjaci i beskralješnjaci (42). Primarni rezultati često se prvo dobivaju na jednostavnim modelnim organizmima kao što su vinska mušica - *Drosophila melanogaster* (43), oblič - *Caenorhabditis elegans* (44, 45), zebrasta ribica (*Danio rerio*) (46) i *Xenopus laevis* (47). Kompleksniji, no čovjeku ipak bliži modeli koji se danas naveliko koriste u *in vitro* i *in vivo* testiranjima teratogena su sisavci, od kojih su najrasprostranjeniji štakor i miš. Naime, zbog postojanja implantacije, u teratogenim istraživanjima u ovim modelima može se procijeniti postimplantacijski gubitak, embrionalna smrt, smanjena težina fetusa i vanjske promjene na fetusu. Također, omogućen je i pregled majke u vidu analize jajnika, maternice i placente. Moguće je analizirati i resorpciju te vanjski izgled fetusa, s pregledom hrskavičnog tkiva i koštanog sustava (48).

Štakor pripada porodici Muridae, reda glodavci (Rodentia) i od 19. stoljeća je zajedno s mišem cijenjeni modelni organizam za testiranje sigurnosti ksenobiotika kao što su lijekovi, aditivi za hranu i druge kemikalije (49). Štakori su izrazito plodni, odnosno imaju veliku veličinu legla, što je prednost za ispitivanje teratogenosti u različitim područjima laboratorijskih istraživanja (49). Gestacija u štakora obično traje 21–23 dana, a spolnu zrelost dosežu u dobi od 8-10 tjedana (50).

Štakorski zameci se koriste i u kulturi *in vitro* za istraživanje teratogenosti radi karakterizacije teratogenih svojstava kemikalija (51). Tako je u kulturama embrija štakora u dobi od 11 dana osmišljen sustav praćenja dismorfologije u razvoju (52) gdje se analizira postojanje embrionalnih struktura (kaudalne ekstenzije, broj somita, posteriorne i prednje neuralne cijevi, integritet srca i krvožilnog sustava, faringealnih lukova i morfologije lica (uključujući oko i optičke plakode) (52). Kao i miš, štakor je osjetljiv na lijekove koji narušavaju parturiciju (npr. nesteroidni protuupalni lijekovi u kasnoj trudnoći), a manje je osjetljiv od čovjeka što se tiče poremećaja fertiliteta (53).

Prema eksperimentalnim uvjetima istraživanja, modele možemo podjeliti na *in vivo* - odnosno praćenje razvoja unutar organizma majke (intrauterino) ili ekstrauterino (ektopično) u organizmu primatelja i *ex vivo* - izvan organizma majke.

### 1.2.1. Animalni *ex vivo* modeli

Eksperimenti u *ex vivo* uvjetima pokazali su se iznimno korisnima u istraživanju normalne i poremećene embriogeneze, te testiranju embriotoksičnosti lijekova u predkliničkim fazama istraživanja (54). Kako bi se ubrzao put do registracije lijeka i kliničke primjene, rade se prethodna istraživanja u animalnim *ex vivo* modelima, tj. van organizma majke, koja su brža, definiranija i reproducibilnija od *in vivo* modela jer je izbjegnuta majčin organizam sa mnogobrojnim interakcijama (55). *Ex vivo* istraživanja omogućuju praćenje različitih terminalnih mjerljivih utjecaja (engl. *endpoints*) u probiru embriotoksičnosti lijekova na staničnoj razini. U mjerljive parametre spadaju proliferacija, diferencijacija, rast, apoptoza, veličina i oblik dijelova udova, hondrogeneza, sinteza kolagena i razvoj drugih tkiva.

Za eksperimente *ex vivo* u istraživanjima embrionalnog razvoja koriste se kulture *in vitro*, koje mogu biti: stanične kao mišje embrionalne matične stanice (engl. *embryonic stem cells*, ES stanice), stanice embrionalnog karcinoma miša (engl. *embryonic carcinoma cells*, EC stanice), ljudske pluripotentne embrionalne matične stanice (engl. *human embryonic stem cells*, hESC), kulture organa ili kulture zametka. Kulture organa *ex vivo* tj. izvan organizma majke uključuju razne organotipične modele poput modela pupoljaka udova (2, 56) i koriste se za istraživanje teratogenosti u organogenezi. Prednost je *ex vivo* modela organa u kulturi što, za razliku od *in vivo* istraživanja, nije toliko skup, bolje je definiran i etički prihvatljiviji (56).

Kulture zametka *in vitro* obično se dijele na preimplantacijske (zigota-blastocista) i postimplantacijske.

Modeli kulture postimplantacijskih zametaka u upotrebi su više od osamdeset godina (56). Postimplantacijski zametak može se kultivirati sa ekstraembrionalnim ovojnicama, odnosno kao kultura cijelog zametka WEC (engl. *whole embryo culture*) ili kao kultura zametnog štita (zametka u užem smislu riječi koji se sastoji od triju zametnih listića bez ekstraembrionalnih struktura) (engl. *embryo-proper*) (57, 58).

Za *ex vivo* manipulacije u svrhu istraživanja embriotoksičnih i teratogenih faktora u fazi gastrulacije i danas se koriste WEC kulture (engl. *whole embryo*



*culture*). Ove kulture predstavljaju čitavi štakorski zameci stari 9,5 dana koji su izolirani iz uterusa i kultivirani s ekstraembrionalnim ovojnica do 3 dana u 100%-tnom štakorskom serumu u rotirajućim staklenim cilindričnim bocama za kulturu *in vitro*. Ovakav sustav omogućava odvijanje neurulacije, kraniofacijalne morfogeneze, somitogeneze tijekom 48 sati (57, 58). Iako zametak štakora, u modelu WEC kulture cijelog zametka, zadržava svoju morfologiju tijekom kultiviranja, istraživanja na ovom modelu limitirana su na samo dva dana kultiviranja zbog apsorbirajućih svojstava ovojnica (59, 60) i nastupa nekroze središnjeg živčanog sustava (54).

Zato su drugi razvijeni modeli *in vitro*, poput kulture zametnog štita, pogodniji za praćenje terminalne diferencijacije embrionalnog tkiva, ili ispitivanje embriotoksičnosti u kulturi u dužem vremenskom periodu (4, 38, 61, 62).

U modelu kulture zametnog štita, Škreb i Švajger su 1973. razvili sustav u kojem se 9,5 dana stari zametak štakora i miša kultivira bez ekstraembrionalnog dijela, dakle samo zametak u užem smislu riječi tj. zametni štit (tri zametna listića) u kojem vanjski čimbenici direktno djeluju na zametak bez kompleksnog utjecaja majčinog organizma i placentе (63). U tom modelu, eksplantirani postimplantacijski zametni štitovi štakora u gastrulacijskom periodu kultiviraju se do 14 dana na površini vlažnog lećnog papirića na metalnoj mrežici i u dodiru sa zrakom. Osim prednosti prolongiranog proučavanja utjecaja raznih agensa na zametak kroz duži period (do 14 dana) (4), budući da se radi o kultiviranom samo zametnom štitu a ne cijelom zametku, izbjegnute su interakcije sa ekstraembrionalnim dijelom zametka (ektoplacentalni konus). Također, prednost pred staničnim 2D kulturama embrionalnih matičnih stanica jest čak mogućnost djelomičnog odvijanja morfogeneze zbog donekle sačuvanih tkivnih interakcija (64).

U navedenom modelu *ex vivo* kulture u prvom tjednu zameci rastu, a diferencijacija različitih tkiva se odvija već od drugog dana (neuroblasti), pa osobito tijekom drugog tjedna kulture (65) kada se razvijaju teratomu-slične strukture sa izmiješanim diferenciranim tkivima. Diferencijacija koja se postiže u ovom modelu razvoja *in vitro*, iako je nekad terminalna (npr. epidermis, hrskavica, cilindrični epitel s trepetljikama) obično je nešto nižeg stupnja od one koja se odvija *in vivo*, npr. kod transplantacije embrija pod čahuru bubrega (9, 66-68). Teratomi izrasli *in vitro* sadrže

osnovne tkivne derivate zametnih listića u nepravilnom rasporedu (živčano tkivo, epidermis, hrskavica, miotube, cilindrični epitel).

U brojnim istraživanjima pokazano je da sustav osigurava odlične uvjete za terminalnu diferencijaciju derivata zametnih listića kultiviranih u prisutnosti seruma kao dodatka mediju. Još jedna prednost ovog modela je u mogućnost kultiviranja zametka u kemijski definiranom mediju bez seruma, odnosno MEM-u (engl. *minimum essential medium*) što omogućava jasnije rezultate utjecaja teratogena na molekularnoj razini obzirom na to da je serum kompleksan i varijabilnog sastava (38, 61, 69).

Incidencija diferenciranih tkiva ovisila je o vrsti medija i vremenskom periodu kulture. Najsiromašniji medij bez seruma i proteina (MEM) restriktivno je djelovao na živčano tkivo već nakon 7 dana kulture, a nakon 14 dana na skeletne mišiće, mast i žljezdani epitel. Epidermis se pokazao neosjetljivim na promjenu medija (62) i trajanje kulture (70). Dodatak albumina kao jedinog proteina u MEM, direktno je utjecao na poboljšanu diferencijaciju neuroblasta u odnosu na MEM bez proteina i seruma (66).

U ovisnosti o mediju također dolazi do razlike u sačuvanju razvojnog potencijala zametka, što se očituje nakon transplantacije prethodno kultiviranih zametaka *in vivo* u bolje metaboličke uvjete gdje uglavnom dolazi do većeg stupnja diferencijacije pojedinih derivata zametnih listića. Međutim, ako su uvjeti u kulturi inhibirali diferencijaciju smanjenjem incidencije neke vrste stanica (npr. neuroblasta, hondrocita), smanjenje incidencije u odnosu na kontrolu zadržalo se i u transplantatu prethodno kultiviranog zametka iako su se u transplantatu razvila zrelija tkiva (npr. tkivo nalik mozgu, kost). S druge strane, ako su uvjeti u kulturi bili povoljni pa je incidencija tkiva bila kao i u kontroli (npr. epidermis), u transplantatima prethodno kultiviranih zametaka incidencija se nije razlikovala od kontrolne, ali tkiva koja su se razvila bila su zrelija i nalik onima u odraslom organizmu (epidermis je razvio kožu tj. razvili su se derivati epidermisa, dlake i lojnice) (62, 66).

U sustavu kulture na metalnoj mrežici, moguća je kultivacija i izdvojenog ektoplacentalnog konusa (71). Razvoj ektoplacentalnog konusa *ex vivo* pratio se npr. u istraživanju utjecaja dijabetesa tj. medija s visokom koncentracijom glukoze tijekom 5 dana (72).

### 1.3. REGULACIJA STANIČNOG CIKLUSA – ULOGA RB I PCNA PROTEINA

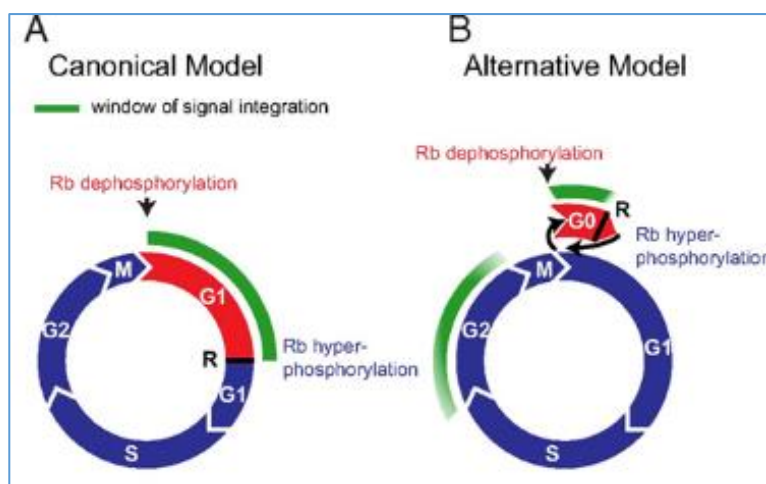
U stanicama našeg organizma regulacija staničnog ciklusa odgovorna je za ravnotežu između stanja proliferacije i mirovanja u G0 fazi ciklusa stanica koje su već terminalno diferencirane. Takva regulacija omogućava normalne razvojne procese u zametku i tkivima odraslog organizma. Kao takva je kritična za zdravlje, jer sprječava razvoj tumora (73). Već niz godina je poznato da stanica, ukoliko se želi podijeliti, mora proći kroz takozvanu kontrolnu restriksijsku točku (engl. *restriction point*, R), a ako prođe kroz nju, podijelit će se čak i u slučaju ako joj nestane nutrijenata ili mitogenih signala, što je pokazano u eksperimentima *in vitro* (74-76). Kasnije je pokazano da u G1 fazi dodatak seruma stanicama u *in vitro* kulturi dovodi do stvaranja ciklina D koji u kompleksu sa CDK4 inicira proces fosforilacije RB proteina (77). To je dovelo do postuliranja klasičnog puta staničnog ciklusa, gdje fosforilacija RB proteina dovodi do oslobađanja vezanog E2F transkripcijskog faktora koji pak inicira transkripciju ciklina A i E. Navedeni ciklini zajedno sa CDK2 potom stvaraju mehanizam pozitivne sprege u kojem dolazi do hiperfosforilacije RB i potpune aktivacije E2F te transkripcije gena potrebnih za S-fazu kao što je DNA polimeraza (78). Stanica u takvom stanju je trajno usmjerena za diobu, čak i ako nestane mitogena (79).

Daljnji radovi ukazali su da prijelaz iz hiperfosforilirane u hipofosforiliranu formu RB proteina zapravo počinje u kasnoj anafazi i nastavlja se kroz ranu G1 fazu (80). Tijekom te rane G1 faze događa se prolazak stanice kroz G1 restriksijsku točku, točno u trenutku kada CDK2 aktivira prijelaz RB-a iz hipo- u hiperfosforiliranu formu (77, 81). Sinteza navedenih opažanja dovela je do tzv. kanonskog modela staničnog ciklusa u kojem se stanice kćeri stvaraju/rađaju u stanju pred-restriksijske točke, sa niskom CDK aktivnošću i hipofosforiliranim RB (82). Ovo se stanje naziva "rana G1" i "G1pm" faza (77, 83). Zatim, 3-4 sata nakon mitoze, stanice dolaze do restriksijske točke, gdje dolazi do hiperfosforilacije RB i prolaska kroz restriksijsku točku (77, 83). U tom trenutku ("kasna G1" i "G1post" faza) stanice su trajno usmjerene za ulazak u

diobu u kojoj će dati dvije stanice kćeri koje su u stanju niske CDK aktivnosti i hipofosforiliranim RB (84).

Iako je ovaj model staničnog ciklusa široko prihvaćen, nedavne studije asinkronih dioba stanica *in vitro* pokazala su da diobom mogu nastati dvije subpopulacije stanica, ona sa niskom aktivnošću CDK i osjetljivošću na mitogene, te supopulacija sa začudo većom razinom CDK2 koja odmah ide u daljnju diobu i nije osjetljiva na mitogene (85). Drugi su pak pokazali da se sudbina stanica kćeri da pri nastanku imaju nisku razinu CDK2 određuje zapravo za vrijeme majčine G2 faze (85, 86). Naime, pokazano je da ukoliko postoji DNA egzogeni ili endogeni replikativni stres to će se prenijeti na stanice kćeri i u njima će se smanjiti aktivnost CDK2 (87-90). Za to je smanjenje odgovoran inhibitor CDK2, p21 (87, 88) iako mu uloga još nije posve razjašnjena (84).

To je dovelo do postuliranja novog, alternativnog modela (Slika 1B) staničnog ciklusa kojeg potvrđuju novije studije na staničnim linijama (84). U ovom modelu novonastale stanice integriraju mitogene, ali i roditeljske stresne signale u jednom kratkom prozoru odmah nakon mitoze i ovisno o tome postaju jedna ili druga subpopulacija stanica koje se različito ponašaju. Zdrava subpopulacija stanica koja ima optimalne uvjete rađa se sa umjerenom aktivnošću CDK2 i hiperfosforiliranim RB, neosjetljiva je na mitogene i odmah usmjerena daljnjoj proliferaciji, dok je druga subpopulacija (čija je roditeljska stanica u G2 fazi iz nekog razloga povećala razinu p21) nastala s niskom CDK2 aktivnošću i hipofosforiliranim RB te kao takva ostaje osjetljiva na razinu mitogena, slično onima u kanonskom modelu (Slika 1A). Dakle, ova prva, proliferativna subpopulacija nikada ne ukida točku restrikcije, dok se subpopulacija sa niskom CDK2 aktivnošću rađa u jednom stanju prije G1 restrikcijske točke koje se može smatrati nekom fazom mirovanja, prolaznim G0. Te stanice mogu nastaviti proliferaciju samo prolaskom kroz restrikcijsku točku, dakle putem povećanja aktivnosti CDK2 i hiperfosforilacijom RB (Slika 1B) (84).



**Slika 1.** Kanonički (A) i alternativni model kontrole staničnog ciklusa Iz: (83).

Važno je spomenuti da p21 posjeduje i tzv. PCNA interagirajući degran (engl. *proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-interacting protein (PIP) degran*) (91), bitan za regulaciju staničnog ciklusa. Stoga se smatra da PCNA protein koji je nuklearni antigen proliferirajućih stanica, a služi kao „*clamp*“ protein koji osigurava DNA polimerazi da oстане na lancu DNA, u staničnom ciklusu može sudjelovati u razgradnji p21 kako bi se osigurao prolazak kroz S fazu gdje je potrebna niska razina p21 (92, 93). To je potvrđeno i u drugim eksperimentima gdje je izazvana prekomjerna ekspresija P21-PIP što je promijenilo afinitet vezanja PCNA i dovelo do smanjenja proliferacije (94), dakle regulacija jakosti vezanja PCNA je kritična za normalno funkcioniranje stanice (95). Zbog kompleksnih interakcija, PCNA je osjetljiv na agense koji oštećuju DNA kao što su hidroksiurea (HU) i metilsulfonat (MMS) (96).

Inače, PCNA tj. nuklearni antigen proliferirajućih stanica, (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) je prstenasti homotrimer koji klizi duž DNA pa se naziva i DNA klizna štipaljka (97-100). Vanjska površina PCNA proteina mjesto je njegove interakcije s drugim proteinima i važno za njegovu interakciju s drugim proteinima bitnim u procesima replikacije i popravka DNA, apoptoze itd. Proteini koji stupaju u interakciju sa PCNA u ovim procesima su DNA polimeraze, helikaze, egzonukleaze, ligaze, regulatori staničnog ciklusa, acetil-transferaze, kromatin-remodelirajući kompleksi i histonski šaperoni (98, 101).

U stanicama koje proliferiraju zaustavljanje staničnog ciklusa izazvano RB proteinom je anti-apoptotično, budući da *RB-null* fibroblasti imaju defekt u zaustavljanju ciklusa uzrokovanog oštećenjem DNA i umiru apoptozom (102) zbog

signala stresa. Međutim, u eksperimentima sa izazivanjem oštećenja DNA, ektopična ekspresija mutiranog oblika RB-a (koji ne može zaustaviti diobu jer je nefunkcionalan) u stanicama osteosarkoma s nedostatkom RB1 i stanicama karcinoma dojke djelovala je anti-apoptotički (103). To nas dovodi do zaključka da bi RB1 mogao djelovati anti-apoptotički neovisno o svojoj ulozi u zaustavljanju staničnog ciklusa, vjerojatno putem izravne inhibicije apoptotičkih gena (104).

Posttranslacijske modifikacije kod oštećenja DNA također su se pokazale važnim za pro-apoptotičku funkciju RB-a. Nakon oštećenja DNA, RB se defosforilira na vezujućim mjestima za CDK, međutim, kinaze aktivirane oštećenjem (u ataksiji-telangiektaziji mutirana-ATM i kinaza kontrolne točke 1/2-CHEK1/2) fosforiliraju RB i/ili E2F. RB-E2F1 kompleksi su također acetilirani i metilirani te se kao takvi aktiviraju s histonskom acetiltransferazom p300/CBP-udruženim faktorom (P/CAF) tvoreći na taj način transkripcijski aktivni kompleks koji može inducirati putem E2F1 apoptotičke gene i utišati gene staničnog ciklusa (105, 106). U drugim je studijama pokazano da da RB izravno aktivira BAX u mitohondriju i potiče apoptozu (107).

#### 1.4. EPIGENETIČKI MEHANIZMI

Stanice našeg organizma nastale od jedne oplođene jajne stanice sadrže isti genom, ali su se tijekom razvoja, diferencirale u stanice različitih vrsta tkiva utjecajem niza faktora pa imaju različit tzv. epigenom, odnosno različito reguliranu ekspresiju gena. Specifičnost epigenoma je zasnovana na dostupnosti kromatina, koja je uvjetovana različitim informacijama koje stižu na istu DNA u dvama različito diferenciranim stanicama (108).

Drugim riječima, slijed nukleotida u DNA koji smo naslijedili po građi ostaje cijelog života nepromijenjen, no neke informacije upisuju se na određene dijelove DNA (*epi*= na) kao odgovor na uvjete iz okoliša ili organizma. Tada kažemo da se u određenoj stanici ne mijenja genom nego se mijenja tzv. epigenom. Naime, u kontinuiranom procesu prilagodbe na okolišne faktore koji mogu mijenjati epigenetički obrazac DNA, tzv. epigenatore, te posljedičnih promjena koje nastaju u samoj citoplazmi, stanica doživljava epigenetičke modifikacije svog genoma koje joj

omogućuju rast, ali i programiranu smrt, proliferaciju, diferencijaciju, te akomodaciju na eventualne promjene uvjeta (109). Ipak, postoji i određena stabilnost epigenoma tijekom života stanice koja predstavlja molekularni mehanizam staničnog pamćenja koji se prenosi na stanice potomke nastale mitozom. Epigenetičke oznake na DNA su nasljedne i u potomaka višestaničnog organizma jer se mogu prenijeti putem spolnih stanica, ali je upitno do koje generacije. Epigenetičke oznake su također reverzibilne pa se mijenjaju tijekom razvoja i tumorigeneze, a moguće ih je promijeniti i pod utjecajem terapije.

Možemo dakle reći da svaki organizam ima svoj tzv. "epigenetski kod" gdje pojam epigenetski označuje skup mitotički i/ili mejotički nasljednih promjena u funkciji gena koje se ne mogu objasniti promjenom u slijedu baza DNA.

Osnovni epigenetički mehanizmi zaslužni za postavljanje epigenetičkih oznaka u stanici su metilacija DNA, modifikacija histona i sustav RNA interferencije. Ovi mehanizmi reguliraju gensku ekspresiju te tako utječu na proliferaciju, diferencijaciju normalnih somatskih, pa tako i tumorskih stanica (67, 108, 110).

Posljednji godina se naročito intenzivno istražuju epigenetičke oznake nastale putem metilacije DNA (111), posttranslacijskih modifikacija histonskih molekula (112) i nekodirajućih RNA (113). U brojnim istraživanjima dokazano je da epigenetički mehanizmi ne djeluju zasebno, već se međusobno intenzivno isprepleću i nadovezuju čime djeluju kao jedinstven nedjeljiv sustav kojim zajednički ostvaruju ulogu regulacije ekspresije gena (68, 71, 114-118). Tako je npr. deacetilacija histona popraćena u pravilu aktivacijom DNA metilaza, koje dovode do hipermetilacije molekule DNA i nekih histona. Posljedica toga je uglavnom utišavanje transkripcije gena. S druge strane prekomjerna acetilacija histona, pozitivno djeluje na faktore transkripcije, a DNA gena postaje pristupačnija RNA polimerazi i genska ekspresija se pojačava (119).

Vanjski utjecaji kojima je čovjek izložen tijekom života kao što su npr. hrana, lijekovi, toksini i kancerogeni mijenjaju obrasce DNA metilacije i histonske modifikacije brojnih gena, čime mijenjaju gensku ekspresiju i posljedično stanični metabolizam (120). U novije vrijeme istražuju se epigenetičke promjene u novorođenčadi nastale pod utjecajem različitih teratogenih faktora tijekom prenatalnog razdoblja za koje se čak pretpostavlja da bi se mogle vertikalno prenositi

na potomstvo, ne poput mutacija već utjecajima na regulaciju genske ekspresije (121).

Dakle, poremećaj čak i jedne komponente sustava epigenetičkih modifikacija u stanici odražava se na ostale dijelove tog sustava koji potom nastoji ukloniti poremećaj ili se prilagoditi poremećaju. Ukoliko mehanizmi popravka i prilagodbe zakažu, takva stanica može postati izvor patoloških stanja u organizmu, primjerice neoplastičnog procesa (110). Danas se smatra da su kardiovaskularna oboljenja, metabolički poremećaji, autoimuna oboljenja i tumori, možda i u prvom redu posljedica poremećaja epigenetske regulacije (114). Ipak, sama činjenica da su promjene u epigenomu reverzibilne, i u normalnim i u npr. tumorskim, promijenjenim stanicama, otvara mogućnost novom, epigenomskom liječenju. Obzirom na to da je reverzibilnost procesa osnova kemoprevencije navedenih bolesti, epigenetički bi pristup vrlo brzo mogao u potpunosti promijeniti naše sadašnje shvaćanje kemoprevencije. Istraživanja u području epigenomike te epigenomski pristup u liječenju korištenjem epigenetičkih lijekova je stoga od posebnog današnjeg interesa.

### 1.4.1. Metilacija DNA

Metilacija DNA je prva opisana i najistraženija epigenetička modifikacija i već u 80-im godinama prošlog stoljeća nađeno je da je oko 70% naše DNA metilirano, a ostatak je grupiran u tzv. CpG otoke koji predstavljaju regije u genomu bogate CpG dinukleotidima koji iznimno rijetko prihvaćaju metilaciju (122, 123). Te regije zauzimaju tek 1% humanog genoma i nalaze se u promotorskim područjima u preko polovice humanih gena, što se uglavnom odnosi na „housekeeping“ gene, tj. gene koji su neophodni u aktivnoj formi u svakoj stanici (124). Stanice različitih tkiva imaju različite metilacijske obrasce koji su temelj njihova fenotipa.

Sam proces metilacije vezane je za dinukleotide citozin-gvanin (CpG) kojih ima oko 28 milijuna u humanom genomu. Metilacija jest adicija metilne skupine na 5. ugljik u bazi citozin u dinukleotidu citozin-gvanin (CpG) čime nastaje modificirana metilirana baza metilcitozin (5-mC) (125). Odvija se aktivnošću enzima koje se nazivaju DNA metil-transferaze (DNMT) (126).



Metiliranje citozina u CpG dinukleotidima u promotorskim regijama uglavnom zaustavlja transkripciju pa kažemo da ako je gen metiliran da je utišan (nema ekspresije), a ako je gen demetiliran on je uglavnom aktivan (111). Osim u promotorima, regije bogate CpG-ovima, nalaze se pretežno u ponavljajućim sekvencama i centromeričnim ponavljanjima te retroviralnim i satelitskim sekvencama (127).

Metilacija DNA ima veliku ulogu u razvoju i diferencijaciji stanica regulirajući ekspresiju tkivno-specifičnih gena (engl. *tissue-restricted genes*) (128, 129). Naime, uočeno je da se hipermetilacijom (utišavanjem) promotora gena pluripotentnosti i demetilacijom promotorskih regija tkivno-specifičnih gena postiže stanična diferencijacija (25). Svaka stanica dakle ima svoj „specifičan“ metilacijski obrazac. Prilikom diobe somatske stanice, odnosno replikacije DNA, postojeći metilacijski obrazac na roditeljskoj DNA mora se kopirati u novonastali DNA lanac. Taj se proces odvija postreplikacijski baš pomoću enzima DNA metil-transferaze 1 (DNMT1).

Dinamično i regulirano odvijanje DNA metilacije i demetilacije u embrionalnom razvoju ima ključnu ulogu te se bez njih ne može se razviti jedinka (130). Metilacijom DNA regulira se aktivnost utisnutih (engl. *imprinted*) gena (131), evolucijski mladih repetitivnih sljedova (132, 133) genoma i gena na inaktivnom X-kromosomu (134, 135) tijekom embrionalnog i postnatalnog razvoja u spolnim stanicama. Za ove događaje odgovorni su enzimi DNA metiltransferaza DNMT3A i DNMT3B (136) i DNMT3C, pri čemu je potonja prisutna samo u glodavaca (137, 138), a sve imaju sposobnost metilirati dosad nemetiliranu DNA „*de novo*“.

Nadalje, metilacija je ključan mehanizam kojim se branimo od aktivnosti transpozonskih elemenata koji čine čak 45% našeg genoma i njegovi su glavni evolucijski modulatori (139). Njih čine DNA transpozoni, dugi terminalni ponavljajući retrotranspozonski sljedovi (*long terminal repeats*, LTR) i ne-LTR retrotranspozoni. Iako je većina ovih sljedova danas inaktivna zbog mutacija, *long interspersed element-1* (LINE-1 ili L1) retrotranspozon je i dalje nađen aktivan, jer njegovi proteinski produkti (ORF1p and ORF2p) mogu mobilizirati druge ne-autonomne retrotranspozone, nekodirajuće RNA, čak i mRNA, te dovesti do nastanka pseudogena (140). Ovakve sekvence sadrže jako puno CpG dinukleotida i metiliraju

se u spolnim stanicama tijekom embriogeneze i u ranom postnatalnom razdoblju (136) kako bi se kao utišane prenijele na potomstvo.

Poremećaje metilacije DNA također nalazimo u pojavama maligniteta (141, 142) gdje se uglavnom radi o globalnoj hipometilaciji te hipermetilaciji promotorskih regija tumor supresorskih gena (143, 144) koji zbog toga ne mogu obavljati svoju zaštitnu funkciju.

U humanom genomu CpG nukleotidi su neravnomjerno raspoređeni. Zapravo, većina gena je evolucijski ispražnjena od CpG dinukleotidnih parova, iako postoje područja s visokim udjelom CpG dužine oko 1kb koji se nazivaju CpG otoci (CGI, engl. CpG *islands*). Oko 70% dosad poznatih gena u humanom genomu sadrži CGI regiju u blizini početnog mjesta transkripcije (*transcription start site*, TSS), ali više od polovice CGI u genomu nije smješteno u blizini dosad poznatih gena pa se takve regije zovu CGI bez podrijetla ili geni siročad (engl. *orphan CGI*). Prisutnost CGI u takvim regijama vjerojatno predstavlja regulatornu regiju nekodirajućih RNA (145). Što se tiče poznatih gena, njihovi CGI u većini stanica nisu metilirani, vjerojatno zbog vezanih faktora transkripcije koji sprečavaju *de novo* metilaciju (146). Također je zanimljivo da su genski promotori povezani sa gustim i velikim CGI (visoki CpG promotor, engl. *high CpG promotor*, HCP) manje skloni regulaciji metilacijom od onih sa srednjom (engl. *Intermediate CpG promotor*, ICP) ili niskom gustoćom CpG parova (engl. *Low CpG promotor*, LCP) (145-147). Također, najveće varijacije u metilaciji u tkivno-različitim stanicama vidljive su upravo u promotorskim regijama sa niskom i srednjom gustoćom CpG parova. Čini se da otprilike 20% svih CpG ima tkivno specifičnu metilaciju i da je metilacija CpG u područjima koje omeđuju CpG regije – tzv. CGI obale (engl. *CGI shores*) najvažnija za regulaciju ekspresije (146). Regije s vrlo visokim sadržajem CpG regulirane su metilacijom samo u slučajevima *de novo* metilacije (inaktivacija X-kromosoma, genomski imprinting i utišavanje transpozona) (148).

Ovo opažanje dovelo je do mišljenja da metilacija DNA može ograničiti vezanje faktora transkripcije. U prilog ovoj tvrdnji napravljeni su eksperimenti *in vitro* koji su pokazali da prisutnost 5mC u sekvenci može mijenjati afinitet većine DNA-vezujućih proteina (transkripcijskih faktora) koji se vežu na CpG dinukleotide (149, 150). Nadalje, za određene transkripcijske faktore (TF), uključujući NRF1 i CTCF,

pokazano je da imaju promijenjen afinitet vezivanja na DNA u stanicama gdje je metilacija DNA smanjena ili je nema (151, 152). Osim toga, metilirane CpG prepoznaju i proteini sa metil-vezujućom domenom (engl. *methyl binding domain-containing*, MBD) (153), koji pak djeluju sa histonskim deacetilazama (HDAC) stvarajući transkripcijski represivni kromatin (154, 155). Generalno gledano, hipermetilacija DNA u području genskih promotora uz posredovanje DNA metil-transferaza praćena je deacetilacijom histona, tj. aktivnošću HDAC enzima, a hipometilacija sa acetilacijom histona (HAT enzimi).

Unatoč aktivnom vezanju HDAC na metilirane citozine, povezanost DNA metilacije i aktivnosti HDAC u represiji genske ekspresije je dosad slabo istražena. U studijama sa reporterskim genima (izvještačima) pokazano je da inhibicija HDAC smanjuje represiju transkripcije posredovanu metilacijom DNA (154, 156). S druge strane, na drugim genima inhibicija HDAC nije dovela do istog efekta pojačavanja ekspresije kao kad se smanji DNA metilacija (157-159). Novije studije ističu da su metilacija DNA i deacetilacija histona neovisni mehanizmi kojim se ograničava pristup transkripcijskim faktorima u području genskih promotora (pokazano na mišjim ES stanicama) (160).

Vezano za povezanost razine acetilacije histona i metilacije molekule DNA istraživalo se utječe li terapija sa inhibitorima histonskih deacetilaza na metilaciju DNA ciljnih stanica (npr. tumorskih ili živčanih) u liječenju raznih poremećaja. Tako su *in vitro* studije protutumorskih učinaka epigenetičkih lijekova, kao što je valproat, inhibitor histonskih deacetilaza (HDAC inhibitor), ukazale na pojavu globalne hipermetilacije uz hipometilaciju tumor supresorskih gena stanica neuroblastoma tretiranih sa valproatom (161). U nekim radovima postignut je sinergistički antineoplastički učinak epigenetičkih lijekova *in vivo* i *in vitro* u limfomskim modelima i to zajedničkim djelovanjem – kombinacijom i HDAC i hipometilirajućih agensa čiji je učinak ovisan o koncentraciji lijeka i vremenu ekspozicije (162). Liječenje bipolarnog poremećaja valproatom u terapijskoj koncentraciji, izazvalo je globalnu hipermetilaciju u leukocitima (163), ali je dovelo do hipometilacije gabanergičnih gena (164). Valproat u terapiji epilepsije doveo je do DNA hipometilacije, hipovitaminoze B12, te manjka folata uz hiperhomocistinemiju (165).

Zbog toga se danas smatra da upravo razlike u metilaciji DNA predstavljaju bitan faktor u odgovoru na terapiju valproatom u liječenju, ali se ukazuje i na nedovoljno istražen učinak takve terapije u razvoju trofoblasta i placente (136).

### **1.4.2. Modifikacije histona**

Histoni su proteini koji se nalaze u nukleoplazmi jezgre eukariota, oko čijeg oktamera je omotano 147 bp molekule DNA (166) i kao takvi predstavljaju temelj strukture kromatina. Spoznaja da se molekula DNA u jezgri eukariota nalazi zaštićena histonima koji utječe na strukturu kromatina navela je još 1950. godine znanstvenika Stedmana na razmišljanja o ulozi histona vezano za ekspresiju gena. Razmišljanja o tome bila su temelj hipotezi histonskog koda (167, 168) baziranu na činjenici da histoni posjeduju određene modifikacije koje „čitaju“ takozvani efektorni proteini ili proteinski kompleksi i time mijenjaju funkcionalno stanje kromatina (aktivno ili neaktivno). Naime, kromatin nije statična struktura nego se dinamično modulira (169).

Tri su glavna mehanizma koja reguliraju kompakciju i dekompakciju kromatina. U prvom mehanizmu, o ATP-u-ovisni kompleksi koji remodeliraju kromatin aktivno pomiču i repozicioniraju nukleosome duž DNA (170). Prema tome, remodeliranje kromatina utječe na gensku ekspresiju jer osigurava ili ograničava pristup transkripcijskoj mašineriji na promotorsku regiju te dopušta elongaciju transkripcije u kodirajućim regijama (171).

U drugom mehanizmu regulacije kompakcije kromatina, histoni imaju svoje specifične nekanonske varijante, kao npr. H2A.Z i H3.3., čija ugradnja preciznije definira stanje kromatina (172). Ugradnja, na primjer, potonjih varijanti u nukleosom povezana je s aktivacijom transkripcije jer je s tim varijantama nukleosom manje stabilan (171).

U trećem mehanizmu, razne kovalentne modifikacije određenih aminokiselina histonskih polipeptida predstavljaju ključne regulatore kromatinske strukture i svih procesa ovisnima o DNA (npr. genska ekspresija) (173). Nazivamo ih često histonskim modifikacijama.

Histonske modifikacije u prvom redu označavaju kovalentnu adiciju i eliminaciju određenih skupina na aminokiselinama polipeptidnog lanca histona najviše u repovima histona i to na N-terminusu. Tim promjenama podliježu svi histoni (H2A, H2B, H3 i H4 i H1). Adicija i eliminacija (uglavnom acetilnih i metilnih skupina) histonskih molekula u regulatornoj regiji gena odvijaju se postranslacijski i utječu direktno na ekspresiju gena (174). U modifikacije histona spada i fosforilacija (175), ribozilacija i ubikvitinilacija (176).

Poznajemo tri principa modifikacija kojima se mijenja struktura kromatina i regulira ekspresija gena. To su cis-efekt, trans-efekt i aktivna zamjena kanonskog histona unutar nukleosoma alternativnim varijantama. Naime, dodavanje ili uklanjanje modifikacije na određenom histonu posljedično aktivira druge modifikacije u cis obliku (na istom histonu) ili u trans obliku (na drugom histonu) (177).

U cis modifikacije koje se odvijaju na bazičnom histonu spadaju one koje mijenjaju naboj ili strukturu njegovog repa, a najčešća je acetilacija. Kako je nukleosom pozitivno nabijen, njegov se naboj može neutralizirati adicijom acetilne skupine (najčešće na lizin) koja je negativnog naboja što smanjuje njegovo međusobno privlačenje s negativno nabijenom molekulom DNA kao kiseline. Time je kromatin razvučeniji, rahliji i nije čvrsto povezan, te je dostupniji transkripcijskim faktorima i RNA polimerazi (178). Dakle, acetilacija histona promovira ekspresiju gena.

Modifikacija histona trans-efektom nastavlja se na cis-efekt. Nakon adicije acetilne skupine na drugom histonu dolazi do promjena kojima se mijenja afinitet tog histona prema proteinima koji ga modificiraju (engl. *histone modification binding protein*, HMBP) koji se vežu na histonske repove i privlače druge, veće proteinske komplekse.

Važnost brzine i reverzibilnosti procesa acetilacije i deacetilacije najbolje se opisuje u procesu transkripcije. Naime, kako transkripcija i sinteza mRNA napreduje, histon acetiltransferaze (HAT) acetiliraju nadolazeće histone na lizinu koji se nalaze ispred RNA polimeraze koja se pomiče nizvodno po DNA. Acetilacija neutralizacijom naboja slabi vezu DNA - nukleosom neposredno ispred transkripcijskog kompleksa što omogućuje RNA polimerazi nesmetano kretanje po molekuli DNA. No, kako se RNA polimeraza kreće naprijed, nakon prepisivanja ostavlja iza sebe i dalje rahli,

otvoreni acetilirani kromatin, pogodan za ponovnu, patološku inicijaciju transkripcije. To se u fiziološkim uvjetima ne događa jer drugi enzim, tzv. histonska metiltransferaza Set2 hvata repove histona iza transkripcijskog kompleksa te katalizira reakciju dodavanja tri metilne skupine na njih. Takva struktura privlači enzime histonske deacetilaze koji tada deacetiliraju histone i time ih vraćaju u prvotno stanje pozitivnog naboja i čvršće povezanosti s molekulom DNA. Time kromatin postaje trenutno nedostupan transkripcijskom kompleksu (179). Treća modifikacija, izmjena histona, je dramatičniji oblik reorganizacije kromatina aktivnom zamjenom pojedinog kanonskog histona ili dijelova nukleosoma alternativnim varijantama. Naime, pored gena za kanonske histone, stanica posjeduje gene za niz varijanti histona. Zamjenom s alternativnim varijantama mijenja se struktura kromatina i odnos stanice prema vlastitom genetičkom materijalu. Ova modifikacija uključena je u regulaciju staničnog ciklusa, apoptoze, popravka oštećenja DNA i otpornost genoma na kromosomske aberacije. Primjerice, ionizirajuće zračenje i egzogene genotoksične tvari, ali i normalna replikacija DNA, mejoza ili uobičajeno prekrajanje genoma, dovode do loma lanca molekule DNA. Stanica odgovara na ovaj događaj brzo jer unutar jedne minute od loma lanca DNA različiti enzimi na mjestu loma fosforiliraju rep 6 najbližeg histona H2AX, koji je varijanta histona H2A i nalazi se nasumično postavljen u čitavom zdravom genomu eukariotske stanice. Fosforilacija se eksplozivno širi na susjedne H2AX u oba smjera lanca DNA i time se stvara mali dio visoko fosforilirane DNA (H2AX fokalne lezije) u čijem se središtu nalazi oštećen genetički materijal koji privlači mašineriju popravka DNA aktivirajući p21 put ili ukoliko je oštećenje preveliko pokreće apoptozu. Kasnije, fosforilirani H2AX će se zamijeniti svojom modificiranom varijantom kako bi mogla nastaviti s normalnim staničnim ciklusom (180-182).

Acetilacija generalno doprinosi aktivnijoj, ubrzanoj transkripciji gena, dok su deacetilacija i metilacija odgovorne za inhibiciju transkripcije. Deacetilacija histona H3 i H4, demetilacija lizina 4 histona H3 (H3K4) i metilacija lizina 9 H3 histona biljezi su transkripcijski inaktivnog heterokromatina. U čovjeka i miša H3K9/14ac (histon 3 acetiliran na lizinu 9 i 14) prisutan je na mjestima početka transkripcije (engl. *Transcription Start Sites*, TSS) (183), dok su u *Drosophila melanogaster* H3ac i H4ac vezani za aktivne gene (184).

Najistraženija modifikacija kojom se negativno regulira genska ekspresija je deacetilacija histona koji kao takvi uzrokuju tri događaja: Prvo, odsutnost acetilnih skupina na lizinima histonskih aminokiselina znači da se oni mogu metilirati i aktivirati proteine s metil-vezujućom domenom (MBD) od kojih neki djeluju represivno (185). Drugo, deacetilirani histoni omogućuju zgušnjavanje kromatina, tj. čvršće povezivanje DNA i nukleosoma (119, 186). Treće, odsutnost acetilacije na lizinskim ostacima ograničava vezanje transkripcijskih aktivatorskih proteina sa bromodomenom jer oni prepoznaju samo acetilirane histone (187).

Odavno se zna da su ove modifikacije katalizirane različitim razredima kromatin-modificirajućih enzima kao što su histonske acetil-transferaze (HAT), histonske metil-transferaze (demetilaze) i histonske deacetilaze (HDAC) koje ćemo pobliže opisati. HDAC su najistraženiji nuklearni i citoplazmatski enzimi koji deacetiliraju niz supstrata među kojima i histone, a mogu se podijeliti prema svojoj rasprostranjenosti po tkivima i specifičnosti za proteinski supstrat u ljudskom organizmu.

U ljudi je otkriveno 18 različitih HDAC enzima, koji su podijeljeni u 4 razreda prema homologiji s HDAC enzimima kvasaca, organizmima u kojima su po prvi puta otkriveni. Enzimi iz I. (HDAC 1, -2, -3 i -8, molekularna masa 42-55 kDa), II. (HDAC 4, -5, -6, -7, III. 9, -10, Mr 120-130 kDa) i IV. razreda (HDAC 11, svrstan u poseban razred zbog posjedovanja katalitičkih mjesta karakterističnih i za I. i za II. razred, a, Mr 39 kDa) zahtijevaju atom cinka za svoju aktivnost. HDAC 1 (55.9 kDa) prisutan je u jezgri u kompleksu sa HDAC 2 (60 kDa) te su rasprostranjeni u svim tkivima s utjecajem na proliferaciju i apoptozu stanica (188). Razlike među razredima su bitne s farmakološkog stajališta jer otvaraju mogućnost sinteze razredno specifičnih molekula za njihovu inhibiciju.

U tumorskim stanicama dolazi do poremećaja u acetilaciji histona što dovodi do smanjene acetilacije histonskih nastavaka u odnosu na normalne stanice, zatvaranja kromatina i potencijalnog smanjenja sinteze bjelančevina s tumor supresorskim učinkom. Istraživanja sa inhibitorima deacetilacije histona *in vitro* imala su antiproliferativni učinak uzrokovavši disregulaciju staničnog ciklusa kod stanica akutne limfatičke leukemije (ALL) (189) i akutne mijeloične leukemije (AML) (190).

U tumorskim stanicama nađena je povišena razina HDAC I razreda, dok je razina HDAC II bila smanjena, pa se zaključilo da bi veća razina HDACII mogla biti i prediktor bolje prognoze malignog procesa (191). To dovodi do zaključka da bi zbog različitosti u ekspresiji HDAC enzima moglo doći i do različitog odgovora na terapiju sa inhibitorima HDAC (192). Kad je otkriveno da inhibira klasu I i klasu II HDAC enzima vežući se vjerojatno na njihov katalitički centar, valproična kiselina (VPA) se počela istraživati kao lijek u terapiji malignih oboljenja (193).

### 1.4.3. RNA interferencija

Unutar nekodirajućeg dijela genoma nalazi se niz sekvenci koje se prepisuju u protein-nekodirajuće RNA (engl. *non-protein-coding ncRNAs*). Iako ne kodiraju za funkcionalne proteine, imaju važnu ulogu u regulaciji genske ekspresije na posttranskripcijskoj i postranslacijskoj razini. Poradi toga, ubrojene su u epigenetički sustav pod nazivom sustav RNA interferencije. U ovaj sustav ubrajamo kratke nekodirajuće RNA (engl. *short non-coding RNA, sncRNA*) i duge nekodirajuće RNA (engl. *long non-coding RNA, lncRNA*) (194, 195). sncRNA djeluju u citoplazmi stanice na nivou mRNA onemogućujući proizvodnju proteina kodiranog ciljnom mRNA. U kratke ncRNA ubrajaju se mikro RNA (engl. *microRNAs, miRNAs*), kratke interferirajuće RNA (engl. *short interfering RNAs, siRNAs*) i RNA koje su u interakciji s piwi proteinima (piRNA) (196). Duge ncRNA se mogu uključivati u komplekse s proteinima koji modificiraju kromatin i usmjeravati njihovu katalitičku aktivnost na specifična mjesta u genomu, te na taj način utjecati na ekspresiju gena. One imaju ulogu u remodeliranju kromatina, regulaciji transkripcije, posttranskripcijskim procesima, te služe kao prekusori siRNA. Osobito važnu ulogu imaju u inaktivaciji kromosoma X (196).

miRNA i siRNA imaju nekoliko razlika. Mikro RNA je jednolančana molekula s komplementarnim dijelovima koji se sparuju i tvore naizgled dvolančanu molekulu s petljom na jednom kraju, a siRNA je uvijek dvolančana molekula. Važno je reći da je miRNA endogenog porijekla, tj. stanica je sama prepisuje, obrađuje i šalje u citoplazmu, dok siRNA nastaje ili abnormalnom transkripcijom koja se odvija



istovremeno s oba komplementarna lanca DNA ili može biti egzogenog, najčešće virusnog porijekla.

Mikro RNA onemogućuje proces translacije mRNA vežući se na mRNA komplementarnom sekvencom, dok siRNA vezana na ciljnu mRNA uzrokuje njenu razgradnju (195) i tako dolazi do supresije translacije, odnosno supresije ekspresije gena.

miRNA imaju ulogu u supresiji tumora, apoptozi, proliferaciji i kretanju stanica, što upućuje na to da bi se njihovom manipulacijom mogle liječiti epigenetičke bolesti poput raka (197). siRNA pak potiče stvaranje heterokromatina, uključujući se u komplekse koji potiču metilaciju i kondenzaciju kromatina (196).

U ljudi, RNA interferencija istražuje se u vidu liječenja nasljednih bolesti gdje je bolest izazvana postojanjem mutiranog proteina (npr. autosomno dominantna bolest) i gdje bi se RNAi tehnologijom on uklonio (198). Na ovom principu baziraju se najnoviji recentno odobreni lijekovi (vidi: Epigenetički lijekovi).

## 1.5. EPIGENETIČKI LIJEKOVI

Na temelju poznavanja dinamike promjena epigenetičkih modifikacija u normalnim i tumorskim stanicama danas se provodi tzv. epigenetička terapija, korištenjem epigenetičkih lijekova koji direktno utječu na navedene epigenetičke procese. Današnja epigenetička terapija naročito je usmjerena na demetilaciju i aktivaciju gena (primjerice supresora tumora) (112) ili inaktivaciju gena na razini mRNA pomoću siRNA (199) u tumorskim stanicama. Postoje 3 tipa lijekova, ovisno o tome koji proces interferiraju.

Prva skupina su inhibitori DNA metil-transferaza, tj. procesa metilacije DNA. Najpoznatiji od njih su analozi citozina 5-azacitidin (5-azaC) i 5-azadeoksicitidin (5-azaDC). Zbog strukture slične bazi citozin, prilikom replikacije i transkripcije ugrađuju se u nukleinske kiseline. Posljedica njihove ugradnje tijekom replikacije DNA u novonastali lanac je ireverzibilno vezanje DNA-metil-transferaze na takav nukleotid, zbog čega dolazi do gubitka njene aktivnosti, te na tom mjestu DNA ostaje

hipometilirana. Kada se ugrade u RNA (azacitidin), interferiraju s procesom translacije i djeluju citotoksično (200).

Dakle, kod tretmana ovakvim lijekovima dolazi do hipometilacije gena neophodnih u procesima diferencijacije ili do citotoksičnog učinka na stanice koje su neosjetljive na fiziološke signale rasta, kao što su tumorske stanice. Tako je npr. *in vitro* tretman sa 5-azacitidinom stanica multiplog mijeloma doveo do indukcije odgovora ATR- posredovanog popravka DNA dvostrukog loma (engl. *double strand break*, DSB), te procesa apoptoze tumorskih stanica (201). Na štakorskom modelu je pokazano da epigenetički lijekovi, kao što je 5-azacitidin, ako su primijenjeni tijekom gestacije remete razvoj placente, izazivaju smanjen rast i malformacije (40), a u *in vitro* modelima razvoja iako djeluju embriotoksično, na staničnoj razini utječu na diferencijaciju (2, 38, 48).

Danas se na tržištu nalaze dva FDA odobrena lijeka derivata citidina s hipometilirajućim učinkom. Prvi, Vidaza<sup>TM</sup> (5-azacitidin), odobren je 2004., dok je Dacogen<sup>TM</sup> (5-aza-2' deoksicitidin) odobren 2006. godine. Oba lijeka indicirana su za primjenu kod mijelodisplastičnog sindroma (engl. *myelodysplastic syndrome*, MDS).

Druga skupina epigenetičkih lijekova označava inhibitore procesa modifikacije histona blokiranjem aktivnosti histonskih deacetilaza (HDAC), tj. deacetilacije histonskih repova (valproat, trihostatin A) i posljedično time nemogućnošću stvaranja transkripcijski neaktivnog kromatina. Terapijom ovim lijekovima može doći do reaktivacije tumor supresorskih gena ili indukcije stanične diferencijacije (202). Istraživanja na epigenetičkoj razini, pokazala su da se inhibicija HDAC pokazala učinkovita u inhibiciji rasta i indukciji terminalne diferencijacije, kao prevencija nastanka neoplastičnog procesa (203), a HDAC inhibitori dokazani kao učinkoviti anti-kancerogeni u terapiji malignih oboljenja (191, 204-206).

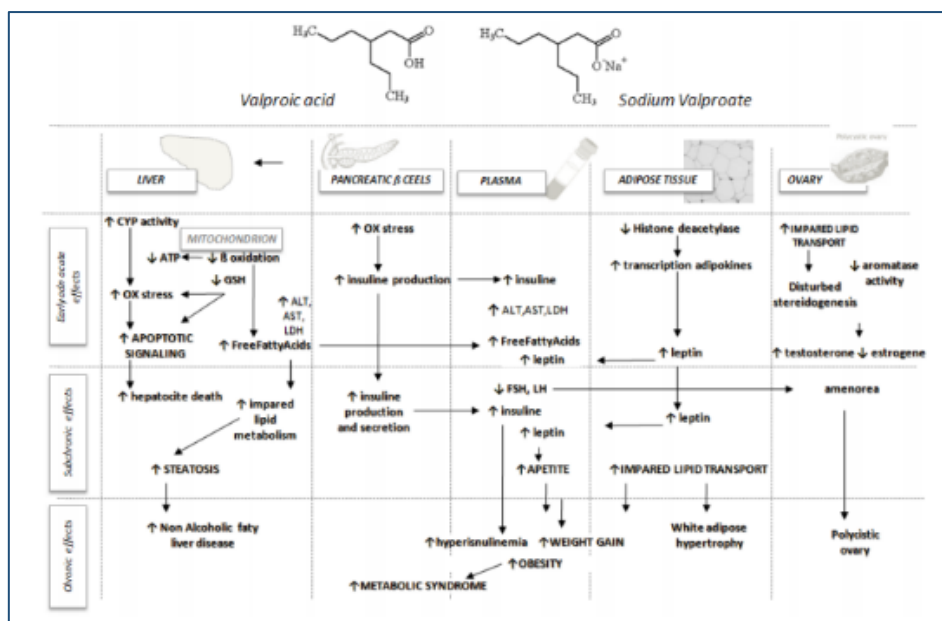
Suprotno ovim spoznajama isti mehanizam inhibicije HDAC kod zametka uzrokuje teratogenezu (207-209). Općenito, učinak primjene epigenetički aktivnih tvari (lijekova) *in vivo* u različitim fazama prenatalnog i postnatalnog razvoja, uz nedovoljno pojašnjene mehanizme njihovog djelovanja, razlog je potrebe daljnjeg istraživanja u ovom području.

Treća skupina vezana je za lijekove koji koriste mehanizam RNA interferencije. Za terapiju tumora se ovakovi lijekovi još istražuju, no prošle godine (2019) odobren je prvi lijek Patisiran (ONPATTRO™), baziran na RNAi terapiji (210, 211) za liječenje polineuropatije izazvane rijetkim genetskim poremećajem familijarnom amiloidozom transtiretina (engl. *hereditary transthyretin amyloidosis*, hATTR) (210).

Osim u terapiji malignih bolesti (110), epigenetički lijekovi koriste se u tkivnom inženjerstvu za diferencijaciju određenih tkiva iz matičnih pluripotentnih stanica zametka (212) te iz matičnih stanica gastrulirajućeg zametka (4). Jedan od takvih lijekova je i valproat.

### 1.5.1. Valproat

Valproat, tj. valproična kiselina (engl. *valproic acid*, VPA) je jednostavna kratkolančana monokarboksilna (masna) kiselina (engl. *2-propilpentanoic acid*). Preparat valproata produkt je biljke *Valeriana officinalis*, po prvi put ga je sintetizirao 1882. godine američki kemičar Beverly S. Burton, što je u recentnoj reviji opisao Tomson (213). Njegov antikonvulzivni učinak otkriven je 1962. godine dok je upotrebljavan kao otapalo antikonvulzanata u pokusima na miševima (214). Apsorpcija valproata nakon oralne primjene je dobra, a hrana ju usporava. Valproična kiselina je pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju, dok u reakciji sa natrijevim hidroksidom daje spoj u krutom obliku što olakšava primjenu lijeka. Terapijska koncentracija je 50-150 mg. Bioraspoloživost je oko 80%. Kod primjene u velikoj je mjeri ioniziran i vezan za plazmatske proteine (90%), te se raspodjeljuje u ekstracelularnu tekućinu. Ima spor klirens koji je ovisan o koncentraciji. Poluvijek eliminacije iznosi mu 6 – 16 sati, najviše u obliku glukuronida urinom (215).



**Slika 2.** Struktura valproata i pregled fizioloških reakcija uzrokovanim valproičnom kiselinom te natrij-valproatom (iz: 216).

Lijeku se osim antikonvulzivnih, odavno pripisuju neuroprotektivna svojstva (217) pa je odavno u primjeni u liječenju epilepsije, bipolarnih poremećaja, migrene i shizofrenije (218, 219).

VPA je epigenetički aktivni spoj jer je direktni inhibitor histonskih deacetilaza (HDAC) (220) te igra ulogu u strukturnoj modifikaciji kromatina koja je nužna za transkripciju (167, 221). Posljedica njegova djelovanja je histonska hiperacetilacija, koja dovodi do remodeliranja kromatina i utječe pozitivno na ekspresiju gena (190, 222). Druga posljedica je da valproat uzrokuje proteosomalnu degradaciju HDAC 2 (223), a utječe i na posttranslacijsku acetilaciju drugih proteina osim histona, npr. p53 čime poboljšava efekt radioterapije u retinoblastomu (224). U studijama na ljudima oboljelim od metastatskih neuroendokrinih karcinoma pokazalo se da izloženost valproatu dovodi do povišenja razine NOTCH1 tumor supresorskog gena (225). Možda bi valproat mogao djelovati i na nuklearni antigen proliferirajućih stanica (PCNA) za kojega se zna da u acetiliranom obliku sudjeluje kao kofaktor DNA polimeraze prilikom replikacije, a deacetiliran zaustavlja replikaciju tj. integrira replikaciju i modifikaciju kromatina vezanjem za histonsku deacetilazu (226).

Također, valproat iskazuje *in vitro* i *in vivo* antitumorsko djelovanje na leukemijske stanice kao i na neuroblastom i gliom (227-231). Zapažanja na tumorskim stanicama uzgajanima *in vitro* pokazala su da valproat potiče diferencijaciju matičnih hematopoetskih stanica i blasta u akutnoj mijeloičnoj leukemiji (190). Takva zapažanja navela su na dodatna istraživanja utjecaja ovog lijeka na tumorigenezu i mogućnost njegove terapijske uporabe. Kod nekih oblika tumora dobiveni su izuzetni rezultati u studijama *in vivo* i *in vitro*, jer je valproat inhibirao stanični ciklus holangiokarcinomskih stanica ovisno o koncentraciji (232) te je inhibirao proliferaciju, inducirao diferencijaciju i apoptozu stanica malignog melanoma (233). Novije studije ukazuju na to da valproat povećava imunogeničnost stanica melanoma pa se preporučuje kao nova terapijska strategija u borbi protiv ovog tumora (234). Također, Cornago i suradnici (235) ukazali su na redukciju proliferacije glioma *in vitro* pod utjecajem VPA, indukciju apoptoze i smrt stanica glioblastoma. U nekim studijama pozitivan učinak VPA u liječenju glioblastoma zapažen je prilikom liječenja popratnih epi-napada, ali još nedovoljno pojašnjenim mehanizmom (236).

VPA može smanjiti proliferaciju stanica neuroblastoma zbog zaustavljanja staničnog ciklusa utjecajem regulatora p21<sup>Cip / WAF1</sup> (229, 237) za kojeg je također poznato da također sudjeluje kod VPA-inducirane diferencijacije hematopoetskih stanica (202).

Način djelovanja ovog preparata na molekularnoj razini, poglavito njegov utjecaj na gensku ekspresiju, još se uvijek istražuje (238, 239). Dosadašnja otkrića ukazuju na to da, osim što valproat izaziva inhibiciju histonskih deacetilaza (HDAC, engl. *histone deacetylase*), utječe na ciklus trikarbonskih kiselina (TCA, engl. *tricarboxylic acid*) i oksidativnu fosforilaciju (engl. *oxidative phosphorylation*, OXPHOS), na glikogen sintazu-kinazu 3 alfa i 3beta (GSK3 $\alpha$  i GSK3 $\beta$ ), gama-aminobutiričnu kiselinu (engl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA), ekstracelularne regulatorne signalne kinaze (engl. *extracellular signal regulated kinase*, ERK), protein kinaze C (PKC), te Wnt/ $\beta$ -katenin puteve (228, 240, 241). VPA mijenja Wnt/ $\beta$ -kateninski signalni put izravno ili neizravno (242) inhibicijom aktivnosti glikogen sintetaze-kinaze 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ).

U normalnim stanicama valproat regulira diferencijaciju i proliferaciju raznih stanica, što uključuje mezenhimske, hematopoetske matične stanice, stanice primarnih neurona i neuralne prekursorske stanice (engl. *neural precursor cells*, NPC) (221, 243-246). 1 mM VPA tako inducira diferencijaciju i inhibira proliferaciju neuralnih preteča kore mozga (engl. *neural progenitor cell*, NPC), smanjujući razinu faktora rasta fibroblasta (FGF), faktora koji inhibira diferencijaciju NPC (247, 248). VPA-inducirana aktivacija p21 ERK-<sup>Cip / WAF1</sup> nije djelovala putem epidermalnog receptora faktora rasta (EGFR), što je naznačeno značajnim smanjenjem razine EGFR u prisutnosti VPA. Razina Ras proteina, komponente ERK puta, bila je značajno povećana kod VPA liječenja. Ova opažanja dovode do zaključka da se VPA-inducirana aktivacija ERK ciklusa odvija preko povećanja stabilnosti Ras (249, 250). Također je uočeno da je Ras-ERK-p21<sup>Cip // WAF1</sup> put ključan u stvaranju fenotipova, diferencijaciji i proliferaciji NPC.

*In vitro* istraživanja ukazuju na neuroprotektivnu ulogu valproata u stanjima toksičnosti glutamata, hipoksičnim stanjima i hipoglikemičnim oštećenjima, stanju oksidativnog stresa i sl. (251). VPA je tako djelovao neuroprotektivno prevenirajući konvulzije inducirane pentylenetetrazolom kod štakora (252). Međutim, točni mehanizmi neuroprotekcije, među ostalim i protiv moždanog udara, ostaju nepoznati. U istraživanju na štakorima, u eksperimentalnom ishemijskom moždanom udaru, jedna injekcija VPA između 0 i 90 minuta imala je protuupalni i antioksidacijski učinak. Rezultat je bio smanjenje stanične smrti u ishemijsko-reperfuzijskoj povredi (253).

Suprotno protektivnom učinku, u razvoju valproat djeluje teratogeno na razvoj organa fetusa (254). Prvenstveno mu se pripisuju teratogeni efekti na razvoj živčanog sustava, u vidu poremećaja molekularnih događaja u nastanku neuralne cijevi, apoptoze i regulacije transkripcije (255), dok intrauterina izloženost ovom lijeku u prvom trimestru trudnoće povećava rizik za nastanak kongenitalnih malformacija. 1984. godine po prvi puta je opisan je tzv. fetalni valproatni sindrom sa čitavim spektrom kongenitalnih anomalija: kraniofacialnim, skeletnim, defektima ekstremiteta, kongenitalnim srčanim greškama (256), te kasnije potvrđenim defektima neuralne cijevi (*spina bifida*), funkcionalnim i kognitivnim smetnjama u kasnijem razvoju (257-260). Više od 10% novorođenčadi u ispitanoj grupi je imalo neki oblik malformacije. Treći tjedan gestacije u trudnoćama izloženim valproatu čini se ključnim u nastanku skeletnih anomalija (261) dok drugi upozoravaju da

intrauterina izloženost ovom lijeku u cijelom prvom trimestru trudnoće povećava rizik za nastanak kongenitalnih malformacija (262). Europska agencija za lijekove upozorava, obzirom na moguće štetno djelovanje lijeka u trudnoći osobito u periodu organogeneze, na što je moguću manju primjenu valproata u tom periodu, odnosno kad god je moguće pribjeći alternativnoj zamjeni (215), a postoje i recentna bilježenja teratogenog djelovanja u humanoj trudnoći (263). I na mišu kao eksperimentalnom modelu je uočeno da primjena valproata *in vivo* u trudnih mišica dovodi do malformacije zametaka (264). Važno je istaknuti da vrsta oštećenja ovisi o vremenu primjene valproata jer je primjena u embrionalnoj dobi od 8,25 dana nakon začeća inducirala egzeencefaliju, oštećenje prednjeg dijela neuralne cijevi, uključujući malformacije mozga. Ponavljani tretmani u dobi od 9 do 9,5 dana trudnoće pak inducirali su oštećenja zatvaranja zadnjeg dijela neuralne cijevi, koje postaju vidljive u kasnijim fazama kao *spina bifida*.

Daljnja istraživanja su ukazala i na različitost djelovanja valproata obzirom na genetičke sojno-specifične razlike majke i fetusa u glodavaca (miš) (265, 266). Istraživanja vezana uz teratogenezu valproata u fazi gastrulacije provedena su na *Xenopusu* i zebrosoj ribici (267). U oba organizma došlo je do značajnog smanjenja rasta, razvoja perikardijalnog edema i promjena na oku. Ovdje je pokazano da valproat ima jači učinak od trihostatina koji također spada u inhibitore histonske deacetilaze. U ovom istraživanju razvojni defekti korelirali su upravo sa HDAC inhibitornom aktivnosti (267). Valproat je kod glodavaca u kulturi cijelih štakorskih zametaka (engl. *whole embryo culture*, WEC) uzrokovao apoptozu i defekte neuralne cijevi (268, 269), što je dovedeno u vezu s oksidativnim stresom (270).

Istraživanja Stodgella i sur. ukazuju da valproat utječe na ekspresiju gena koji su kritični za normalan razvoj mozga (271). U ljudi, kao i u primata, pokazano je da primjena valproata može imati za posljedicu autistično ponašanje (272-274), afektivne promjene (275) i izazvati preuranjen porođaj (276). Naime, kritični period u razvoju mozga vezan uz pojavu autizma je prvi trimestar trudnoće kod ljudi (3) dok je kod štakora to period između 11.-14. dana gestacije (277), razdoblje proliferacije neurona. Istraživanja na mišu, tretiranim valproatom *in utero* imalo je za posljedicu izostanak uobičajenog ponašanja i usporene slušne potencijale (278). Iako se smatra da je inhibicija HDAC djelovanjem lijeka vjerojatan uzrok ovim poremećajima, istraživanja na animalnim modelima fetalnog valproatnog sindroma (zebrasta ribica)

pokazuju da nakon tretmana valproatom dolazi do poremećaja homeostaze serotonina (279, 280).

Osim na živčano tkivo, VPA je inhibitorno djelovao na proliferaciju timocita u štakora, smanjujući time ukupnu težinu timusa te je inducirao diferencijaciju epitelnih stanica medule u Hassalova tjelešca (281).

Mehanizam djelovanja valproata u trudnoći nije razjašnjen (8, 282), iako je pokazano na životinjskom modelu (miš) i u čovjeku da VPA dolazi do zametka/fetusa putem placente (283). Uočene su i različitosti utjecaja valproata u embrionalnom periodu, vezano uz spol jedinke, a očitovale su se većim brojem stanica u muških potomaka u odnosu na ženke u određenom dijelu mozga (284). Također valproat primijenjen u trudnoći na štakorskom modelu izazvao je promjene u broju stanica hipokampusu te u metabolizmu folata (285). Disregulacija sinteze bioaktivnog NO, regulatora genske ekspresije i sastava izvanstaničnog matriksa povezuje se s mehanizmom djelovanja poznatih teratogena, kao i valproata (286), no njegovo djelovanje svakako je kompleksno pa se smatra da bi njegova embriotoksičnost mogla bi biti produkt združenih promjena kod majke, fetusa i placente (22).

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) stavila je ovaj preparat na popis esencijalno važnih lijekova u medicini. Američka agencija za lijekove i hranu (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) ga uvrštava u kategoriju D lijekova opasnih u trudnoći, na osnovu teratogenog učinka na plod, potvrđenog kliničkim i bazičnim istraživanjem (287). Stoga je primjena ovog lijeka prema osobnoj procjeni liječnika koji mora sagledati potencijalni rizik teratogenog djelovanja (263) i pratiti istraživanja na postnatalnoj kohorti individua sa valproatnim sindromom (288).

Dalje istraživanje utjecaja valproata na molekularnoj, staničnoj i tkivnoj razini tijekom razvoja od velikog je značaja za razumijevanje njegovog djelovanja osobito u „kritičnim periodima“ razvoja jedinke kako bi se moglo prevenirati neželjene nuspojave.

Epigenetički lijekovi koji su već u kliničkoj primjeni poput DNA demetilacijskog agensa 5-azacitidina, valproata ili oni za koje se predviđa klinička primjena poput trihostatina A, mijenjaju razvojne parametre. Prema tome, potrebno je detaljno poznavati njihove nuspojave i interakcije s drugim čimbenicima. Iako odavno postoje



podaci o teratogenom i embriotoksičnom djelovanju valproata, mehanizam još nije u potpunosti razjašnjen (289). Zbog važnosti ovog problema za humanu medicinu (290), a i zbog novih indikacija za primjenu valproata, posebno u terapiji malignih bolesti (291), potrebna su još uvijek dodatna istraživanja na modelima razvoja sisavaca od kojih su posebno vrijedni oni *ex vivo* koji predstavljaju alternativu *in vivo* istraživanjima u svrhu provođenja 3R pravila Russela i Burcha (292), izvođeni izvan organizma majke, te u kojima je izbjegnuta sva kompleksnost interakcije s majčinskim organizmom, a omogućena direktna eksperimentalna manipulacija (vidi gore). Dosadašnja istraživanja toksičnosti u takvim sustavima bazirala su se većinom na razvoju miša u kulturi *in vitro* (212). U istraživanjima važnosti HDACi za *in vitro* razvoj, važno je napomenuti da se, nakon transplantacije ES stanica u nokautiranim HDAC  $-/-$  miševima, razvijaju nezreliji teratomi od onih u miševima divljeg tipa (293), ali nokautiranje HDAC gena u samim ES stanicama pospješuje njihovu diferencijaciju u embrioidna tjelešca (294). Stoga može postaviti pitanje kakav će utjecaj imati valproat kao inhibitor HDAC na diferencijaciju u teratomu koji potječe od starijeg zametka iz stadija gastrulacije.

## 1.6. SVRHA RADA

Budući da nema istraživanja utjecaja valproata na zametku štakora tj. izoliranim zametnim štitovima iz gastrulirajućih zametaka, a poglavito njegovog utjecaja na diferencijaciju stanica, kao ni na izoliranim ektoplacentalnim konusima štakora, upravo takvo istraživanje se predlaže za temu ove doktorske disertacije, a u svrhu boljeg razumijevanja njegovog teratogenog djelovanja tj. izazivanja urođenih anomalija. Budući da se valproat kao epigenetički lijek pokušava primijeniti u terapiji tumora, ovo istraživanje također može doprinijeti razumijevanju anti-tumorskog djelovanja valproata.

## 2. HIPOTEZA

Valproat, kao inhibitor histonske deacetilacije, negativno će utjecati na razvoj zametka i ektoplacentalnog konusa u *ex vivo* modelu razvoja postimplantacijskog štakorskog zametka tj. smanjit će ukupni rast, proliferaciju i diferencijaciju, te pojačati apoptozu.

## 3. CILJEVI RADA

### 3.1. OPĆI CILJ

Istražiti utjecaj valproata na postimplantacijski štakorski zametak u *ex vivo* modelu razvoja zametka tj. zametnog štita i ektoplacentalnog konusa.

### 3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

1. Istražiti ukupni rast zametnog štita i ektoplacentalnog konusa *ex vivo*.
2. Istražiti proliferacijski potencijal i apoptozu stanica nakon kultivacije s valproatom.
3. Istražiti diferencijaciju nakon kultivacije s valproatom.
4. Istražiti razinu acetilacije histona H3 u zametku nakon kultivacije s valproatom.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Uzorkovanje na laboratorijskim životinjama provedeno je uz dozvolu Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u registriranoj nastambi za laboratorijske životinje Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (HR-POK-010), sa dozvolom za uzorkovanje (Klasa 641-01/14-04/1, Ur.broj 380-59-10101-14-675, u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06), Izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13). U eksperimentima su korišteni uzorci iz albino ženki soja Fischer u dobi od 3 mjeseca. Životinje su uzgojene u uvjetima s evidencijski vođenim odgovarajućim mikroklimatskim parametrima: temperatura 20-24°C, relativna vlažnost 40-70%, ciklus svjetla tame 12/12 sati i nivo buke do 60 dB. Hrana i stelja posjeduju GLP certifikat. Ženke štakora stavljene su preko noći na parenje. Na temelju nalaza spermija u vaginalnom brisu idući dan je označen kao kao nulti dan gestacije. Životinje su u nastambi žrtvovane u CO<sub>2</sub> komori 10. dana gestacije i upućene na izolaciju zametaka.

### 4.2. EKSPERIMENT *EX VIVO*

#### 4.2.1. Izolacija zametaka, zametnih štitova i ektoplacentalnih konusa

Skotne ženke su eutanazirane letalnom koncentracijom anestetika Xylapan (ksilazin, 48 mg/kg) sa sedativnim, miorelaksirajućim i analgetskim djelovanjem i Narketan 10 (ketamin, 300 mg/kg) s narkotičkim djelovanjem 10. dana trudnoće (starost zametka 9,5 dana). Koža životinje u trbušnom dijelu premazana je 70%-tnim

alkoholom. Horizontalnim rezom u donjem dijelu abdomena otvorena je trbušna šupljina. Pincetom se pristupilo rogovima uterusa i uz pridržavanje rogova, odvojen je mezometrij. Oba roga maternice izvađeni su iz trbušne šupljine i isprani u Petrijevoj zdjelici u Eaglovom MEM-u (engl. *minimum essential medium*). Na rogovima uterusa uočene su izbočine, nazvane decidua, unutar kojih su smješteni zameci.

Postupak izolacije je nastavljen u sterilnim uvjetima pod binokularnom lupom. U Petrijevoj zdjelici s MEM-om, urarskim pincetama otvorena je stijenka uterusa. Izolirani deciduomi prebačeni su u drugu Petrijevu zdjelicu s MEM-om. Pod binokularnom lupom, mikrokirurški, u sterilnim uvjetima su iz pojedinih deciduoma izolirani zameci koji su u stadiju gastrulacije (3 zametna listića). Finim wolframovim iglicama zamecima je odstranjena Reichertova membrana nakon čega su odvojeni zasebno embrionalni dio (zametni štiti sa 3 zametna listića) i ekstraembrionalni dio (ektoplacentalni konus) presijecanjem na razini amniona.

Ukupno je obrađeno i kultivirano otprilike 300 zametaka, što odgovara broju od otprilike 40 trudnih ženki. Ukupan broj potrebnih uzoraka zametaka definiran je sukladno zbroju predviđenog minimalnog broja uzoraka (eksplantata) za analitičke metode (broj predviđenih uzoraka zametaka temeljio se na vlastitom iskustvu mentora u provođenju sličnih eksperimenata (4). Budući da se nikakva manipulacija ne provodi na majkama, izolirani zameci randomizirano su raspoređeni u eksperimentalne skupine.

#### **4.2.2. Kultivacija eksplantata u *in vitro* modelu kulture organa**

Izolirani zametni štiti i ektoplacentalni konusi (u daljnjem tekstu: eksplantati) nasađeni su u jednokratne posudice za kulturu organa (Falcon 3037) sa zdencem u sredini, prema metodi Škreba i Švajgera (63). U udubinu zdenca postavljena je čelična mrežica trokutastog oblika, odignuta od dna podloge. Na mrežicu je položen trokutasti komadić poroznog lećnog papira. Na papir su „braking“ pipetom stavljeni po 3 ili 4 eksplantata i taj dan je označen 0. (nultim) danom kulture. U zdenac je dodan medij za kulturu *in vitro* do razine da ovlaži lećni papir. Na taj način osigurano je da eksplantat boravi na granici tekućine i zraka.

Eksplantati su uzgajani u termostatu minimalno 3 dana ili do 14 dana u inkubatoru u uvjetima sa 5% CO<sub>2</sub> i 95% zraka na temperaturi od 37 °C (62). Medij je promijenjen trećeg, petog, sedmog, desetog, dvanaestog i četrnaestog dana, a iskorišteni medij pohranjen na -80 °C.

Nakon dva tjedna kulture kultivirani eksplantati koji su se razvili u teratome sa tkivnim derivatima zametnih listića su smrznuti na -80°C ili fiksirani za klasičnu histološku ili imunohistokemijsku obradu (vidi: 3.4).

#### 4.2.3. Osnovni medij za kultivaciju

Eksplantirani zametni štitovi i konusi kultivirani se u kemijski definiranom, Eaglovom esencijalnom mediju (MEM, engl. *minimum essential medium* Eagle; Lonza, Verviers, Belgija) uz dodatak 50% štakorskog seruma (63). MEM ne sadrži proteine, već se sastoji od 13 aminokiselina, 8 vitamina, glukoze, fenolnog crvenila (indikator pH), penicilina i streptomicina.

Za održavanje konstantnog pH u medij su dodane Hanksove soli, a ostali dodaci su L-glutamin (#3MB042), penicilin (#3MB149) i streptomicin (#3MB149), kupljeni od tvrtke Lonza (Verviers, Belgija), a tako pripremljeni medij skladišten je na +5 °C.

Serum za kultivaciju izoliran je iz krvi štakorskih mužjaka. Krv je izolirana iz bifurkacije aorte jednokratnom iglom i odmah centrifugirana, a dobiveni serum inaktiviran inkubacijom na 56 °C u roku od pola sata te je potom profiltriran kroz špricu sa filterom (Millipore), alikvotiran i pohranjen na -20 °C.

Na ovaj način kultivirani su kontrolni eksplantati zametnih štitova i konusa (kontrolna skupina), dok je u eksperimentalnim skupinama (VPA skupine) u medij dodan i epigenetički lijek (vidi 4.2.4).

#### 4.2.4. Tretman sa valproatom

U ekperimentalnoj skupini, prije nasađivanja eksplantata u posudice za kulturu u medij za kulturu dodan je epigenetički lijek valproat (#P4543; Sigma St. Louis, MO, SAD) te je takav medij stavljen u posudice s eksplantatima.

Koncentracija valproata u mediju odgovarala je terapijskoj koncentraciji i iznosila 1 mM i 2mM. Da bi se dobila ta koncentracija, odvagalo se 3,320 mg VPA te se otopilo u 5 mL MEM-a. Na taj način dobila se otopina MEM-a s VPA, koncentracije 4 mM. Potom je u tu otopinu dodano 5 mL štakorskog seruma kako bi se dobila koncentracija VPA u mediju od 2 mM i dodatno razrijedila 50% za koncentraciju od 1 mM.

Eksperimentalna skupina je kultivirana uvijek istovremeno sa eksplantatima kontrolne skupine, te je istovremeno postavljena i po jedna posudica samog medija sa i bez VPA (u daljnjem tekstu slijepe probe). Eksplantati su kultivirani tijekom 3 dana (konusi) ili 14 dana (zametni štitovi). Pritom je prilikom promjene medija u posudice VPA skupine (vidi 4.2.2.) dodana ponovno svježe pripremljena otopina epigenetičkog lijeka u dvije koncentracije.

#### 4.2.5. Analiza preživljenja eksplantata

Preživljenje eksplantata u dvotjednoj kulturi određeno je pod lupom tijekom kulture (neki eksplantati su se raspali i nestali) te svjetlosnim mikroskopom nakon kulture kada je u njima otkrivena potpuna nekroza bez preživjelih stanica (69).

#### 4.2.6. Mjerenje rasta eksplantata

Rast eksplantata praćen je mjerenjem većeg i manjeg promjera pomoću okularnog mikrometra postavljenog u binokularnu lupu na povećanju od 1,6 puta, što

je prije pokazano da odgovara količini nukleinskih kiselina i proteina u uzorku (65).

Promjeri su mjereni tijekom izmjene medija u kulturi. Broj mjerenja ovisio je o trajanju kulture. U trodnevnoj kulturi, promjeri su se mjerili dvaput, tj. odmah nakon nasađivanja te na kraju kulture (mjerenje 0. i 3. dan). Tijekom 14-dnevne kulture promjeri su se određivali šest puta (0., 3., 6., 10., 12. i 14. dan). Dobivene vrijednosti uvrštene su u formulu za površinu elipse ( $A = \text{area}$ ):  $A = \pi \cdot \text{veći promjer} \cdot \text{manji promjer} / 4$  (2, 4).

Izračunate  $A$  vrijednosti po danima mjerenja normalizirane su dijeljenjem s inicijalnom vrijednosti mjerenja nultoga dana ( $A_0$ ) i kao takve korištene su za mjeru rasta ( $A/A_0$ ) u određenom danu.

### 4.3. FIKSACIJA I KLASIČNA HISTOLOŠKA OBRADA

Posljednjeg dana kulture lećni papirići sa razvijenim teratomima odignuti su s mrežice i isprani u PBS-u. Pod binokularnom lupom su odvojeni od lećnog papira. Zatim su, za klasičnu histološku obradu i imunohistokemiju fiksirani u fiksativu „St. Marie“, ohlađenom na +4 °C. Fiksativ se sastoji od 96%-tnog alkohola i 1%-tne ledene octene kiseline (+4 °C) koja se dodaje neposredno prije fiksacije. Završetkom 24 satnog fiksiranja, teratomi su isprani i dehidrirani uranjanjem u otopine uzlaznog niza alkohola (96% i 100% etanola, svaki 2 x 20 minuta) i benzola (1 x 30 minuta), te uklopljeni uranjanjem u tekući parafin na 56 °C (postupak prožimanja parafinom ponovljen je 3 puta, uvijek sa svježim parafinom).

Parafinski blokovi su izrezani na rotacijskom mikrotomu (Leica) na serijske rezove debljine 5  $\mu\text{m}$ . Dio rezova je obrađen i obojen klasičnom metodom hemalaun-eozin (HE) za promatranje svjetlosnim mikroskopom.

## 4.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA

Imunohistokemijske metode u analizi ekspresije proteina su primijenjene, koristeći osnovni princip imunologije da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen, na parafinskim rezovima u svrhu analize stanične proliferacije i programirane stanične smrti (apoptoze) nakon tretmana valproatom. Također, putem diferencijacijskih biljega, analizirana je i diferencijacija eksplantiranih zametnih štitova i konusa u dvotjednoj kulturi.

Za ovu analizu je dio serijskih rezova teratoma eksperimentalnih i kontrolnih skupina debljine 5  $\mu\text{m}$  stavljen na silanizirana stakalca (S3003; DAKO, Glostrup, Danska). Stakalca su ostavljena da se suše na zraku kroz 24 sata pri sobnoj temperaturi.

### 4.4.1. Primarna protutijela

U imunohistokemijskoj metodi korištena su niže navedena protutijela kao biljezi ciljnih proteina važnih za procese rasta, apoptoze i diferencijacije. Razrijeđenja protutijela navedena su u Tablici 1.

Proliferacija stanica detektirana je pomoću mišjeg monoklalnog protutijela na nuklearni antigen proliferirajućih stanica (PCNA) (M0879; DAKO, Glostrup, Danska). Stanice u apoptozi obilježene su poliklonalnim zečjim protutijelom na pocijepanu kaspazu-3 (Asp 175) (#9661; Cell Signalling Technology (CST), Danvers, SAD). Zatim, za analizu diferencijacije u dvotjednoj kulturi korištena su monoklalna zečja protutijela na biljege diferenciranih stanica: neurofilament 1 (NF) (ab40796, Abcam), nuklearni faktor 4 $\alpha$  hepatocita (HNF4 $\alpha$ ) (ab41898, Abcam), citokeratin 15 (ab52816, Abcam), aktin glatkog mišića (ab32575, Abcam), glijalni fibrilarni kiseli protein (ab68428, Abcam), mišje monoklono protutijelo na CD36 (AV48129, Sigma-Aldrich) i nestin (ab6142, Abcam).



**Tablica 1.** Osobine protutijela korištenih za imunohistokemijsku analizu

Protutijelo	Tip	Izvor	Proizveo	Šifra	Razrjeđenje
<b>PCNA</b>	monoklonalno	miš	Dako	M0879	1:100
<b>Pocijepana kaspaza 3</b>	monoklonalno	zec	CST	#9661	1:200
<b>NF1</b>	monoklonalno	zec	Abcam	ab40796	1:8000
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	monoklonalno	zec	Abcam	ab41898	1:1000
<b>citokeratin15</b>	monoklonalno	zec	Abcam	ab52816	1:1000
<b>Aktin glatkog mišića</b>	monoklonalno	zec	Abcam	ab32575	1:1000
<b>CD36</b>	monoklonalno	miš	Sigma- Aldrich	AV48129	1:200
<b>Nestin</b>	monoklonalno	miš	Abcam	ab6142	1:1000
<b>Acetilirani histon H3K9ac</b>	poliklonalno	zec	Abcam	ab10812	1:250
<b>Rb- Retinoblastomski protein</b>	poliklonalno	zec	Abcam	ab6075	1:75
<b>GFAP-glijalni fibrilarni kiseli protein</b>	monoklonalno	zec	Abcam	ab68428	1:500

#### 4.4.2. Imunohistokemijska metoda

Za detekciju primarnih protutijela koristila se indirektna EnVision™ metoda bojenja u dva koraka (295) sukladno protokolu proizvođača DAKO Horse Radish Peroxidase (HRP) kita ili putem odgovarajućih sekundarnih protutijela tvornički konjugiranih sa peroksidazom iz hrena (Abcam 97051), također prema uputama proizvođača.

Nakon deparafinizacije u ksilolu, rezovi su rehidrirani provlačenjem stakalaca kroz niz otopina: 100%-, 96%-, 70%-tni etanol (svaki 2 x 5 minuta). Potom je slijedilo ispiranje u destiliranoj vodi 30 sekundi i uranjanje u TBS 5 minuta. Demaskiranje (engl. *retrieval*) antigena izvedeno je metodom kuhanja stakalaca u mikrovalnoj pećnici u prethodno zagrijanoj otopini ChemMate™ target retrieval solution (x10) (S2031; DAKO, Glostrup, Danska). Stakalca sa rezovima uronjena su u vruću otopinu kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi, zagrijana 30 sekundi u mikrovalnoj pećnici te ostavljena

u mikrovalnoj pećnici 5 minuta. Postupak je ponovljen 3 puta. Na kraju je otopina s stakalcima ostavljena da se ohladi 30 minuta na sobnoj temperaturi. Stakalca su potom premještena u TBS pufer (engl. *TRIS-buffered saline*) 5 minuta. Prije stavljanja kemikalija na njih, rezovi su zakruženi masnom olovkom (S2002; DAKO, Glostrup, Danska) kako bi se napravili „bazečići“.

Slijedilo je blokiranje endogenih peroksidaza otopinom priređenom neposredno prije upotrebe (100 mL = 75 mL metanola, 25 mL destilirane vode i 75 mL 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), kroz 30 minuta namakanja stakalaca u mraku. Nakon toga stakalca su isprana u TBS puferu 3x5 minuta.

Za blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela na rezove je nakapan kozji serum (10% kozji serum razrijeđen s 1% BSA/TBS) ostavljen 20 minuta. Višak seruma je potom otresen sa rezova te je na njih stavljeno primarno protutijelo prethodno razrijeđeno u 1%BSA/TBS/0.05%Tween20 (Tablica 1). Rezovi su inkubirani s primarnim protutijelima u vlažnoj komori preko noći na +4 °C, osim za primarno protutijelo na acetilirani histon H3K9ac, gdje je inkubacija trajala samo 8 minuta, te je slijedio dolje opisan protokol kao za drugi dan imunohistokemijske obrade. Na svakom staklu po jedan rez je nakapan sa samo puferom za razrjeđivanje protutijela (1%BSA/TBS/0.05%Tween20), što je definirano kao negativna kontrola (296).

Drugi dan rezovi su dobro isprani u svježem TBS-u (5 x 5 minuta). Nakon slijedila je inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim protutijelom (Tablica 3) koje je konjugirano sa peroksidazom iz hrena. Ovisno o specifičnosti vrste (miš ili zec) korišteno je protutijelo iz kože specifično za zečje imunoglobuline (goat anti-rabbit Igg, 90751, Abcam) razrijeđeno u 1%BSA/TBS u omjeru 1:1000 ili tvornički razrijeđeni HRP označeni polimer konjugiran sa sekundarnim protutijelima miša i zeca (HRP Labelled Polymer, K500711-2, DAKO/Agilent, Glostrup, Danska). Sekundarno protutijelo ostavljeno je 45 minuta, nakon čega su rezovi isprani 1 x 5 minuta u TBS puferu.

Signal, tj. prisutnost vezanog protutijela, vizualiziran je inkubacijom rezova s otopinom kromogena DAB+ Chromogen (3,3'-diaminobenzidin) i supstrata za peroksidazu (K3468, DAKO/Agilent, Glostrup, Danska) kroz 3 minute, odnosno dok se nije uočena promjena boje u smeđu. Reakcija je zaustavljena uranjanjem stakalaca

u destiliranu vodu 2 puta. Rezovi su nadalje kontrastirani uranjanjem u otopinu hematoksilina 2 minute, te isprani u hladnoj vodovodnoj vodi tijekom 20 minuta dok ne dobiju plavkastu boju. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi, rezovi su dehidrirani uranjanjem u posudice sa otopinama rastuće koncentracije etanola (od 70 do 100%, po 5 minuta) te izbistreni inkubacijom u otopini ksilola (3 x 5 minuta). Stakalca su potom pokrivena medijem za uklapanje (DPX, 06522, Sigma) i ostavljena da se osuše u digestoru 24 sata.

#### **4.5. ODREĐIVANJE PROLIFERACIJSKOG INDEKSA**

Proliferacija u eksplantatima analizirana je određivanjem proliferacijskog indeksa koji se izračunava tako da se broj stanica pozitivnih za marker proliferacije (ili mitotičkih figura) podijeli sa ukupnim brojem pregledanih stanica po uzorku (297). U ovom radu, nasumično je odabrano 6 uzoraka sa po 4 stakla imunohistokemijski obojanih na PCNA biljeg iz svake eksperimentalne i kontrolne skupine. Pod svjetlosnim mikroskopom Nikon TE300 pod povećanjem od 1000 puta pregledano je ukupno 800 stanica po stakalcu među kojima su izbrojane PCNA-pozitivne stanice.

#### **4.6. STEREOLOŠKA METODA ODREĐIVANJA VOLUMENSKJE GUSTOĆE**

Razlike u izražajnosti pocijepane kaspaze 3 između eksperimentalnih grupa i kontrole kvantitativno su analizirane pomoću relativne stereološke varijable volumenske gustoće ( $V_v$ ) koja koristi stereološku okularnu mrežicu sa oznakama (tzv. testnim točkama). Volumenska gustoća je odnos između pogodaka/oznaka koje prekrivaju kaspaza 3-pozitive jezgre ( $P_i$ ) i pogodaka/oznaka koje prekrivaju referentno područje ( $P_t$ ) ( $V_v = P_i/P_t$ ), a izražava se u  $\text{mm}^0$  ( $\text{mm}^3/\text{mm}^3$ ) (39, 298).

Nasumično je odabrano po 6 parafinskih blokova iz svake eksperimentalne grupe za stereološku analizu stanica s kaspaza 3-pozitivnim signalom. Iz serije narezanih parafinskih rezova svakoga bloka, slučajnim odabirom izdvojilo se 5-10

imunohistokemijski obrađenih rezova, pazeći pritom da su rezovi dovoljno udaljeni (najmanje 20 mikrometara) kako se ne bi brojale iste stanice. Rezovi su analizirani pod binokularnim svjetlosnim mikroskopom "Nikon Alphaphot" pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sistema s 42 (M 42) testne točke, pri povećanju od 400 puta. Za određivanje potrebnog broja testiranih vidnih polja, napravljeno je stereološko mjerenje na orijentacijskom uzorku od 10 vidnih polja i broj potrebnih polja ( $n$ ) izračunat uz 95%-tni interval povjerenja prema DeHoff-ovoj formuli:

$$n = (20 \cdot s/x)^2$$

gdje je „ $n$ “ broj polja koje treba analizirati,  $x$  je aritmetička sredina orijentacijskog uzorka,  $s$  je standardna devijacija orijentacijskog uzorka (299). Pri 95%-tnom intervalu povjerenja, izračunati broj testnih vidnih polja „ $n$ “ ne odstupa od vrijednosti prosjeka za više od 10%. Izbrojeno je minimalno 90 polja po uzorku.

## 4.7. WESTERN BLOTTING ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA

Da bismo odredili *in vitro* učinak valproata kao inhibitora histonskih deacetilaza, određena je razina acetilacije histona u teratomima nakon dvotjedne kulture. Kako bi se osigurala dovoljna količina tkiva za potrebe analize proteina metodom Western blot, eksplantati iz dvotjedne kulture (samo teratomi razvijeni od eksplantiranih zametnih štitova) sabrani su, tj. pulirani u jedinstveni uzorak (svaka skupina u jednu epruveticu). Pulirano je 10-15 eksplantata.

### 4.7.1. Homogenizacija tkiva

Za potrebe analize proteina Western blot metodom, 14. dan kulture *in vitro* lećni je papir s teratomima pincetom prebačen u Petrijevu zdjelicu s PBS-om. Nakon 5 minuta ispiranja u većem volumenu PBS-a na sobnoj temperaturi uz laganu agitaciju, uzorci su pod binokularnom lupom uz pomoć oštrice skalpela lagano odignuti s lećnog papira i prebačeni u sterilnu epruvetu volumena 0,5 mL. U epruvetu je prethodno

stavljeno 100  $\mu\text{L}$  homogenizacijskog pufera za radioimunoprecipitacijsku analizu (RIPA) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, Na Deoxycholate 0,5%, [Merck] X-100 1%, pH 8,0) uz dodatak 1% 0,5 M EDTA pH 8,0 i 4% koktela inhibitora proteaza (Complete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche). Tijekom prikupljanja eksplantata, kolekcijska je epruveta bila držana na ledu što je omogućavalo održavanje ukupnog uzorka na niskoj temperaturi. Po dovršetku prikupljanja uzoraka (maksimalno trajanje postupka je bilo jedan sat), kolekcijska je epruveta kratko centrifugirana i pohranjena na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Za homogenizaciju, u svaku kolekcijsku epruvetu dodano je 10 sterilnih staklenih kuglica promjera 1,0-1,51 mm (Retsch). Homogenizacija je provedena na vibracijskom homogenizatoru (Bertin) u trajanju od 2 minute na 5.000 rpm.

#### **4.7.2. Mjerenje koncentracije proteina**

Odmah nakon homogenizacije određena je koncentracija proteina u homogenatima metodom s bicinkoniničnom kiselinom (BCA, Sigma) (300). U tu svrhu po 5  $\mu\text{L}$  homogenata razrijeđeno s  $\text{dH}_2\text{O}$  do konačnog volumena 25  $\mu\text{L}$  (razrjeđenje 1:5). Uzorci su inkubirani 30 min pri  $37^{\circ}\text{C}$  s 200  $\mu\text{L}$  otopine dobivene miješanjem BCA s 4% otopinom  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) u volumnom omjeru 8:1. Nakon što su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu, intenzitet obojenja otopine izmjeren je pri valnoj duljini od 562 nm na spektrofotometru Tecan Spark (Tecan). Koncentracija proteina u uzorcima očitana je iz baždarnog pravca. Kao standardna otopina proteina rabljena je otopina BSA u  $\text{dH}_2\text{O}$  (područje koncentracija 100 – 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , odnosno 0,01 – 1,0  $\text{mg}/\text{mL}$ ). Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su i očitani u duplikatu. Nakon mjerenja koncentracije, koncentracije proteina uvećane su u vakuumskom koncentratoru (Eppendorf) 20 minuta na  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Krajnja koncentracija proteina u uzorku izračunata je kao umnožak izmjerene koncentracije i količinom volumena.

### 4.7.3. Semikvantitativna *Western blotting* metoda

Ovisno o krajnjoj koncentraciji, izračunati volumen homogenata prebačen je u novu sterilnu epruvetu od 1,5 mL te razrijeđen sa homogenizacijskim puferom kako bi se dobio jednak ukupni volumen od 35  $\mu\text{L}$  i jednaka krajnja koncentracija od 1,6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  u svim uzorcima. Tako normalizirani homogenati iste koncentracije korišteni su dalje u analizama, a dodan im je odgovarajući volumen Laemmli pufera 4X (Tris HCl 0,1875 M, glicerol 20%,  $\beta$ -merkaptotanol 5%, SDS 6%, bromfenol plavo 0,1%, u  $\text{dH}_2\text{O}$ , pH 6,8) (Sigma, St.Louis, SAD) do konačnog volumena od 47  $\mu\text{L}$  (odnosno konačne koncentracije proteina 1,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Tako priređeni uzorci prokuhani su 5 min na 96°C i pohranjeni na -20°C do daljnje upotrebe.

Metoda Western blottinga, odnosno sastavi pufera i vremena trajanja određenih koraka elektroforeze i blottinga, napravljena je prema protokolu proizvođača sustava (Biorad).

Priređeni uzorci normaliziranih inaktiviranih homogenata tkiva podvrgnuti su diskontinuiranoj denaturirajućoj gel-elektroforezi proteina provedenoj u 5% sabijajućem i 15% razdvajajućem poliakrilamidnog gelu, debljine 0,5 mm, prema metodi po Laemmliju (301). Pritom je korišten Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad,1660828EDU). U pojedinu je jažicu unijeto po 15  $\mu\text{L}$  uzorka. Uzorak kaleidoskopskog proteinskog markera Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (BioRad) nanošen je u volumenu od 5  $\mu\text{L}$ .

Elektroforezom razdvojeni proteini prenešeni su na PVDF Immobilon membranu (Millipore) u uređaju za vlažan elektroforetski prijenos Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, 1660828EDU) sukladno uputama proizvođača u trajanju od 45 minuta. Membrane su potom uzdužno razrezane na nekoliko dijelova kako bi trake PVDF Immobilon membrane uključivale područje očekivanog položaja proteina od interesa.

Trake membrana su inkubirane 1 sat u puferu za blokiranje membrane (BSA (Sigma) 3% u TBST puferu: Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, 0.1% Tween-20 (Roth), u  $\text{dH}_2\text{O}$ , pH 7,5), u svrhu sprečavanja nespecifičnog vezanja proteina na slobodna vezna mjesta na membrani. Potom su trake membrana, izrezane skalpelom na

staklenoj podlozi, izložene specifičnim primarnim protutijelima u određenim koncentracijama na +4°C uz kontinuirano gibanje na treskalici kroz 24 sata. Primarno poliklonalno protutijelo na acetilirani histon H3 (H3K9ac, ab10812, Abcam ) primijenjeno je u razrjeđenju od 1:500 u otopini 3% BSA/TBST. Za kontrolu i normalizaciju stavljeno je i kontrolno protutijelo na alfa-tubulin (ab52866, Abcam) u razrjeđenju od 1:10 000 u otopini 3% BSA/TBST odnosno histon H2B (Abcam, ab52484) u razrjeđenju 1:10000 kao kontrola za Rb protein. Membrane su zatim isprane (3 x 15 minuta) u puferu TBST te potom izložene vezanju odgovarajućeg sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom (Abcam ab97051, razrjeđenje 1:20 000 u 3% BSA/TBST) na sobnoj temperaturi uz kontinuirano gibanje tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Po ispiranju membrane 3 puta po 15 min u puferu TBST, iste su inkubirane s reagensom za pojačanu kemiluminiscenciju Immobilon Western (Millipore) prema uputama proizvođača, a zatim su vizualizirane korištenjem HRP-luminol kita ChemiDoc XRS+ (#1705060, Biorad) i računalnog programa za kvantifikaciju Image Lab™ 6.0 (Bio-Rad).

Isti računalni program korišten je za analizu denzitometrijskog signala po principu: dobivena denzitometrijska vrijednost razine pojedinog analiziranog proteina u uzorku normirana je na relativnu vrijednost razine signala referentnog proteina ( $\alpha$ -tubulin ili histon H2AB), a dobivena vrijednost normirana na standardni uzorak prema jednadžbi:

$$CUX = DUX \times DSH / DUH \times DSX$$

pri čemu CUX označava razinu proteina od interesa u analiziranom tkivu, DUX denzitometrijsku vrijednost razine proteina od interesa u analiziranom uzorku, DSH denzitometrijsku vrijednost razine referentnog proteina u standardnom uzorku, DUH denzitometrijsku vrijednost razine referentnog proteina u analiziranom uzorku, a DSX denzitometrijsku vrijednost razine proteina od interesa u standardnom uzorku (302).

Dobivene vrijednosti za grupu tretiranu valproatom su dalje normalizirane prema kontrolnim vrijednostima. Promjena (engl. *fold change*) manja od 0.5x i veća od 2.0x se smatrala statistički značajnom.

Po potrebi, membranska je traka bila izložena postupku „stripanja“ odnosno uklanjanja protutijela nakon vizualizacije, kako bi se ista membrana iskoristila za detekciju drugog proteina pomoću adekvatnog protutijela. Postupak uklanjanja

protutijela proveden je sukladno uobičajenom protokolu: membrana je inkubirana 45 minuta na 50 °C uz laganu agitaciju u otopini za uklanjanje protutijela (20 mL 10% SDS, 12,5 mL 0,5M Tris-HCl, 67,5 mL H<sub>2</sub>O, 0,8 mL β-merkaptoetanol), potom isprana 5 puta u TBST puferu u trajanju od 5 minuta te naposljetku blokirana u 3% BSA-TBST 1 sat na sobnoj temperaturi. Ovako obrađena membrana priređena je za ponovnu detekciju proteina pomoću protutijela te je navedeni protokol detekcije ponovljen kako je opisano. Tim postupkom analizirana je ekspresija Rb proteina.

## **4.8. ANALIZA METILACIJE DNA PIROSEKVENCIJANJEM**

Kako bi se osigurala dovoljna količina tkiva za potrebe analize metilacije DNA u svakoj pokusnoj skupini je analizirano po 6 pojedinačnih uzoraka/parafinskih blokova, što se pokazalo dovoljnim za statističku obradu (48).

### **4.8.1. Homogenizacija tkiva i mjerenje koncentracije DNA**

Za homogenizaciju tkiva korišten je uhodani protokol (303) uz modifikacije za parafinske uzorke.

Pojedinačni parafinski blokovi uzoraka su deparafinizirani uranjanjem u ksilol (2 x 5 min) i rehidracijom u 100%-95%-70%-tnom etanolu (po 3 min), te isprani u vodi. Nakon toga, 300 µL pufera za izolaciju DNA (TE pufer pH 9, 0,1 µg/µL Proteinaza K (Sigma) i 0,25% Nonidet P40). Svi uzorci inkubirani su na 56 °C preko noći. Uzorci su nakon inkubacije zagrijani na 95°C u trajanju 10 minuta kako bi se inaktivirala Proteinaza K. Koncentracija DNA izmjerena je na spektrofotometru NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Izračunati volumen homogenata dekantiran je u sterilnu epruvetu (1,5 mL) te dodan izračunat volumen mQH<sub>2</sub>O, kako bi se postigla ujednačena koncentracija svih uzoraka od 50 ng/µL. Ti su alikvoti dalje korišteni u postupku analize metilacije DNA pirosekvenciranjem, te pohranjeni na -20 °C. Homogenati su također pohranjeni na -20 °C kao rezervni materijal.



#### 4.8.2. Bisulfitna konverzija genomske DNA

Genomska DNA je modificirana reakcijom bisulfitne konverzije gdje se DNA miješa na natrijevim bisulfitom koji nemetilirane citozine, preko tranzicije u uracile, mijenja u timine, dok metilirani citozini ne reagiraju i ostaju intaktni (304). Bisulfitna konverzija provedena je na uzorcima DNA teratoma iz dvotjedne kulture pomoću EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (#59124, Qiagen) prema uputama proizvođača. Po 20  $\mu\text{L}$  uzorka DNA (supernatanti koncentracije DNA 50 ng/ $\mu\text{L}$ ) odnosno 1000 ng stavljeno je u PCR epruvetu. Dodano je 85  $\mu\text{L}$  Bisulfite Mix-a i 35  $\mu\text{L}$  DNA Protect Buffera i dobro promiješano. PCR epruvete su položene u PCR uređaj (Biorad) te je pokrenut sljedeći program: 95°C 5 min, 60°C 25 min, 95°C 5 min, 60°C 85 min, 95°C 5 min, 60°C 2 sata i 55 minuta te 4°C do 20 sati. Nakon navedenog koraka, ukupan volumen svakog uzorka iz PCR epruvete prebačen je u zasebnu sterilnu epruvetu od 1,5 mL. U svaki uzorak je dodano 310  $\mu\text{L}$  pufera BL i promiješano, zatim je dodano 250  $\mu\text{L}$  96% etanola i promiješano, cjelokupni sadržaj epruveta je prebačen u zasebnu spin kolonu. Spin kolone su centrifugirane na maksimalnoj brzini 1 min, nakon čega je supernatant odbačen. U spin kolone je potom dodano 500  $\mu\text{L}$  desulfonacijskog pufera za ispiranje i ostavljeno na sobnoj temperaturi 10 min, nakon čega su kolone centrifugirane na maksimalnoj brzini 1 min i filtrat je odbačen. Dva puta je ponovljen navedeni korak, a potom je u svaku spin kolonu je 500  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje, centrifugirano na maksimalnoj brzini 1 min te je supernatant odbačen. Spin kolone su potom prebačene u nove epruvete od 2 mL i centrifugirane na maksimalnoj brzini 1 min, kako bi se uklonila preostala tekućina. Spin kolone su prebačene u sterilne epruvete od 1,5 mL, te je na membranu kolone dodano 20  $\mu\text{L}$  elucijskog pufera, inkubirano na sobnoj temperaturi 1 min i centrifugirano na 15 000 g 1 min. Na ovaj način se sa membrane kolone eluira bisulfitno konvertirana DNA. Korak elucije je ponovljen i epruvete sa 40  $\mu\text{L}$  elutirane bisulfitno konvertirane DNA koncentracije 25 ng/ $\mu\text{L}$  su pohranjene na -20°C za daljnju analizu.

Za umnožavanje promotorskih regija repetitivnih elemenata od interesa korištene su početnice iz literature (305). U svim reakcijama korišten je PyroMark PCR Kit (#978703, Qiagen) prema uputama proizvođača. Uvjeti PCR reakcije od 40 ciklusa

bili su: denaturacija na 95°C 2 min, vezanje početnica na 43°C 90 s i elongacija na 72°C 60 s sa 40 ciklusa. Korištene su navedene početnice: prednja (engl. *forward primer*): 5'-GGGTTGGGGATTTAG-3' i biotinizirana stražnja početnica (engl. *reverse biotinylated primer*): 5'-AACCCAAAACCTTA-3'. Sekvence početnica i temperature elongacije vizualizirane su tijekom postupka optimizacije elektroforezom na 2% agaroznom gelu u 1xTAE puferu, koristeći 5 µL PCR produkata. Istom metodom identificirani su uzorci s uspješnom amplifikacijom DNA. Amplificirani uzorci pohranjeni su na +4°C do postupka pirosekvenciranja.

### 4.8.3. Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje je provedeno korištenjem PyroMark Q24 Advanced pirosekvencera (Qiagen), PyroMark Q24 Advanced Software računalnog programa (Qiagen), PyroMark Q24 vakuumske radne stanice (Qiagen), PyroMark Q24 Advanced Reagents kitova (Qiagen), PyroMark Denaturation Solution (Qiagen), PyroMark Wash Buffer (Qiagen) te adekvatnih početnica za pirosekvenciranje (Sigma-Aldrich). Pirosekvenciranje je provedeno prema uputama proizvođača te prema dosad uspostavljenom protokolu (48).

Za analizu je u pojedinu jažicu PCR pločice prebačeno 20 µL PCR produkata pojedinog uzorka. Pločica je kratko centrifugirana kako bi se volumeni PCR produkta spustili na dno jažice. U svaku jažicu dodano je 2 µL zrnaca sefarnih kuglica (GE Healthcare), 18 µL miliQ vode i 40 µL otopine za vezivanje. PCR pločica postavljena je na termomikser C (Eppendorf) na 1400 rpm te ostavljena minimalno 10 min na sobnoj temperaturi. U međuvremenu pripremljena je pločica za pirosekvenciranje. U svaku jažicu pločice za pirosekvenciranje stavljeno je 20 µL otopine sekvencijske početnice za repetitivni element (sekvencijska početnica razrijeđena u vezujućem puferu na koncentraciju 0.375 mM). PCR pločica fiksirana je na vakuumsku radnu stanicu. Nastavci s filtrima vakuumske četke umetnuti su u jažice PCR pločice na 30 sekundi. Pod uključenim vakuumom, četka vakuumske pumpe umočena je u 70% etanol na 5 sekundi, pufer za denaturaciju na 5 s te u pufer za ispiranje na 10 sek. Nakon ispiranja, četka vakuumske pumpe postavljena je neposredno iznad prethodno

pripremljene pločice za pirosekvenciranje te je isključen vakuum. Četka vakuumske pumpe umočena je u jažice pločice za pirosekvenciranje s blagom trešnjom kako bi se zrnca gela s vezanim PCR produktima otpustila u otopine sekvencijskih početnica za pojedini gen. Nakon zagrijavanja na termomikseru (5 min na 80°C bez trešnje) uslijedilo je pirosekvenciranje. U međuvremenu, kazeta pirosekvencera je priređena te su u računalni program uneseni svi potrebni parametri, sukladno uputama proizvođača.

Nakon pirosekvenciranja, analizirani su pirogrami te je uslijedio izračun prosječne razine metilacije određenog analiziranog uzorka tkiva prema prikazanoj jednadžbi:  $MX = MU/NCpG$ , pri čemu MX označava prosječne razine metilacije određenog analiziranog uzorka tkiva, MU ukupan zbroj razina metilacije DNA analiziranih CpG točaka, dok NCpG broj analiziranih CpG točaka.

#### 4.9. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza učinjena je pomoću računalnog programa Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, SAD). U statističkoj obradi eksperimentalnih podataka dobiveni rezultati prikazani su mjerom centralne tendencije (aritmetička sredina) i mjerom disperzije (standardna pogreška) koristeći deskriptivnu statistiku.

U uvjetima normalne raspodjele značajnost razlika mjerenih parametara između eksperimentalnih skupina (mjera rasta (A/A0), volumenska gustoća kaspaze 3, proliferacijski indeks) testirana je prikladnim statističkim testovima (Student t-test ili ANOVA), dok su u suprotnim uvjetima korišteni Mann-Whitney U test za nezavisne uzorke ili Kruskal Wallis test. Za testiranje značajnosti razlike očekivanih i dobivenih frekvencija korišten je  $\chi^2$  test ili Fisherov test. Kao značajna razlika u svim pokusnim skupinama priznata je ona na razini stupnja vjerojatnosti od  $P < 0.05$ .

## 5. REZULTATI

U ovom radu upotrijebljeno je 40 ženki štakora soja Fischer kako bi se istražio utjecaj valproata (VPA) u terapijskim koncentracijama od 1 mM i 2 mM. Utjecaj valproata na razvoj zametka tijekom gestacije istražen je na 9.5 dana starim eksplantiranim zamecima u užem smislu, dakle zametnih štitova (tri zametna listića) u kulturi u *ex vivo* modelu, tj. u kulturi *in vitro* kroz 14 dana. Uz praćenje razvoja embrionalnog dijela zametka kroz 14 dana pratili smo i utjecaj VPA na ekto-placentalni konus kultiviran kroz 3 dana *in vitro*.

Prvi dio obuhvaća rezultate istraživanja utjecaja valproata na razvoj štakorskih zametaka u *in vitro* kulturi. Nakon analize rasta i preživljenja eksplantata slijedi analiza parametara stanične dinamike pod utjecajem valproata (proliferacija, apoptoza i diferencijacija stanica) uključujući rezultate imunohistokemijskog bojanja sa biljezima diferencijacije, uz klasičnu histologiju na razini svjetlosne mikroskopije. Uz prikaz proliferacijskog indeksa tretirane skupine, te volumske gustoće apoptotičnih stanica u eksplantatu prikazani su i imunohistokemijski biljezi proliferacije (PCNA) i apoptoze (pocijepana kaspaza 3). U drugom dijelu prikazani su rezultati analize utjecaja valproata na epigenetičke parametre koji uključuju acetilaciju histona, te globalnu metilaciju. Treći dio obuhvaća rezultate istraživanja utjecaja valproata na razvoj ekto-placentalnog konusa kultiviranog *in vitro* gdje se pratio njegov razvoj u trodnevnoj kulturi.

### 5.1. RAZVOJ ŠTAKORSKIH ZAMETAKA TRETIRANIH VALPROATOM *IN VITRO*

U ovom dijelu predstavljeni su rezultati istraživanja utjecaja valproata na razvoj zametka u užem smislu (kultiviranog bez ekstraembrionalnih ovojnica). Pratili su se parametri preživljenja i rasta zametaka kroz 2 tjedna kulture. Nakon 2 tjedna analizirana je proliferacija i diferencijacija stanica, budući da eksplantati u prvom tjednu rastu, a u drugom se razvijaju u teratomu slične strukture.

Na staničnoj razini potom je i istražen proapoptotični učinak valproata gdje su nakon njegovog dodatka u medij eksplantati kultivirani 3 dana te potom analizirani za pojavnost apoptoze.

### 5.1.1. Preživljenje štakorskih zametaka u kulturi *in vitro* s valproatom

U eksperimentima koji su trajali 2 tjedna analizirali smo preživljenje, odnosno pratili smo učestalost razvijenih teratoma nakon dva tjedna kultivacije.

U odnosu na kontrole, eksperimentalna skupina tretirana sa nižom koncentracijom valproata od 1 mM pokazala je još i bolje preživljenje jer su svi zameci preživjeli. Ipak, radilo se o minimalnoj, neznčajnoj razlici (Tablica 2).

Koncentracija od 2 mM valproata značajno je smanjila preživljenje zametaka - čak do 50 %, što je bilo statistički značajno u odnosu na kontrolu ( $P < 0.0001$ ) (Tablica 2).

**Tablica 2.** Preživljenje eksplantata nakon 2 tjedna *in vitro* kulture s valproatom (N = broj uzoraka).

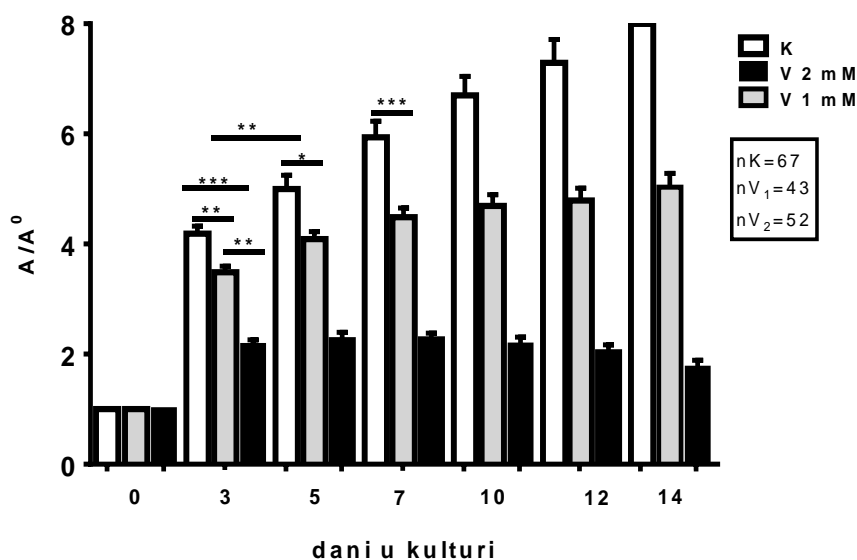
	K		VPA 1 mM		VPA 2 mM	
	N	%	N	%	N	%
<b>Eksplantirani zameci</b>	57	100	30	100	48	100
<b>Razvijeni teratomi <i>in vitro</i></b>	50 <sup>a</sup>	87.7	30	100	24 <sup>a</sup>	50

<sup>a</sup> Fischerov egzakti test,  $P < 0.0001$ .

### 5.1.2. Rast štakorskih zametaka u kulturi *in vitro* s valproatom

U svrhu analize utjecaja valproata na zametak *in vitro* mjereni su promjeri eksplantata elipsoidnog oblika prilikom izmjene medija u dvotjednoj kulturi, nakon čega je izračunata površina eksplantata. Tijekom 14-dnevne kulture mjerilo se šest puta (0., 3., 6., 10., 12. i 14. dan). Rezultati su prikazani grafički, zajednički za kontrolnu i eksperimentalne skupine tretirane sa valproatom.

Iz Slike 3 vidljivo je da je površina eksplantata koja predstavlja rast zametka značajno manja već od drugog mjerenja (3. dan) pa nadalje tijekom cijelog razdoblja kultivacije u skupinama tretiranim s valproatom: ( $P < 0.001$ ) za VPA 1 mM i ( $P < 0.0001$ ) za VPA 2 mM u odnosu na kontrole. Također, značajno manji rast i potpuna stagnacija rasta nakon 3. dana kulture, tj. veći supresivni učinak valproata na rast, uočava se kod zametaka tretiranih koncentracijom od 2 mM (gdje je i preživljenje manje) u odnosu na tretirane koncentracijom od 1 mM ( $P < 0,001$ ). Ako gledamo duljinu utjecaja lijeka u vremenskom intervalu, učinak valproata na rast u kulturi bio je sve supresivniji jer kontrolna skupina intenzivno raste tijekom prvog tjedna ( $P < 0.05$  za 5./7. dan, nije prikazano), dok skupina tretirana sa 1 mM valproata u početku značajno raste, no u periodu 5./7. nema više statistički značajnog porasta te je razlika u odnosu na kontrolu još izraženija (Slika 3).



**Slika 3.** Rast štakorskih zametaka 14 dana u kulturi *in vitro* s valproatom. Kruskall Wallis ANOVA, Mann Whitney test. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ .

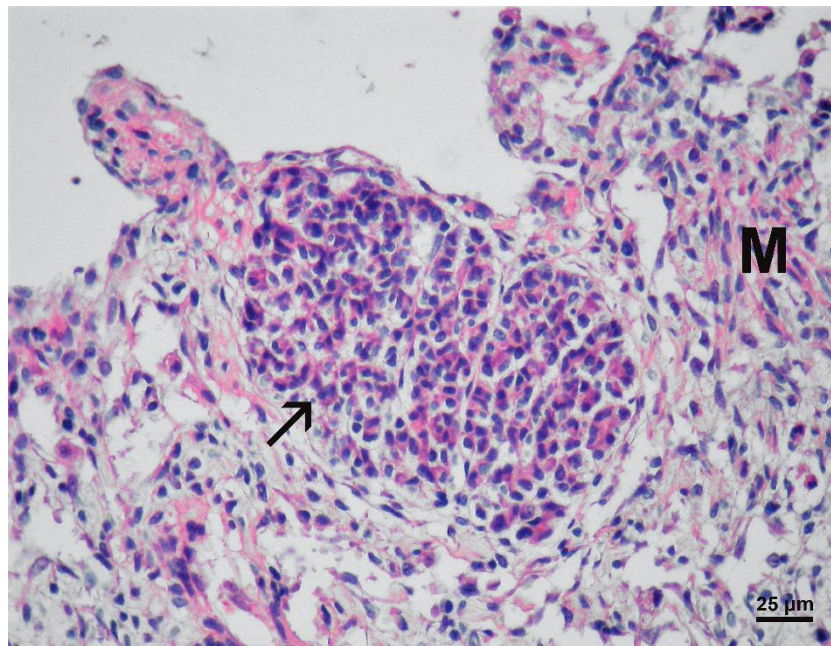
### 5.1.3. Diferencijacija štakorskih zametaka u dvotjednoj kulturi *in vitro* s valproatom

U ovom modelu dvotjedne kulture moguće je pratiti diferencijaciju tkiva u zametku, te smo istražili i učinak primjene valproata u kulturi na diferencijaciju tkiva. Kultivirani zametak u užem smislu (samo embrionalni dio zametka, zametni štit) se već od drugog dana do kraja drugog tjedna kulture diferencira u teratomu sličnu strukturu koja sadrži derivate triju zametnih listića.

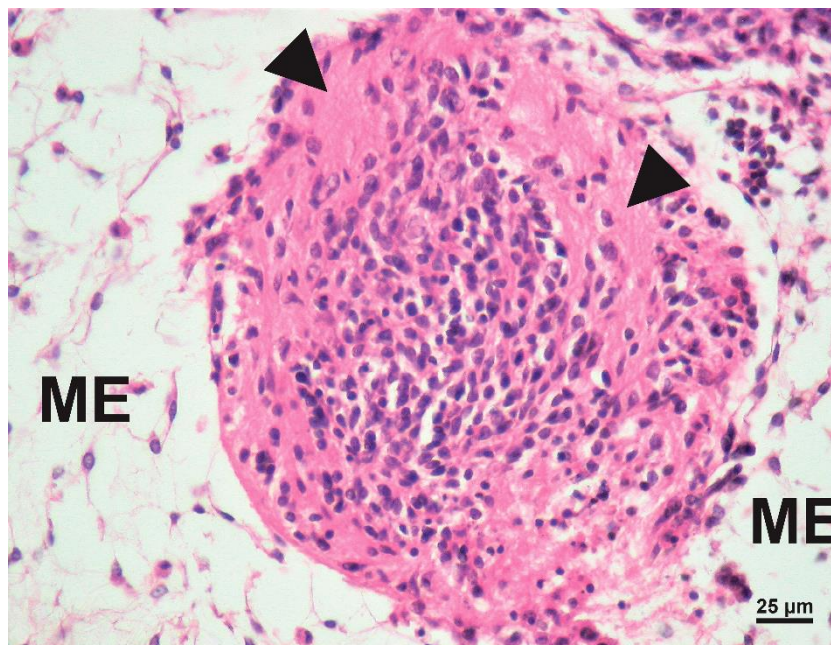
U kontrolnim eksplantatiranim zamecima diferencirali su se mišići (Slika 4, 7), neuralno tkivo (Slika 5, 7, 8, 10), epidermis (Slika 6, 10), višeredni cilindrični epitel s trepetljikama (Slika 7, 8), mezenhim (Slika 10), hrskavica (Slika 9) i ganglijske stanice (Slika 11).

U zamecima kultiviranim sa 1 mM VPA diferencirali su se također derivati svih triju zametnih listića, slično kao i u kontroli (Slika 12). Diferencirao se epidermis (Slika 12), mnogoslojni pločasti epitel (Slika 14), kao i derivati mezoderma: hrskavica i mezenhim (Slika 13), te brojna mišićna vlakna (Slike 13-15). Uočene su i ganglijske stanice (Slika 12), te neuralne stanice (Slika 16) koje tvore neuralne strukture. Višeredni cilindrični epitel prisutan je sa i bez trepetljika (Slike 15-17).

Primijenjena koncentracija VPA od 2 mM u mediju za kulturu tijekom 14 dana imala je izraziti negativni učinak na diferencijaciju. Tek je sporadično nađen epidermis, hrskavica i mišićno tkivo (Slika 18), a još u manjoj mjeri cilindrični epitel (Slika 17) te ponegdje neuroblasti. U ovoj skupini brojni su eksplantati bili su djelomično nekrotični.

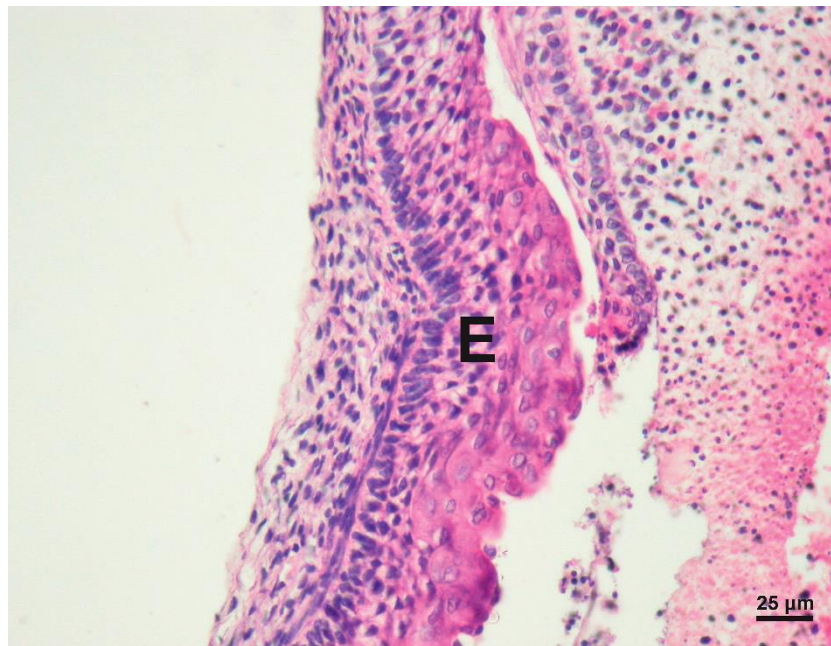


**Slika 4.** Mišićno tkivo (M) te osnova žlijezde (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, kontrola, HE.

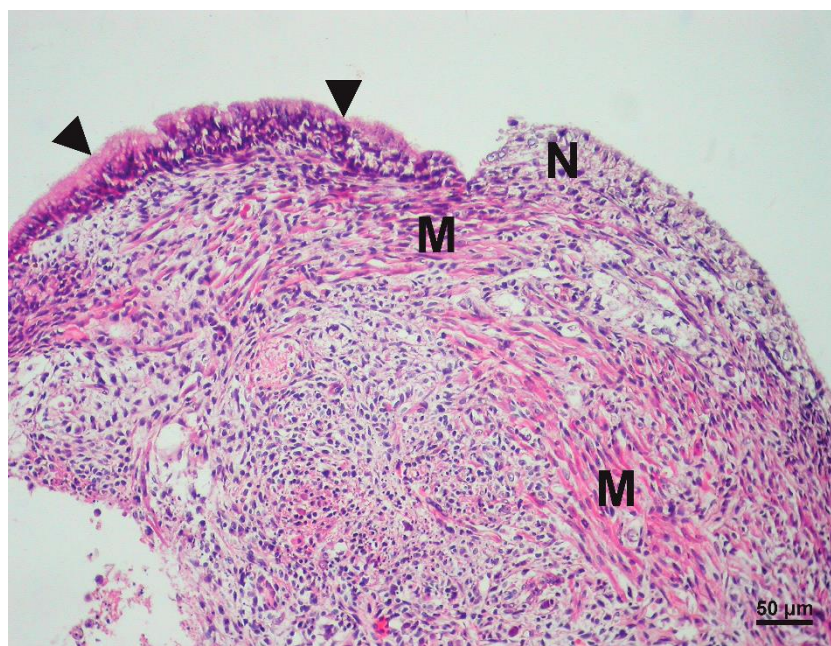


**Slika 5.** Neuralno tkivo u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro*, kontrola. ME – mezenhim, glava strjelice – neuropil, HE.

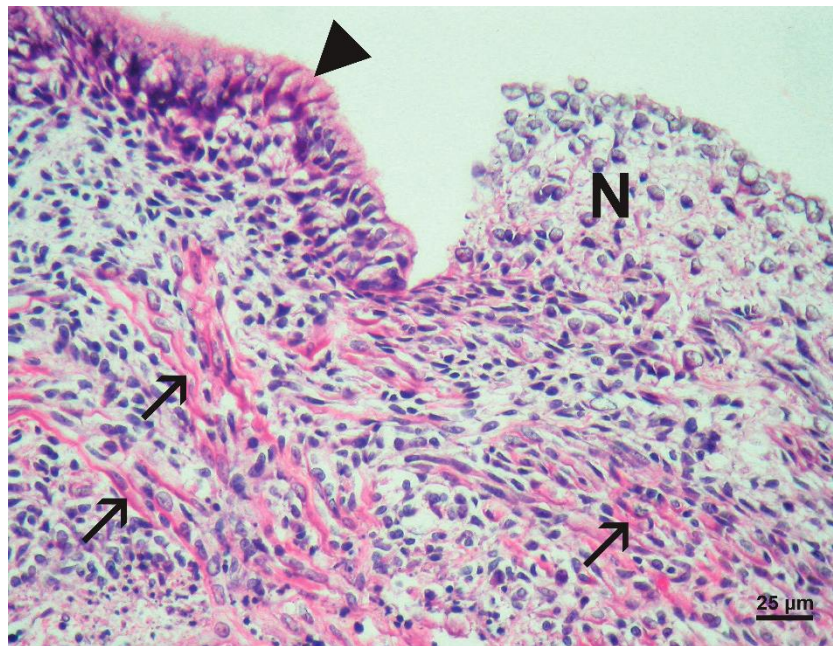




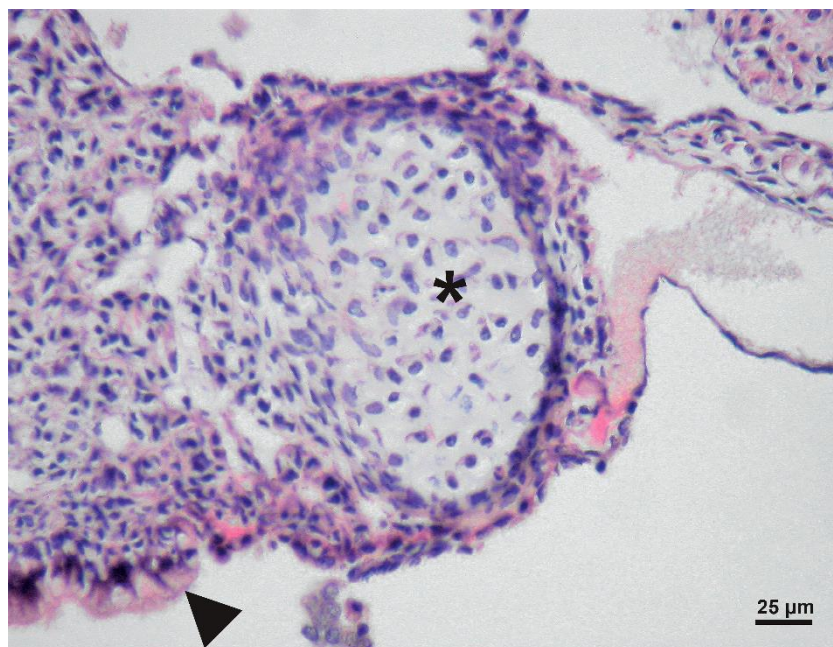
**Slika 6.** Epidermis (E) u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro*, kontrola, HE.



**Slika 7.** Diferencijacija u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro*, kontrola. Glava strjelice – višeredni cilindrični epitel s trepetljikama, N – neuralno tkivo, M – mišići, HE.

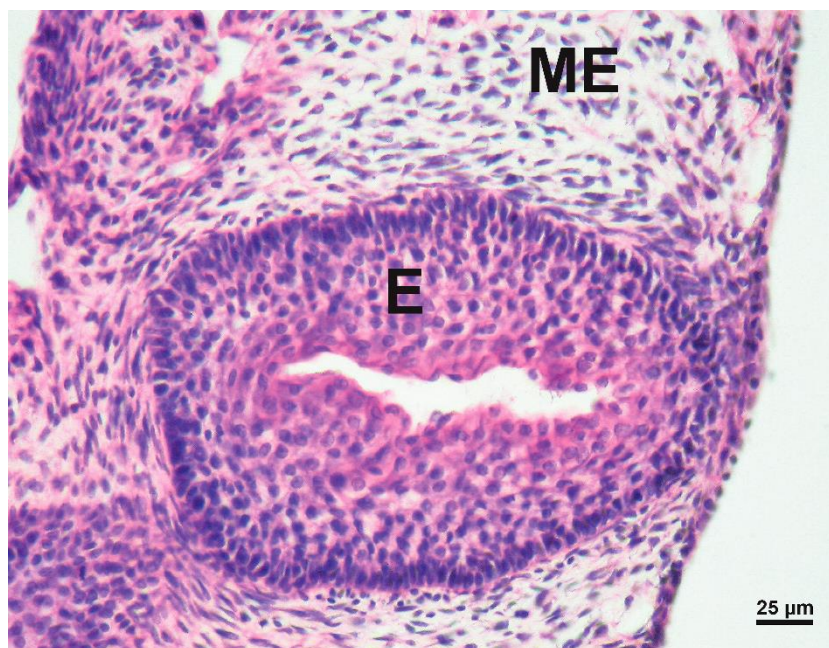


**Slika 8.** Detalj slike 7: diferencijacija u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro*, kontrola. Glava strjelice – višeredni cilindrični epitel s trepetljikama, N – neuralno tkivo, strjelice – mišići, HE.

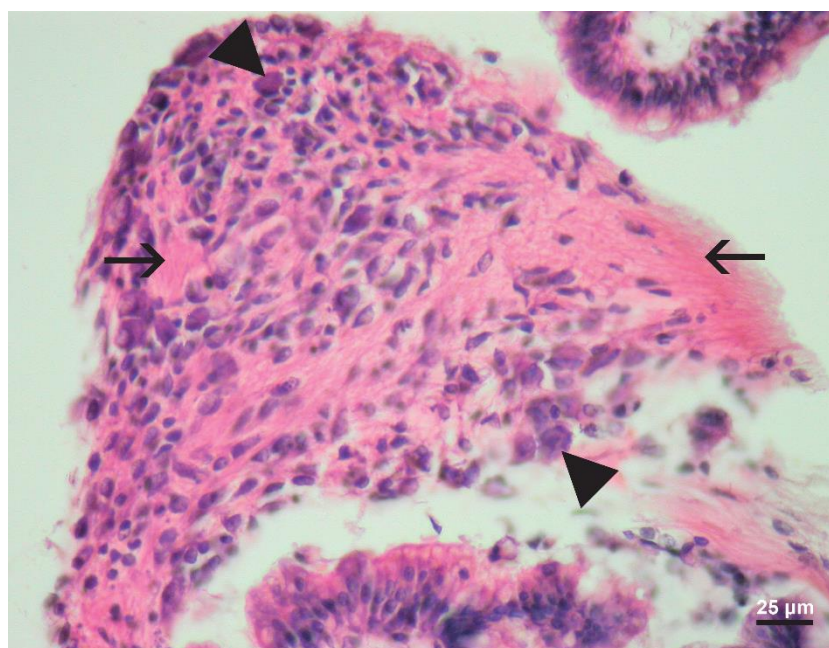


**Slika 9.** Hrvkavica (zvijezdica) u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro*, kontrola. Glava strjelice – višeredni cilindrični epitel s trepetljikama, HE.

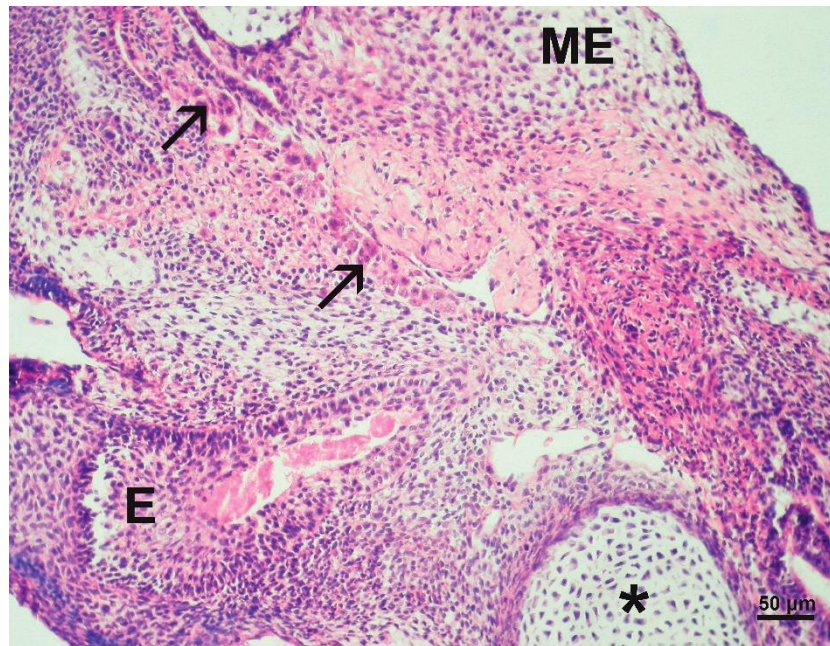




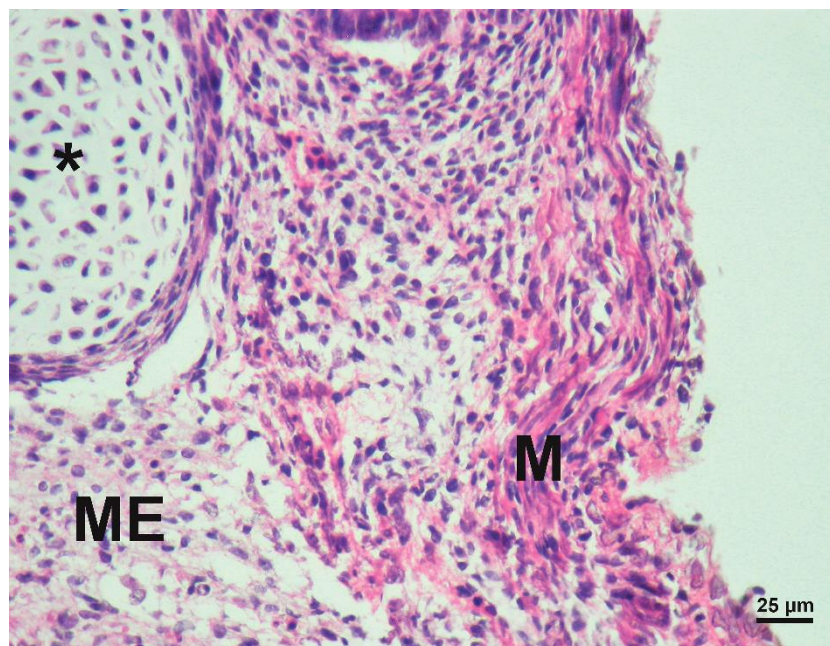
**Slika 10.** Epidermis (E) u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro*, kontrola. ME – mezenhim, HE.



**Slika 11.** Neuropil (strjelice), ganglijske stanice (glava strjelice) u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro*, kontrola, HE.

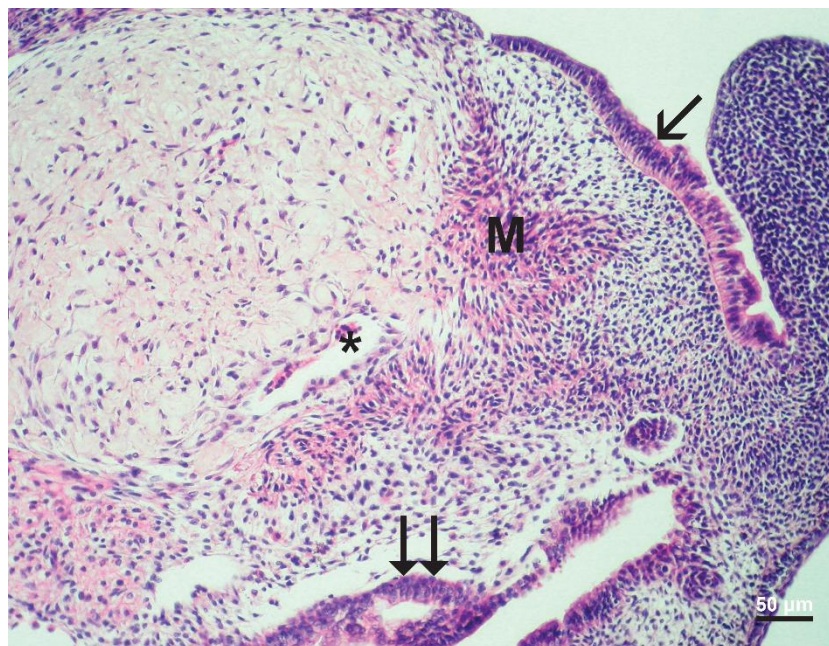


**Slika 12.** Zametak kultiviran 14 dana *in vitro* s 1 mM valproata. E – epidermis, zvijezdica – hrskavica, ME – mezenhim, strjelica – ganglijske stanice, HE.



**Slika 13.** Detalj slike 12: zametak kultiviran 14 dana *in vitro* s 1 mM valproata. M – mišići, zvijezdica – hrskavica, ME – mezenhim, HE.

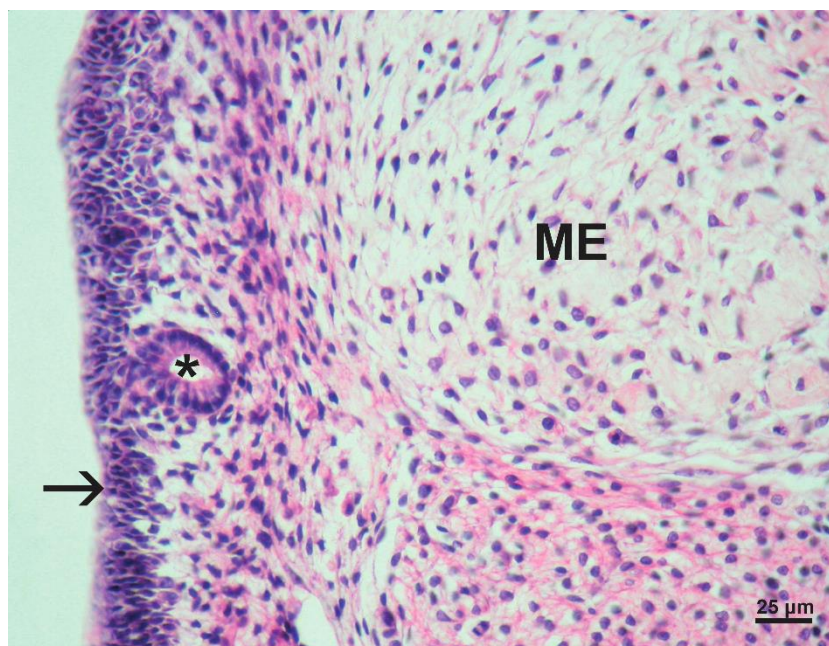




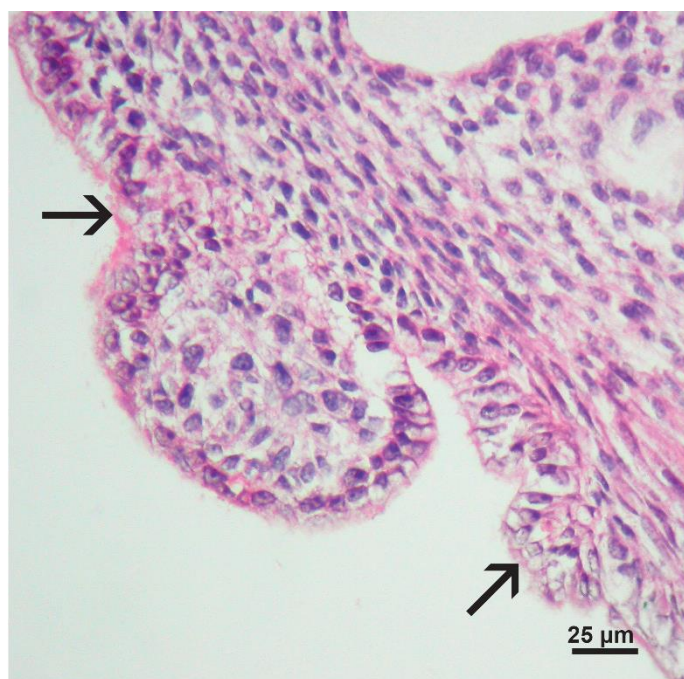
**Slika 14.** Zametak kultiviran 14 dana *in vitro* s 1 mM valproata. M – mišići, strjelica - višeredni cilindrični epitel s trepetljikama, zvjezdica – krvna žila (lumen), dvostruka strjelica – mnogoslojni pločasti epitel, HE.



**Slika 15.** Detalj slike 14: višeredni cilindrični epitel s trepetljikama (strjelica) u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro* s 1 mM valproata. M – mišići, HE.

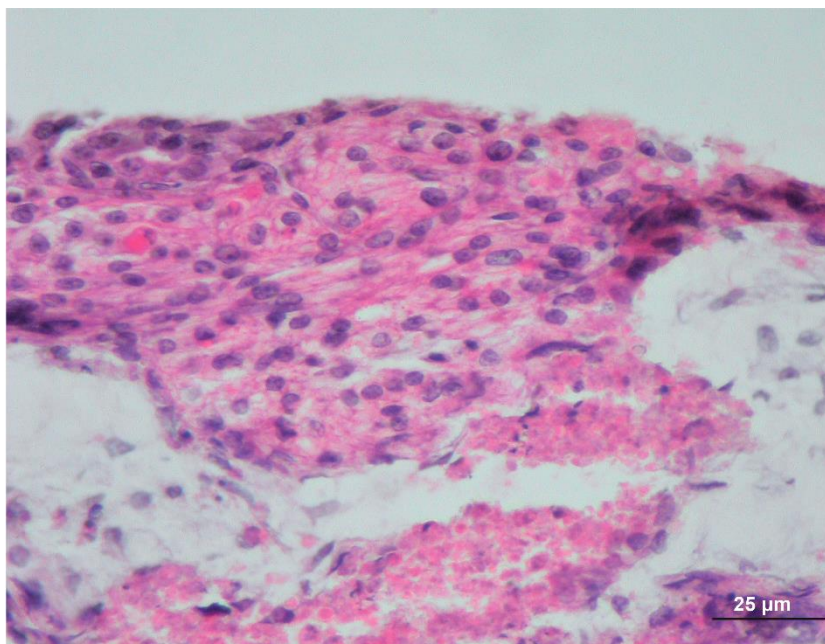


**Slika 16.** Višeredni cilindrični epitel s trepetljikama (strjelica) u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro* s 1 mM valproata. ME – mezenhim, zvjezdica – neuralna cijev, HE.



**Slika 17.** Cilindrični epitel s trepetljikama (strjelica) u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro* s 2 mM valproata, HE.





**Slika 18.** Mišićno tkivo u zametku kultiviranom 14 dana *in vitro* s 2 mM valproata, HE.

#### **5.1.4. Incidencija diferenciranih tkiva u kulturi *in vitro* s valproatom**

Iz Tablice 3 i Slike 19 vidljivo je da je negativni učinak valproata na diferencijaciju puno jači kod primjene veće koncentracije od 2 mM. U ovoj skupini osobit učinak se vidi na živčanom i hrskavičnom tkivu te crijevnom epitelu ( $P < 0.001$ ), a nešto slabija supresija na mišićnom tkivu ( $P < 0,05$ ) i epidermisu ( $P < 0,02$ ). Ukoliko su eksplantati tretirani manjom koncentracijom, od 1 mM, supresija diferencijacije je puno slabija, i statistički značajna jedino u slučaju živčanog tkiva ( $P = 0.01$ ).

Iz grafova je vidljivo i statistički je analizirano, da je supresija diferencijacije kod veće koncentracije od 2 mM valproata statistički značajno manja i od skupine tretirane s manjom koncentracijom koncentracijom (Slika 20).

**Tablica 3.** Diferencijacija eksplantata nakon 2 tjedna *in vitro* kulture s valproatom (K=16 uzoraka; VPA 1 mM=13 uzoraka; VPA 2 mM=14 uzoraka).

	K		VPA 1 mM		VPA 2 mM	
	N	%	N	%	N	%
<b>Epidermis</b>	1 <sup>b</sup>	5 94	11	85	7	50 <sup>b</sup>
<b>Živčano tkivo</b>	15 <sup>a,c</sup>	94	6	55	2 <sup>a</sup>	14 <sup>c</sup>
<b>Epitel sličan crijevu</b>	11 <sup>d</sup>	69	11	85	1	7 <sup>d</sup>
<b>Hrskavica</b>	14 <sup>e</sup>	88	11	85	3	21 <sup>e</sup>
<b>Mišići</b>	14 <sup>f</sup>	88	10	77	7	50 <sup>f</sup>
<b>Mezenhim</b>	16	100	13	100	14	100

Fischerov egzaktni test.

<sup>a</sup> P=0.014

<sup>d</sup> P=0.0008

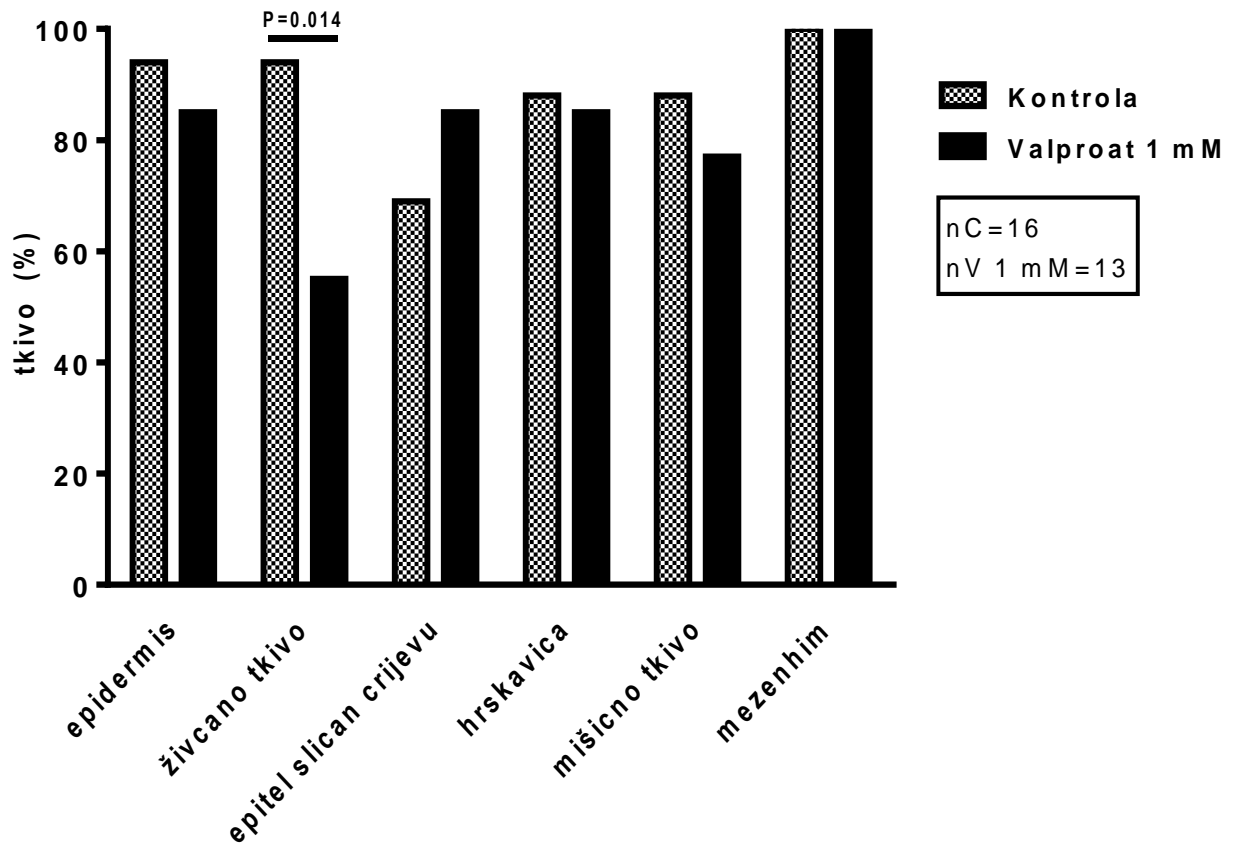
<sup>b</sup> P=0.012

<sup>e</sup> P=0.0006

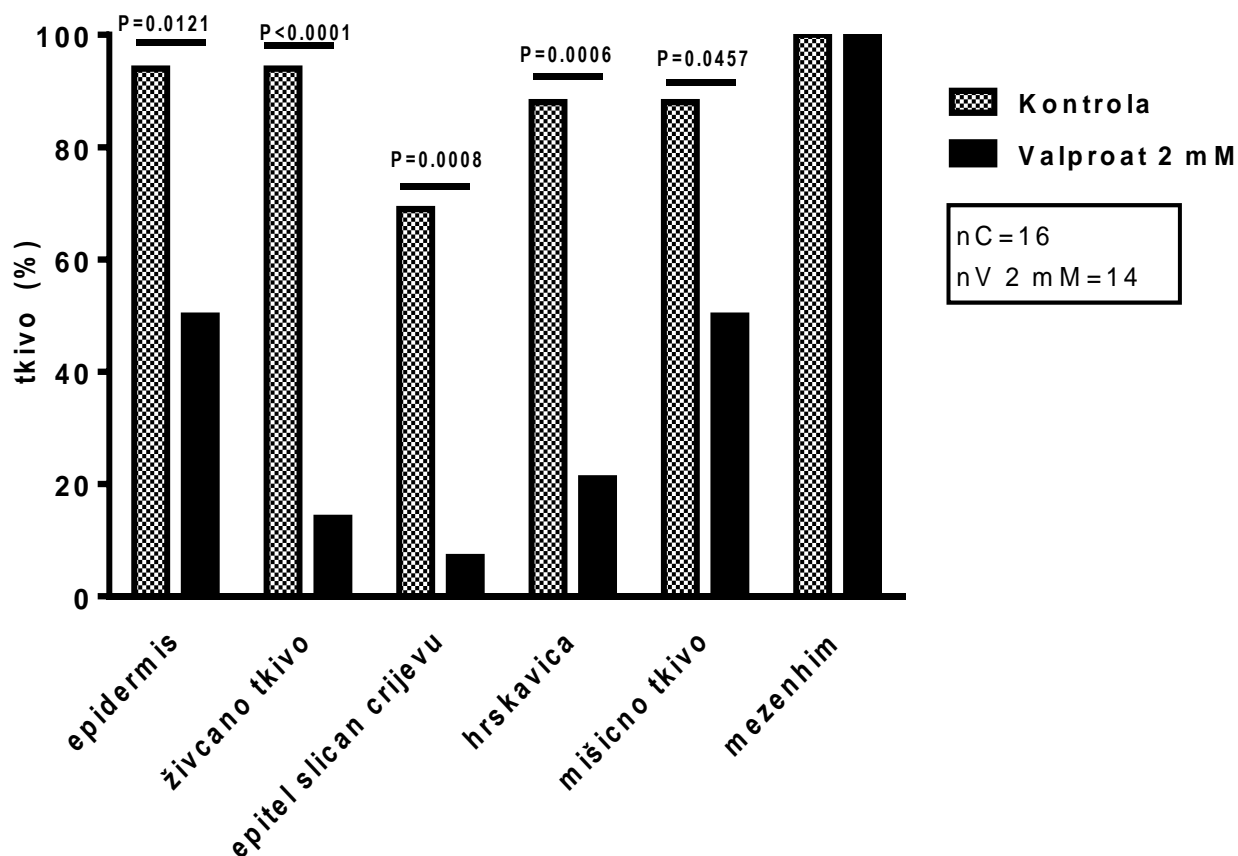
<sup>c</sup> P<0.0001

<sup>f</sup> P=0.0457





**Slika 19.** Diferencijacija u eksplantatima nakon 14 dana – kontrola i medij sa 1 mM valproata.  $\chi^2$  test sa Yatesovom korekcijom.



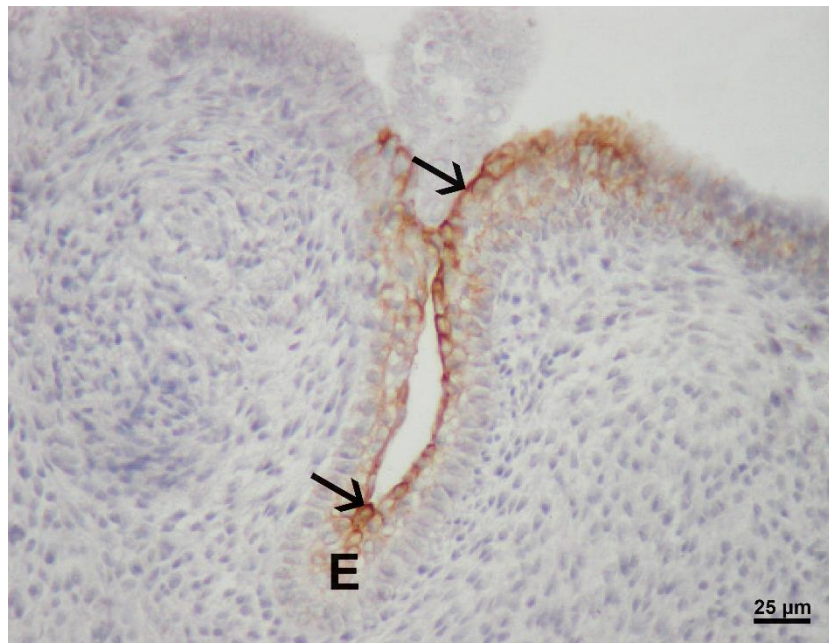
**Slika 20.** Diferencijacija u eksplantatima nakon 14 dana u mediju sa 2 mM valproata. Fischerov egzaktni test.

### 5.1.5. Ekspresija markera diferencijacije zametnih listića nakon *in vitro* kulture s valproatom

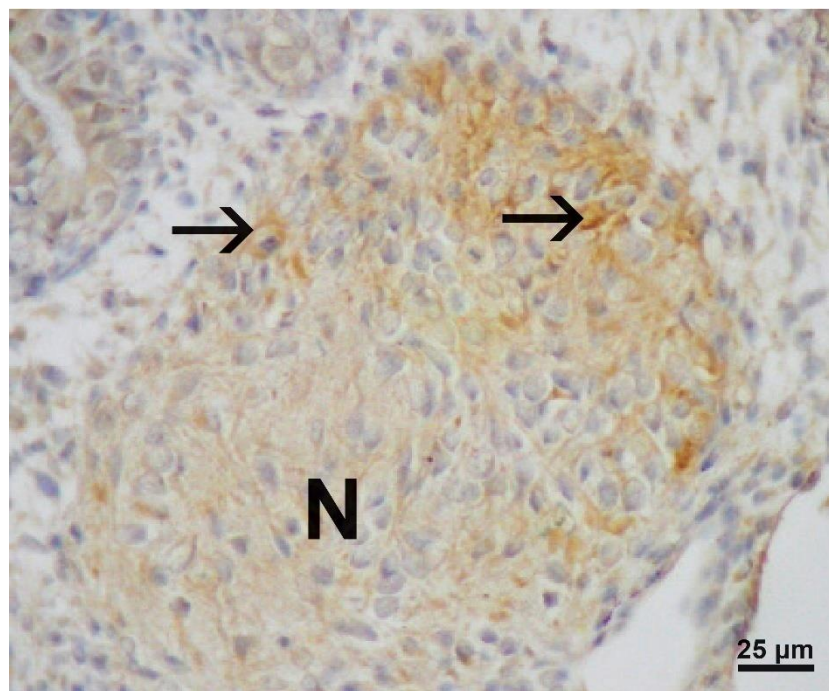
Markeri diferencijacije analizirani imunohistokemijom dodatni su dokaz prisutnosti specifičnih proteina koju upućuju na diferencijaciju tkiva iz svih triju zametnih listića, ektoderma, mezoderma i endoderma. Koristili smo protutijela protiv citokeratina 15 (epitelni marker), neurofilamenta 1 (citoplazma neurona), nestina (marker matičnih neuroektodermalnih stanica, miotuba), aktina glatkog mišića (citoskelet mišićnih stanica), glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (glija, astrociti, endodermalne stanice u razvoju) te nuklearni faktor 4 $\alpha$  hepatocita (HNF4alfa) (prisutan

u razvoju jetre, bubrega i probavne cijevi). U daljnjem razvoju živčanih stanica nestin se zamijenjuje tkivno specifičnim GFAP-om i neurofilamentom.

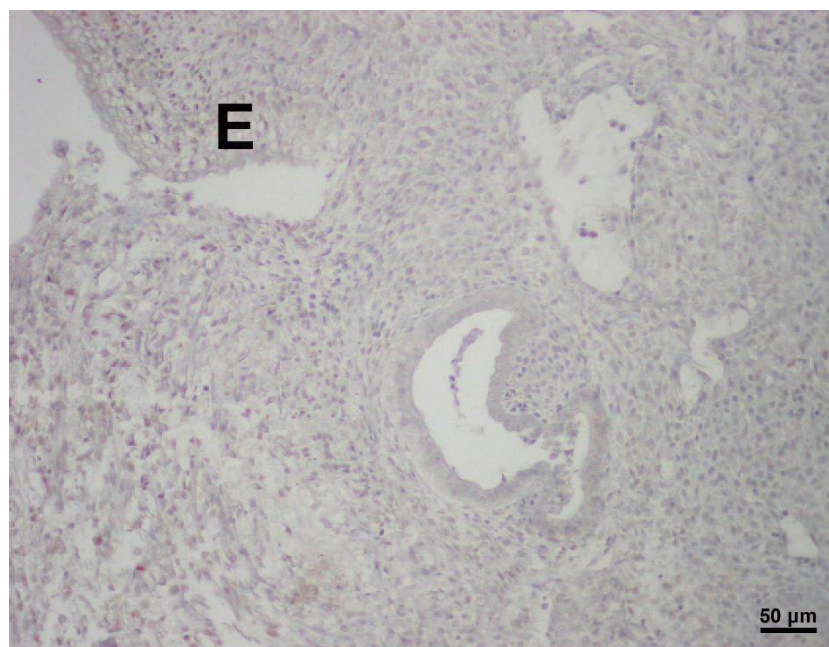
Dokazana je prisutnost citokeratina 15 (Slika 21), nestina (Slika 24), aktina (Slika 25) i HNF4 alfa (Slika 28, 29) u kontrolnoj skupini i skupini tretiranoj s 1 mM VPA, dok su uzorci tretirani s 2 mM VPA bili neadekvatni za analizu. Neurofilament 1 i glijalni fibrilarni kiseli protein bili su prisutni samo u kontrolnoj skupini (Slika 22, 26), dok se njihova ekspresija nije dokazala niti u jednoj skupini tretiranoj s VPA (Slika 23, 27).



**Slika 21.** Ekspresija citokeratina 15 (strjelice) u površinskim slojevima epidermisa (E) zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. DAB, kontrastirano hemalaunom.

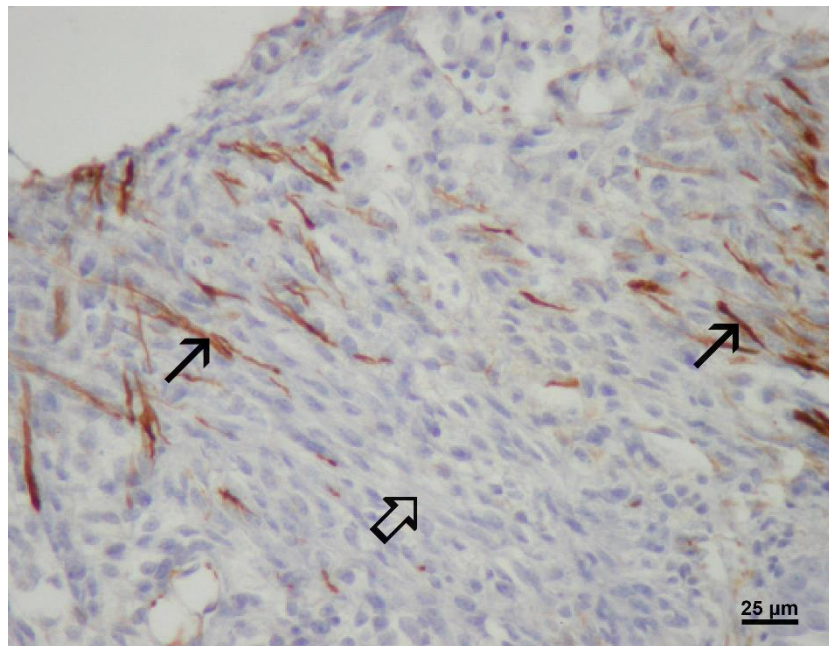


**Slika 22.** Ekspresija neurofilamenta (strjelice) u neuralnim stanicama zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, kontrola. N – neuralno tkivo. DAB, kontrastirano hemalaunom.

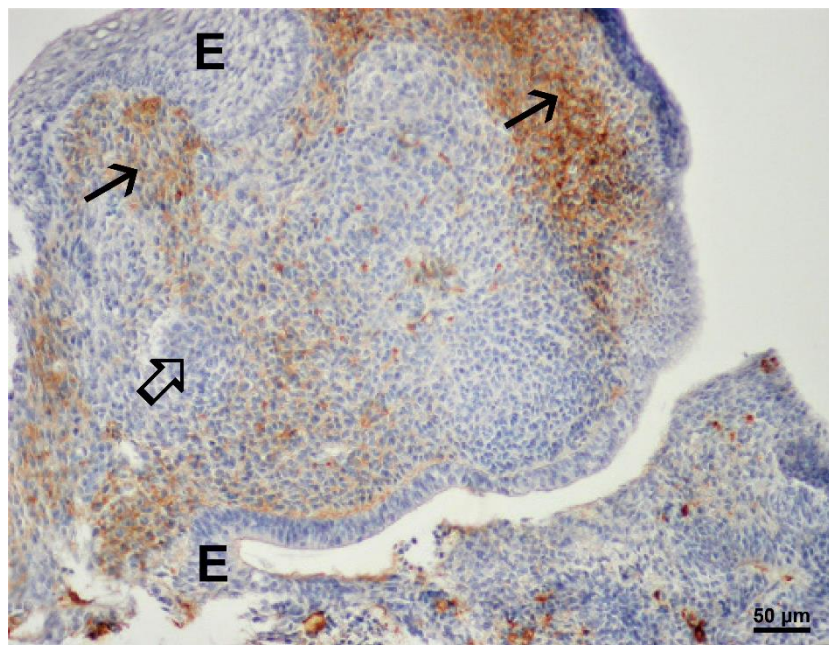


**Slika 23.** Odsutnost ekspresije neurofilamenta u stanicama zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. E – epitelno tkivo. DAB, kontrastirano hemalaunom.

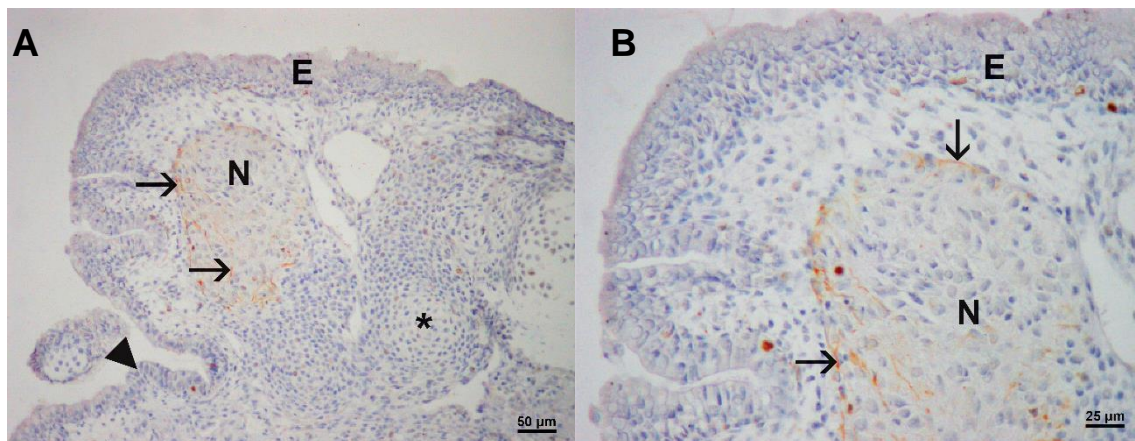




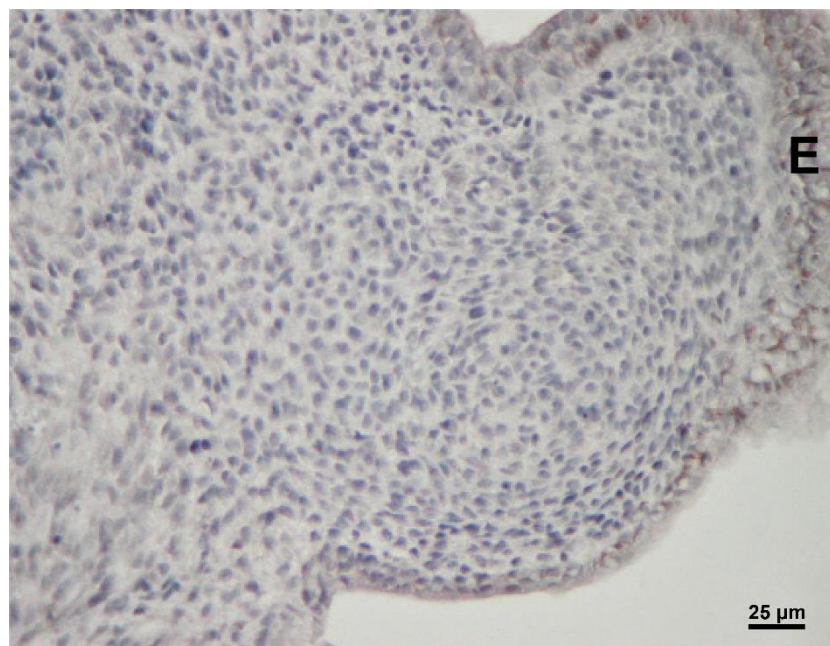
**Slika 24.** Ekspresija nestina (strjelice) u stanicama zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. DAB, kontrastirano hemalaunom.



**Slika 25.** Ekspresija aktina (strjelice) u glatkim mišićnim stanicama zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. Debela strjelica – interna negativna kontrola, E – epidermis. DAB, kontrastirano hemalaunom.

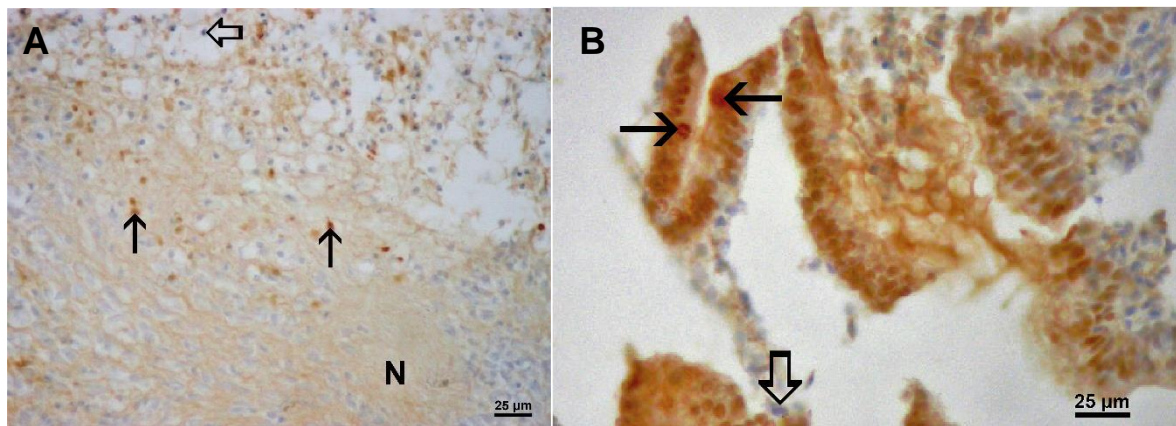


**Slika 26. A** Ekspresija glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (strjelice) u glijalnim stanicama zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, kontrola. **B** Detalj slike A. E – epidermis, glava strjelice – cilindrični epitel, zvijezdica – hrskavica, N – neuralno tkivo. DAB, kontrastirano hemalaunom.

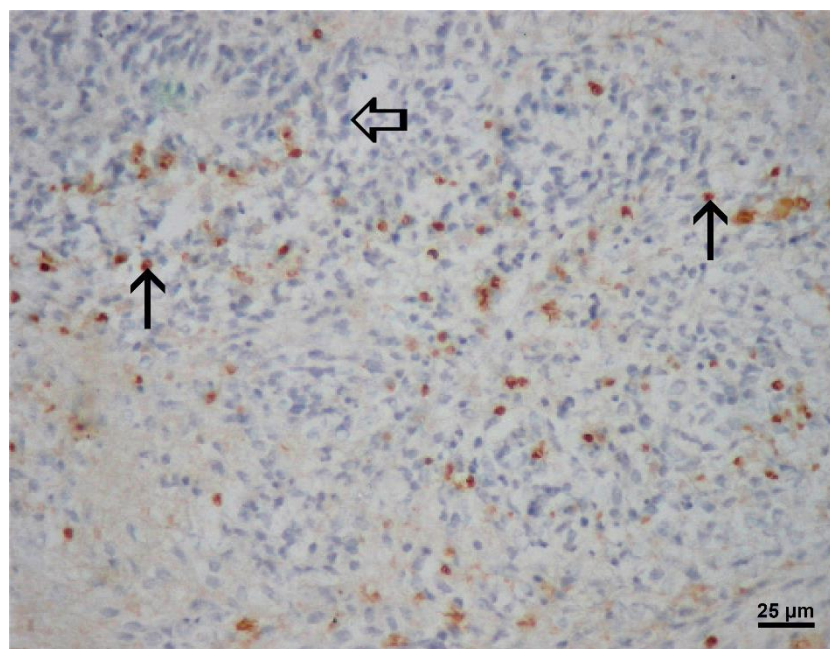


**Slika 27.** Odsutnost ekspresije glijalnog fibrilarnog kiselog proteina u tkivu zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. E – epitelno tkivo. DAB, kontrastirano hemalaunom.





**Slika 28. A, B** Stanice pozitivne na HNF- $\alpha$  (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, kontrola. Debela strjelica – negativna kontrola, N - neuropil. DAB, kontrastirano hemalaunom.



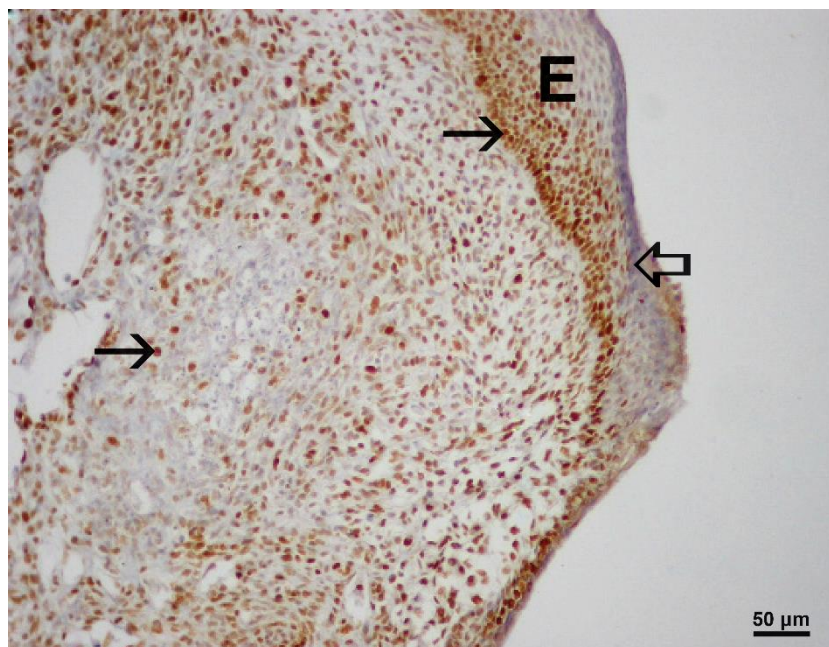
**Slika 29.** Stanice pozitivne na HNF- $\alpha$  (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. Debela strjelica – negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.

### 5.1.6. Proliferacija stanica u štakorskim zamecima nakon *in vitro* kulture s valproatom

Acetilacija histona je povezana i sa staničnom proliferacijom (306) pa smo analizirali u radu i staničnu proliferaciju nakon kulture sa valproatom. Koristili smo imunohistokemijski marker PCNA – nuklearni antigen proliferirajućih stanica koji je eksprimiran u stanicama koje proliferiraju i čija je ekspresija već prije pokazana u razvijenim teratomima (4).

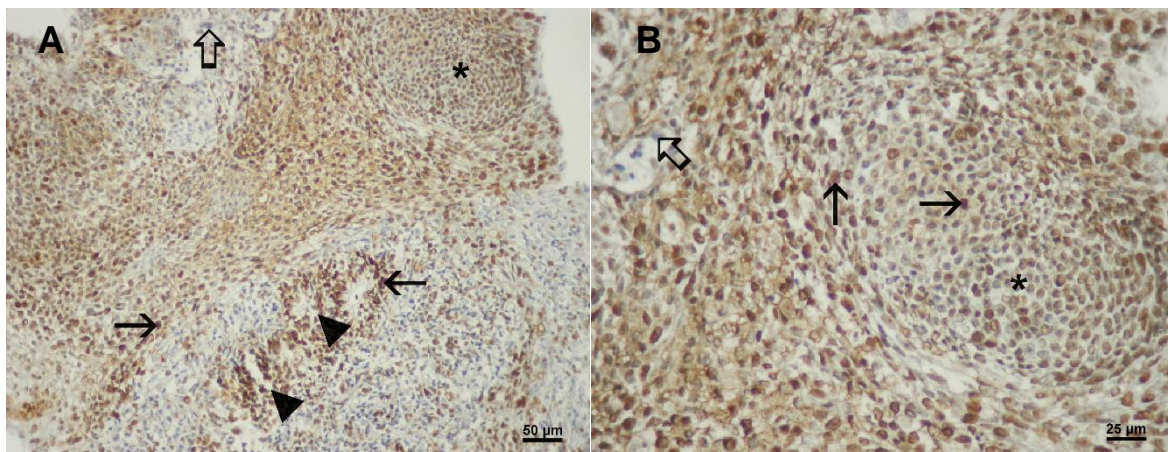
Brojne PCNA-pozitivne stanice nađene su nakon 2 tjedna i u kontrolnom teratomu i u skupini tretiranoj sa 1 mM valproata. Stanice su prisutne u epidermisu, mezenhimu, cilindričnom epitelu, no nađene su i u neuroepitelu te hrskavici (Slike 30-32).

U teratomima tretiranima sa koncentracijom od 2 mM, koji su pokazivali znakove nekroze, uočena je tek pokoja PCNA- pozitivna stanica.

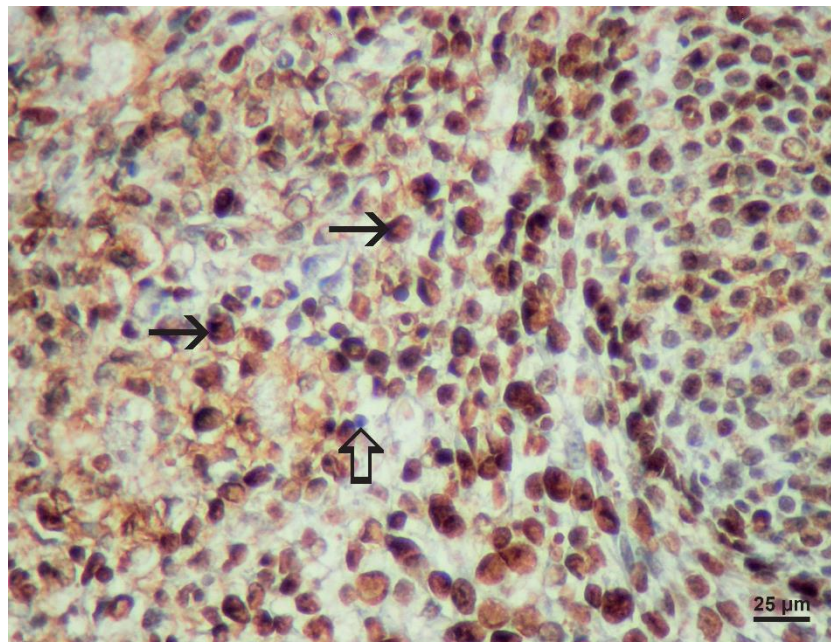


**Slika 30. A, B** PCNA-pozitivne stanice (strjelica) u tkivu zameotka kultiviranog 14 dana *in vitro*, kontrola. Debela strjelica – negativna kontrola, E – epidermis, ME - mezenhim. DAB, kontrastirano hemalaunom.





**Slika 31. A** PCNA-pozitivne stanice (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 14 dana *in vitro* s 1 mM valproata. Debela strjelica – negativna kontrola, glava strjelice – nezrelo živčano tkivo, zvjezdica - prehrskavica. **B** PCNA-pozitivne stanice (strjelica) prisutne u velikom broju u tkivu zametaka kultiviranih kroz 14 dana *in vitro* s 1 mM valproata: detalj slike A. DAB, kontrastirano hemalaunom.



**Slika 32.** PCNA-pozitivne stanice (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 14 dana *in vitro* s 1 mM valproata. Debela strjelica – interna negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.

Nadalje, statistički je analizirana ekspresija PCNA klasičnom metodom određivanja proliferacijskog indeksa, tj. brojanja PCNA-pozitivnih stanica u određenom prostoru (unutar određenog ukupnog broja stanica) (Vidi: Metode). Rezultati su prikazani tablično i grafički.

Iz Tablice 4 vidljiv je, kao i kod analize rasta, izraziti supresivni učinak valproata na proliferaciju stanica ne samo kod primjenjene koncentracije od 2 mM, gdje je proliferativni indeks bio statistički značajno smanjen (17.8 %) u odnosu na kontrolu (32.4 %) ( $P < 0.001$ ). Na Slici 33 uočava se izrazito smanjenje proliferacije u skupini tretiranoj sa 2 mM, koja je statistički značajno manja ( $P < 0.0001$ ) i od skupine tretirane sa manjom koncentracijom valproata (Slika 33).

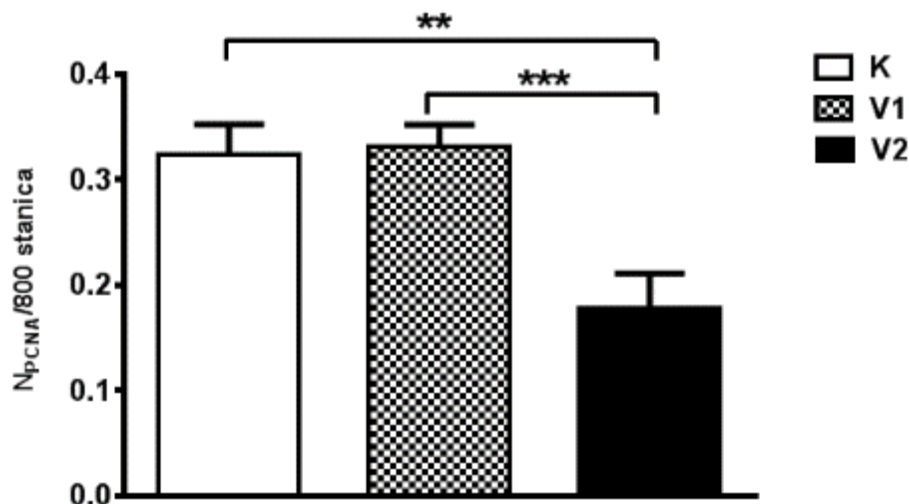
Primjena koncentracije od 1 mM nije imala utjecaj na aktivnost staničnog ciklusa, tj. staničnu proliferaciju jer se indeks, iako blago povišen (Slika 33), nije značajno razlikovao od kontrolnog proliferacijskog indeksa.

**Tablica 4.** Srednja vrijednost proliferacijskog indeksa ( $\bar{X}$ ) te standardna devijacija (SD) i standardna greška (SE) u eksplantatima zametaka tretiranim s valproatom nakon 14 dana *in vitro* kulture. Studentov t-test. P je izračunat u odnosu na kontrolu.

	proliferacijski indeks		
	K	VPA 1 mM	VPA 2 mM
$\bar{X}$	0.3240 <sup>a</sup>	0.3309	0.1782 <sup>a</sup>
SD	0.1489	0.1009	0.1072
SE	0.02815	0.02104	0.03232

Studentov t-test.

<sup>a</sup> $P < 0.001$



**Slika 33.** Proliferacijski indeks u eksplantatima nakon 14 dana kulture u mediju sa VPA u koncentraciji od 1 mM i 2 mM uz kontrolu. Studentov t-test, \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ .

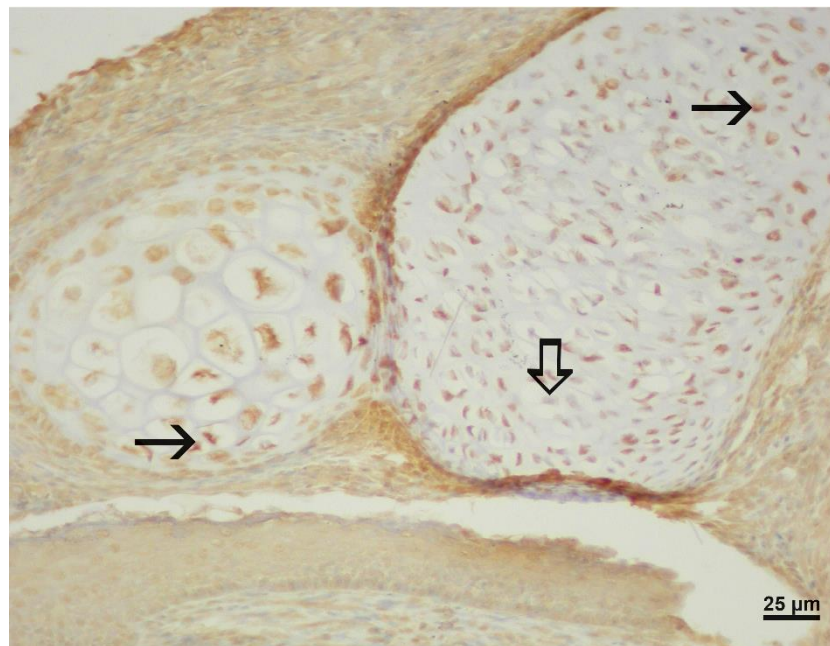
### 5.1.7. Ekspresija Rb proteina u štakorskim zamecima nakon kulture *in vitro* s valproatom

Kako se kod veće koncentracije valproata pokazala izrazita supresija rasta, analizirana je i ekspresija RB proteina koji je negativni regulator staničnog ciklusa. Analizirana je ukupna ekspresija RB proteina u zamecima kultiviranim 2 tjedna s valproatom, te je također i na razini pojedine stanice imunohistokemijski analizirana prisutnost RB-pozitivnih stanica u razvijenim tkivima eksplantata.

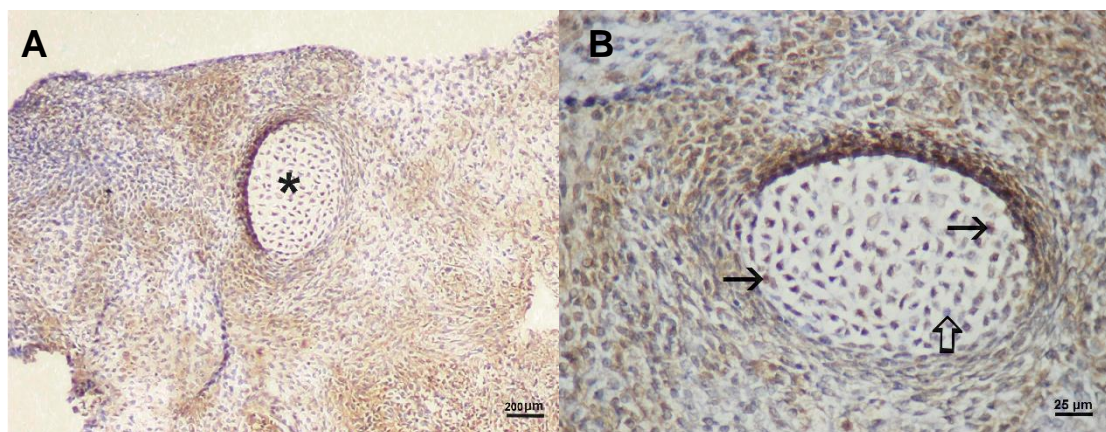
U kulturi zametaka *in vitro* nakon 2 tjedna u eksplantatima sporadično su nađene stanice pozitivne na RB protein, koje su bile najviše prisutne u terminalno diferenciranoj hrskavici čije stanice već imaju lakune (Slika 34, 35), i u kontrolnoj skupini i u skupini tretiranoj s 1 mM valproata.

U nekrotičnim eksplantatima, koji su dominirali u skupini tretiranoj s 2 mM valproata, bila je prisutna ekspresija RB proteina u jezgrama stanica koje su još morfološki vidljive (Slika 36).

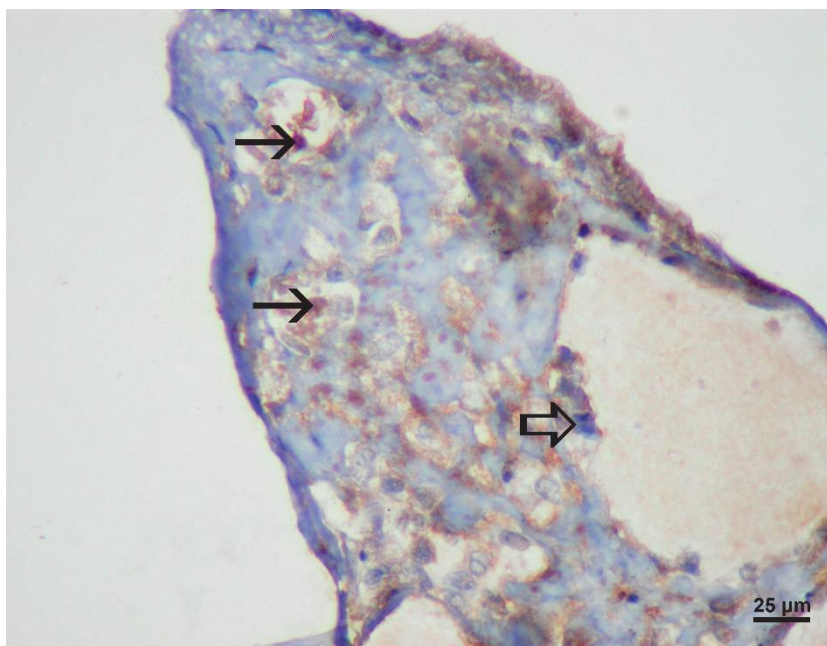




**Slika 34.** Stanice pozitivne na RB-protein (strjelice) u hrskavici zametka kultiviranog kroz 14 dana *in vitro*, kontrola. Debela strjelica – interna negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.



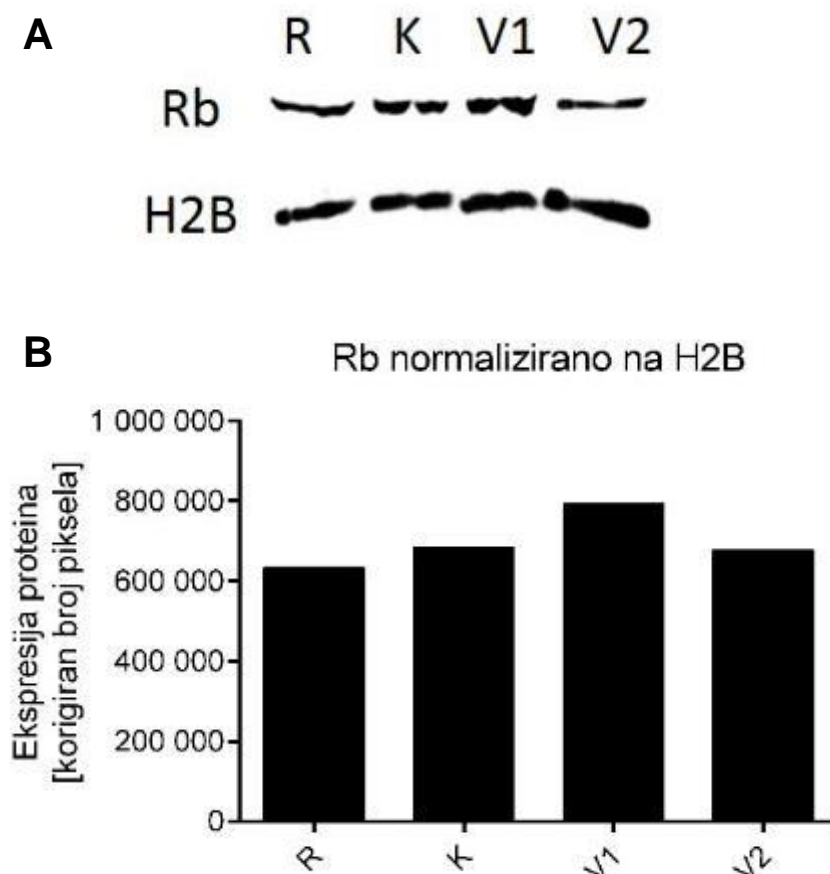
**Slika 35. A, B** Stanice pozitivne na RB-protein (strjelice) u tkivu zametka kultiviranog kroz 14 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. Zvijezdica – hrskavica. **B** Detalj slike A. Debela strjelica – negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.



**Slika 36.** Stanice pozitivne na RB-protein (strjelica) u eksplantatu tretiranom koncentracijom od 2 mM VPA 14 dana *in vitro*. DAB, kontrastirano hemalaunom.

Utvrđiti razliku u ekspresiji *Rb* gena na proteinskoj razini imunohistokemijskom metodom nije bilo moguće zbog velike razlike u brojnosti stanica kontrola, tretiranih 1 mM VPA i tretiranih s 2 mM valproata. Stoga se analizirala ekspresija *Rb* gena *Western blotting* metodom, gdje su ukupni proteini izolirani iz puliranih eksplantata zbog premale količine proteina u pojedinim eksplantatima.

RB protein prisutan je u eksplantatima nakon 2 tjedna kulture i u kontrolnoj skupini te u skupinama tretiranim s valproatom, što je prikazano na fotografiji membrane (Slika 37A). Kada smo fotografiju membrane obradili u računalnom programu da normaliziramo vrpce RB proteina prema ekspresiji „housekeeping“ proteina histona H2B, dobili smo rezultat semi-kvantifikacije RB proteina (Slika 37B) koji je pokazao da je ekspresija *Rb* proteina u skupini tretiranoj s jačom koncentracijom valproata od 2 mM slična kao u kontroli, dok je povećana u skupini tretiranoj sa 1 mM valproata u odnosu na kontrolu, iako razlika nije bila statistički značajna.



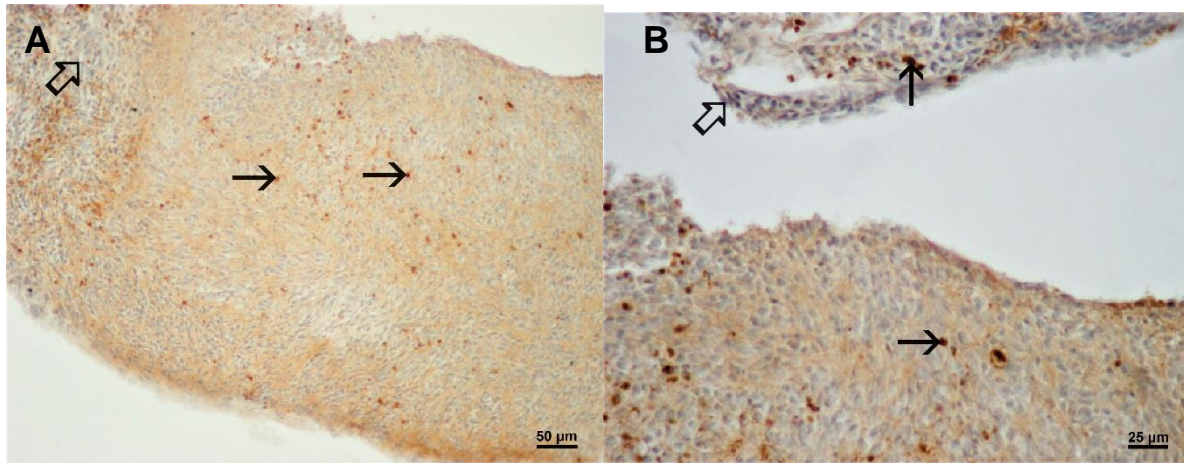
**Slika 37.** Ekspresija gena *Rb* na proteinskoj razini u eksplantatima kultiviranim 2 tjedna *in vitro* s valproatom. **A** Prikaz membrane s ekspresijom *Rb* proteina. **B** Ekspresija gena *Rb* na proteinskoj razini izražena na razinu ekspresije histona H2B.

### 5.1.8. Apoptoza u štakorskim zamecima u trodnevnoj kulturi *in vitro* s valproatom

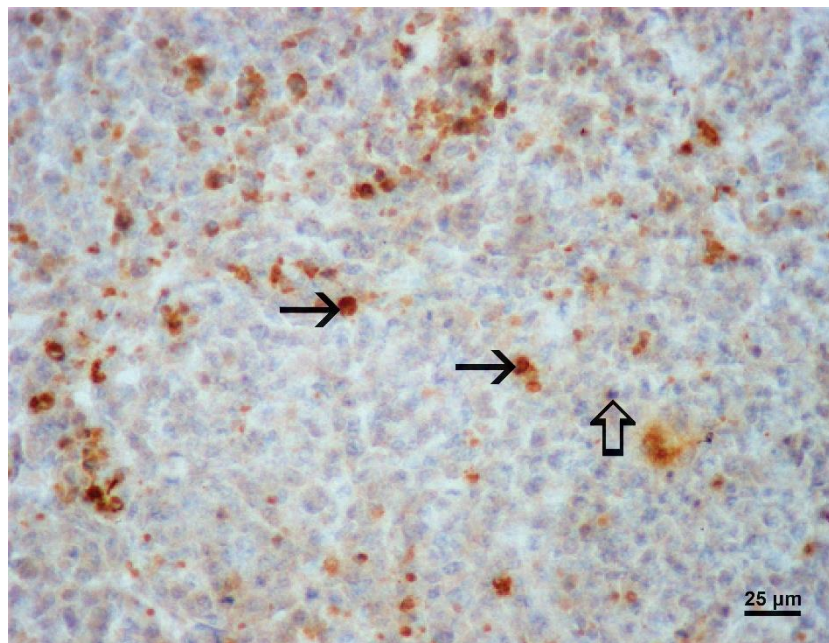
Apoptoza je proces koji nastaje odmah ili u kratkom vremenskom roku nakon djelovanja lijeka pa smo u ovom radu po prvi puta istražili je li uzrok smanjenja rasta eksplantata u proapoptotičkom procesu. Imunohistokemijska obrada pokazala je prisutnost apoptotičkih stanica pozitivnih na pocijepanu kaspazu 3 trećeg dana kulture u svim skupinama, pa i u kontroli gdje se činilo da ih ima manje (Slike 38-40). Nakon 2 tjedna kulture u kontroli gotovo i nema apoptotičkih stanica dok su one nađene ponajviše u neuroepitelu uzoraka tretiranih sa valproatom već u koncentraciji od 1 mM



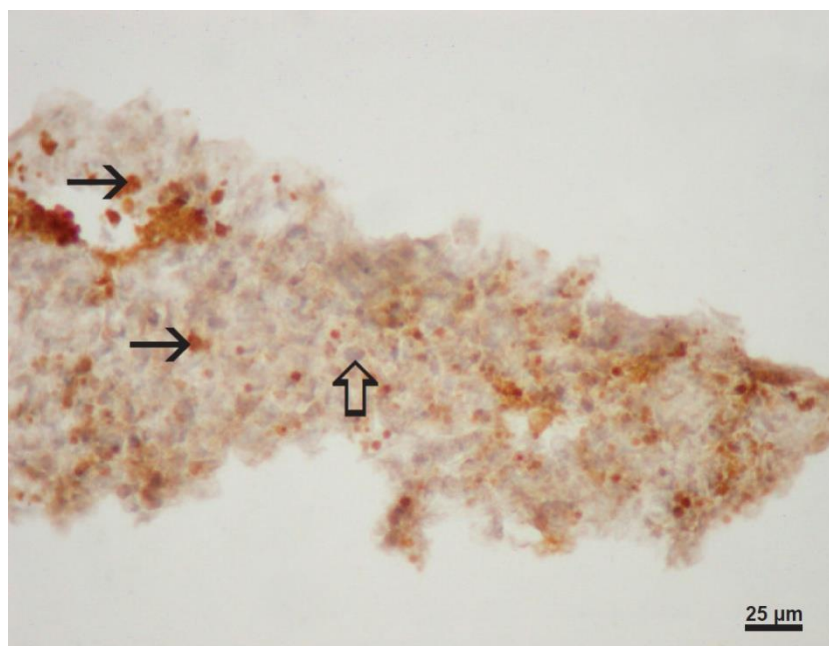
(Slika 41). U kontroli je nakon 2 tjedna kulture nađena tek poneka stanica pozitivna na pocijepanu kaspazu 3.



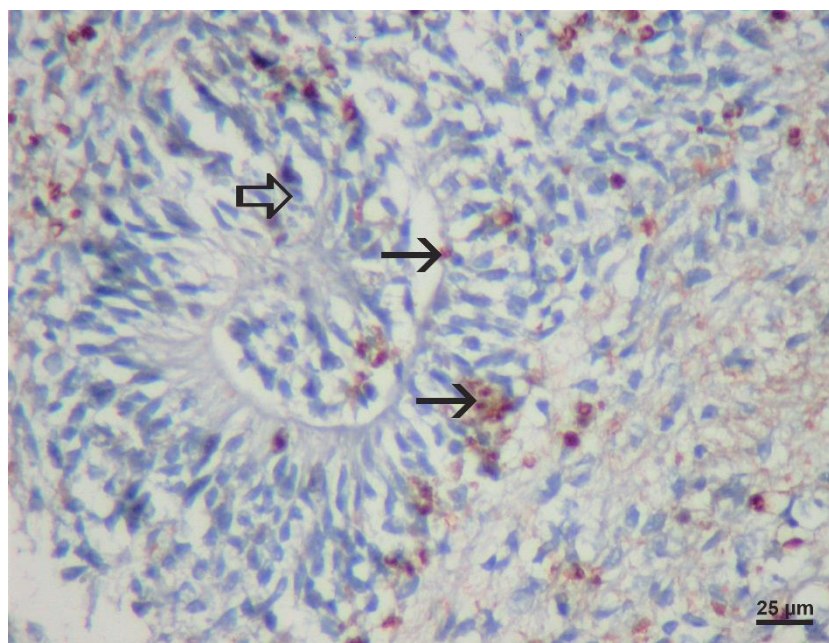
**Slika 38. A, B** Stanice pozitivne na pocijepanu kaspazu 3 (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 3 dana *in vitro*, kontrola. Debola strjelica – negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.



**Slika 39.** Stanice pozitivne na pocijepanu kaspazu 3 (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 3 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. Debola strjelica – negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.



**Slika 40.** Stanice pozitivne na pocijepanu kaspazu 3 (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 3 dana *in vitro*, tretiranog s 2 mM VPA. Debela strjelica – negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.



**Slika 41.** Stanice pozitivne na pocijepanu kaspazu 3 (strjelica) u neuroepitelu zametka tretiranog s 1 mM valproata 14 dana *in vitro*. DAB, kontrastirano hemalaunom.



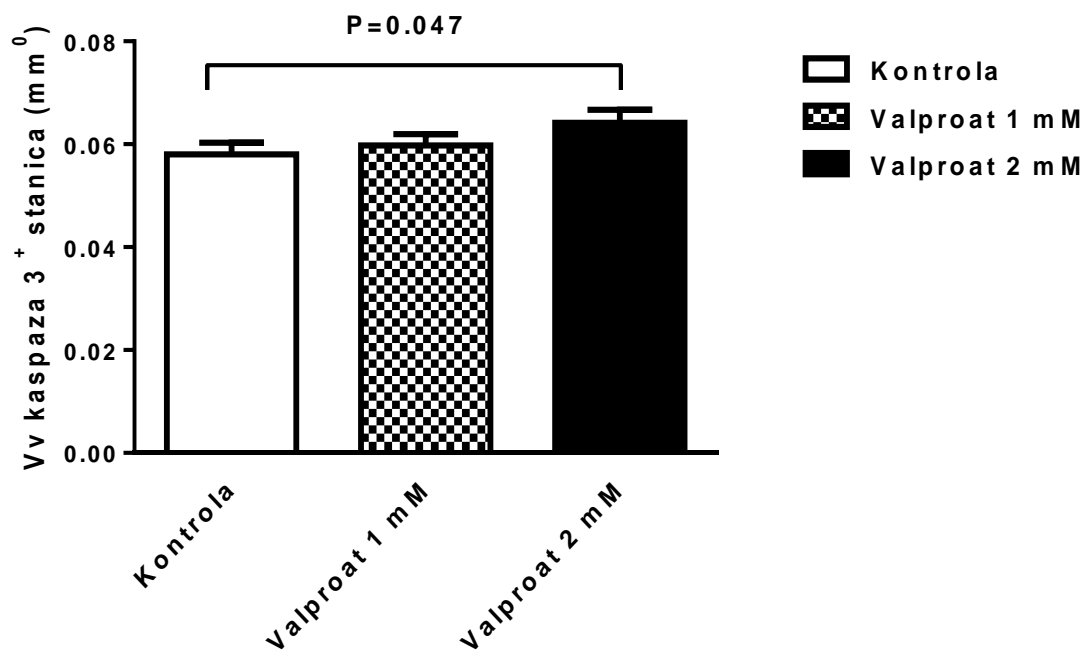
Nakon toga napravljena je stereološka kvantifikacija volumenske gustoće kaspaza 3-pozitivnih stanica u definiranom volumenu uzorka nakon 3 dana kulture. Statistička analiza pokazala je da je apoptoza značajno inducirana tek jačom koncentracijom valproata od 2 mM jer je izmjerena veća volumenska gustoća kaspaza 3-pozitivnih stanica u trodnevnim kulturama tretiranima sa 2 mM u odnosu na kontrole ( $P=0.047$ ) (Tablica 5 i Slika 42). Niža koncentracija od 1 mM dovela je do porasta apoptotičnih stanica, no razlika nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolu kao ni u odnosu na skupinu tretiranu jačom koncentracijom.

**Tablica 5.** Srednje vrijednosti ( $\bar{X}$ ), standardna devijacija (SD) i standardna greška (SE) volumenske gustoće stanica pozitivnih na pocijepanu kaspazu 3 u eksplantatima tretiranim s valproatom nakon 3 dana *in vitro* kulture.

	<b>Vv<sup>kaspaza-3+</sup> stanica</b>		
	<b>K</b>	<b>VPA 1 mM</b>	<b>VPA 2 mM</b>
<b><math>\bar{X}</math></b>	0.05803 <sup>a</sup>	0.05979	0.06417 <sup>a</sup>
<b>SD</b>	0.04033	0.04404	0.04371
<b>SE</b>	0.002291	0.002159	0.002554

Mann Whitney test.

<sup>a</sup> $P=0,047$

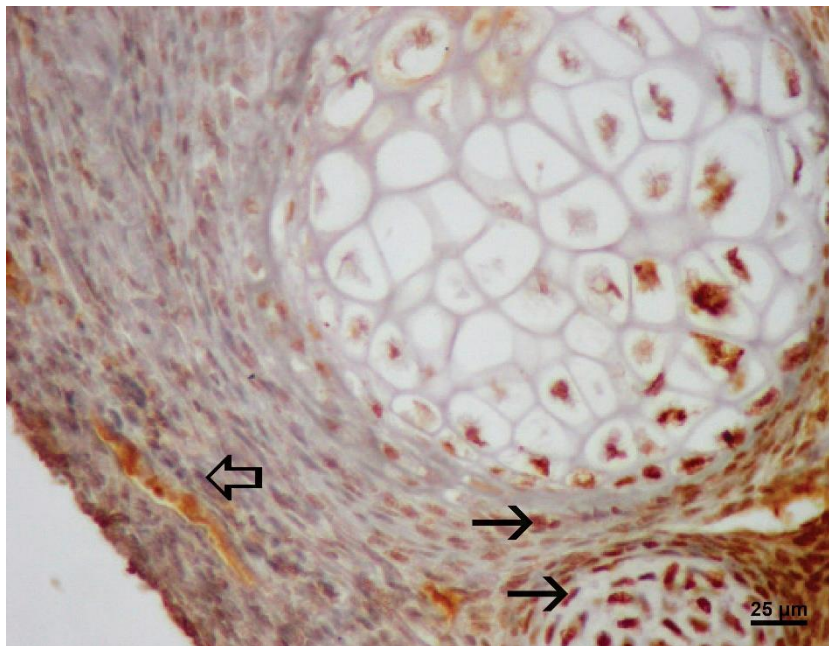


**Slika 42.** Volumenska gustoća stanica pozitivnih na pocijepanu kaspazu 3 u eksplantatima zametnih štitova nakon kulture 3 dana u mediju s valproatom. Mann Whitney test.

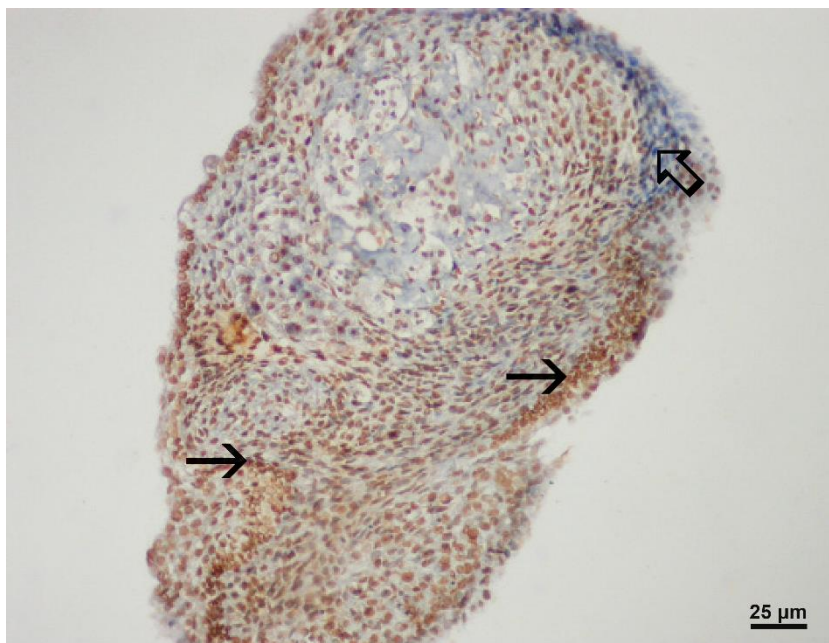
## 5.2. EPIGENETIČKE PROMJENE U ŠTAKORSKIM ZAMECIMA U *IN VITRO* KULTURI S VALPROATOM

### 5.2.1. Imunohistokemijsko određivanje acetiliranog histona u kultiviranim zamecima

Budući da je valproat inhibitor histonske deacetilaze, istražili smo eksprimira li se acetilirani histon u eksplantatima nakon kultivacije. I u kontrolnim zamecima i u zamecima tretiranim s 1 mM valproata, pronađen je u jezgrama različitih stanica snažan signal acetiliranog histona, a posebno u jezgrama terminalno diferenciranih hondrocita. Slike 43 i 44 prikazuju ekspresiju acetiliranog histona H3 na imunohistokemijski obojenim uzorcima štakorskih zametaka nakon 14 dana kultiviranja *in vitro*.



**Slika 43.** Stanice pozitivne na acetilirani histon (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, kontrola. Vide se dobro razvijene lakune hrskavice. Debela strjelica – negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.



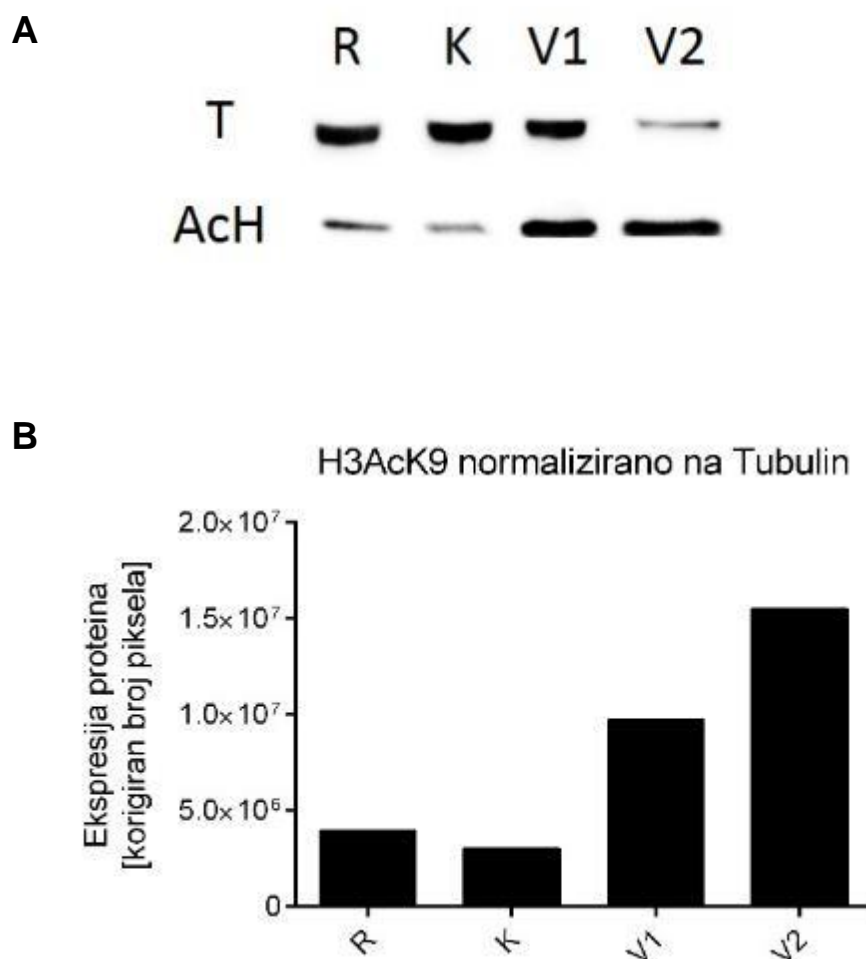
**Slika 44.** Stanice pozitivne na acetilirani histon (strjelica) u tkivu zametka kultiviranog 14 dana *in vitro*, tretiranog s 1 mM VPA. Debela strjelica – negativna kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.

### 5.2.2. Globalna acetilacija histona u štakorskim zamecima nakon kulture *in vitro* s valproatom

Budući da smo imunohistokemijskom metodom prikazali acetilaciju histona na razini pojedine stanice, zanimalo nas je hoćemo li ćemo moći pronaći neku kvantitativnu razliku u acetilaciji histona između zametaka tretiranih sa VPA (1 mM i 2 mM) i kontrola.

Promjene u količini acetiliranih histona nakon tretmana s valproatom analizirane su u kontroli i obje eksperimentalne skupine metodom *Western blotting* i korištenjem protutijela na acetilirani histonH3 (H3AcK9). Izolacija proteina je napravljena iz puliranih zametaka nakon dvotjedne kulture, radi male količine materijala.

Na fotografiji membrane vidljiva je deblja vrpca acetiliranog-histona H3 u obje skupine tretirane s valproatom, u odnosu na kontrolu (Slika 45). *Housekeeping* protein tubulin detektiran je također u svim skupinama, a njegova je količina bila manja u skupini tretiranoj s jačom koncentracijom VPA od 2 mM (Slika 45A).



**Slika 45.** Rezultati Western blotting analize ekspresije acetiliranog H3AcK9 koja predstavlja globalnu acetilaciju histona. **A** Ekspresija acetiliranog H3AcK9 na membrani. **B** Globalna acetilacija histona H3 normalizirana na razinu ekspresije proteina tubulina.

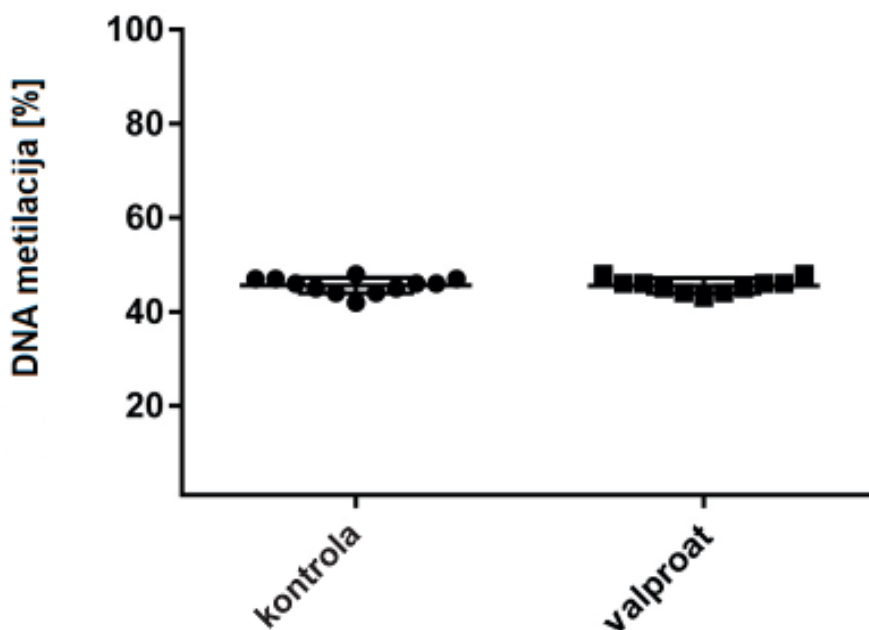
Fotografije membrane analizirane su također semi-kvantitativnom metodom kojom smo normalizirali ekspresiju H3AcK9 prema ekspresiji proteina tubulina (Slika 45B). Analiza je pokazala izrazito povećanu količinu H3AcK9 u skupinama koje su 2 tjedna tretirane s valproatom, u odnosu na kontrolu. Za 2 mM to je bilo 7,4871 puta više nego u kontroli.

### 5.2.3. Globalna metilacija u štakorskim zamecima nakon kulture *in vitro* valproatom

Da bi se utvrdilo utječe li promjena u acetilaciji histona i na globalnu metilaciju genoma, analizirana je metilacija repetitivnih slijedova (globalna metilacija) u DNA zametnih štitova nakon kulture 14 dana u mediju s valproatom. Korištena je metoda pirosekvenciranja koja egzaktno analizira metilaciju svakog CpG dinukleotida u odabranoj sekvenci te time daje podatke o postotku metiliranosti svake CpG točke.

Analizirana je samo skupina tretirana sa 1 mM VPA jer je skupina tretirana s jačom koncentracijom bila nekrotičnog izgleda pa pretpostavljamo da je DNA u većini stanica bila degradirana.

Statistička analiza dobivenih pirograma pokazala je da globalna metilacija nije značajno promijenjena kultivacijom s 1 mM valproata (Slika 46).



**Slika 46.** Globalna metilacija u eksplantatima nakon 2 tjedna u kulturi s 1 mM valproata. Nema statistički značajne razlike između kontrole i tretirane skupine. Mann Whitney test.  $N(K)=6$ ;  $N(V1)=6$ .

### 5.3. RAZVOJ EKTOPLACENTALNIH KONUSA TRETIRANIH VALPROATOM *IN VITRO*

U ovom radu po prvi puta smo istražili utjecaj valproata na razvoj ektoplacentalnog konusa *in vitro*, koristeći već uspostavljenu metodu u laboratoriju (71, 307). Po toj metodi konusi se kultiviraju samo 3 dana i može se pratiti njihovo preživljenje, rast i diferencijacija, što je u ovoj disertaciji i analizirano.

#### 5.3.1. Preživljenje ektoplacentalnih konusa u kulturi *in vitro* s valproatom

Došlo je do značajnog smanjenja preživljavanja, tj. broja fiksiranih uzoraka u odnosu na V1 skupinu (Tablica 6) kod koje su konusi uvijek preživjeli (svi nasađeni uzorci bili su fiksirani).

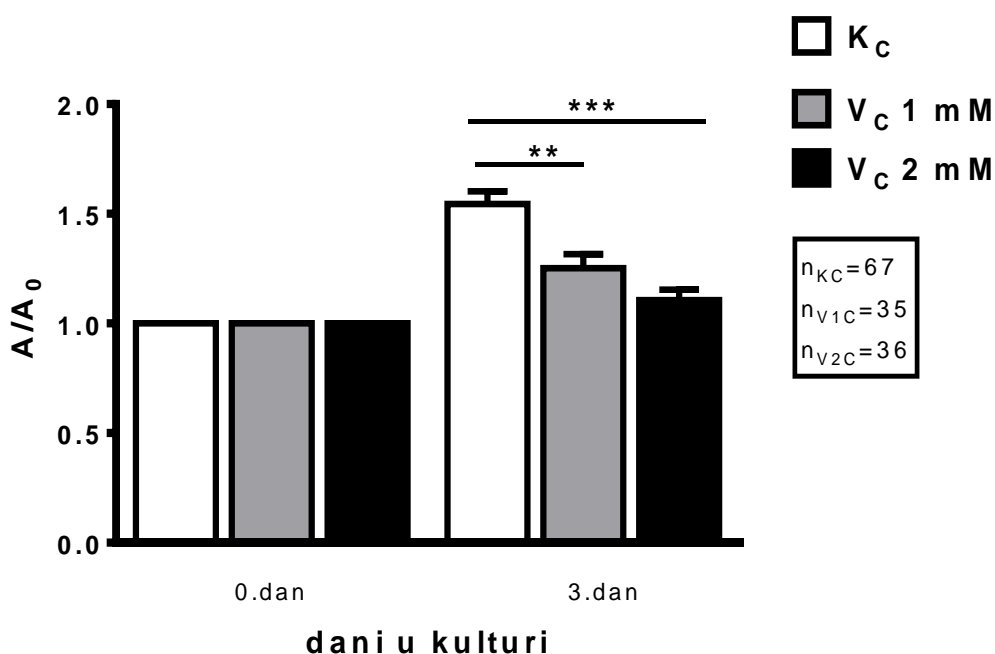
**Tablica 6.** Preživljenje ektoplacentalnih konusa u trodnevnoj kulturi *in vitro* uz dodatak valproata (N – broj uzoraka).

	K		VPA 1 mM		VPA 2 mM	
	N	%	N	%	N	%
<b>Eksplantirani konusi</b>	43	100	20	100	28	100
<b>Fiksirani konusi</b>	22 <sup>a</sup>	51.1	20 <sup>a</sup>	100	10	35.7

<sup>a</sup>Fischer test  $P < 0.0001$ ; u odnosu na V1.

### 5.3.2. Rast ektoplacentalnih konusa u kulturi *in vitro* s valproatom

Učinak valproata na rast ektoplacentalnih konusa u kulturi *in vitro* vidljiv je 3. dana gdje je opaženo da su konusi tretirani s obje koncentracije valproata značajno manji u odnosu na kontrolu (Slika 47). Smanjenje je izražajnije kod primjene jače koncentracije u odnosu na kontrolu za koncentraciju od 1 mM ( $P < 0.001$ ), i za koncentraciju od 2 mM ( $P < 0.0001$ ). Ipak, kad uspoređujemo tretirane skupine, rast je nešto manji sa VPA 2 mM, ali nema značajnog smanjenja rasta ovisno o jačini koncentracije.



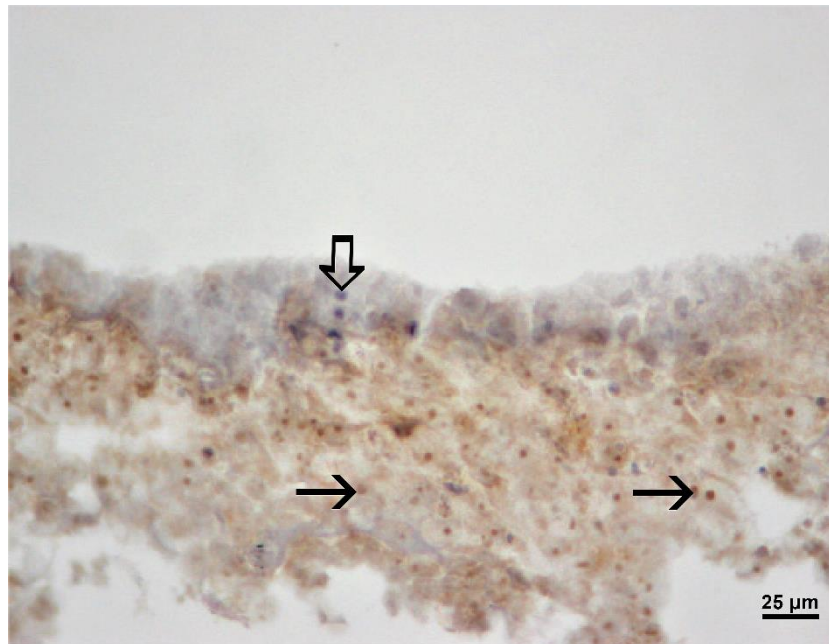
**Slika 47.** Rast ektoplacentalnih konusa 3 dana u kulturi *in vitro* s medijem uz dodatak valproata. Mann Whitney test. \*\* $P < 0.001$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ .

### 5.3.3. Diferencijacija ektoplacentalnih konusa u kulturi *in vitro* s valproatom

Nakon trodnevne kulture eksplantati se razvijaju u trofoblastu slične strukture koje sporadično sadrže divovske stanice trofoblasta. Koristeći marker za trofoblast



CD36, imunohistokemijski su se obojali konusi nakon *in vitro* kultiviranja kroz 3 dana (Slika 48). Primjena valproata već u manjoj koncentraciji od 1 mM zapravo je suprimirala ukupni razvoj trofoblasta jer su uzorci često bili nekrotični, što je još jače bilo izraženo kod primjene veće koncentracije.



**Slika 48.** Ekspresija CD36 (strjelica) u ektoplacentalnom konusu kultiviranom 3 dana *in vitro*, tretiranom s 1 mM VPA. Debela strjelica – negativna unutrašnja kontrola. DAB, kontrastirano hemalaunom.

## 6. RASPRAVA

U ovom doktorskom radu istražen je po prvi puta utjecaj epigenetičkog lijeka valproata u originalnom 3D *in vitro* animalnom modelu razvoja embrionalnog dijela zametka te istom takvom modelu razvoja ektoplacentalnog konusa iz kojega se kasnije razvija placenta, i to u periodu gastrulacije, najosjetljivijem stadiju razvoja sisavaca. Zapravo smo istraživali *ex vivo* (izvan živog organizma) tj. bez utjecaja majčinog organizma. Na taj način istražili smo direktan utjecaj valproata na razvoj struktura zametka. Dodatak epigenetičkog lijeka valproata u medij imao je negativan učinak na razvoj ovisno o primijenjenoj koncentraciji/dozi lijeka, tj. učinak je bio negativniji sa većom koncentracijom lijeka. Ovaj model dao je rezultate sukladne pretpostavci o embriotoksičnom/teratogenom djelovanju valproata kao HDACi inhibitora. Ujedno se pokazalo i za valproat da je gastrulacija vrlo osjetljiv period njegove embriotoksičnosti jer je VPA djelovao negativno i na zametak i na izvor stanica buduće placentе.

*In vivo* animalni modeli (npr. štakor, miš) predstavljaju zlatni standard i zakonsku obavezu u identifikaciji lijekova i mogućih teratogena, ali skupoća *in vivo* toksikoloških ispitivanja kombinaciji s razlikama u specijes-specifičnim djelovanjima teratogena na životinje i ljude, te humaniji pristup postupanju sa životinjama traži drugačije, alternativne pristupe (308) koji bi se koristili za probir lijekova i teratogena.

Stoga se razvijaju *in vitro* embrionalni i organoidni modeli koji mogu oponašati trodimenzionalnu (3D) morfogenezu tkiva u razvoju i na taj način omogućiti proučavanje direktnog utjecaja teratogena na razvojne procese u zametku (morfogeneza, proliferacija, migracija, diferencijacija) koji su sličniji u 3D modelima nego u 2D kulturama stanica u kojima nedostaju mnoge tkivne interakcije prisutne *in vivo*. Brojna istraživanja teratogena rađena su zato na modelu kulture cijelih zametaka (engl. *whole embryo culture*, WEC) postimplantacijskih zametaka štakora i miša, te je uočeno da toksične tvari induciraju specifičnu ekspresiju gena, zajedno s toksičnim efektom na morfogenezu zametka (309). Iako je teratogeni učinak valproata dosad istraživan na 2D staničnim kulturama i kulturama embrija, izbor ovog 3D modela u ovom istraživanju omogućio je proučavanje djelovanja valproata na sami zametak u užem smislu, čime je izbjegnuto utjecaj kompleksnog majčinog metabolizma (55). Naime, u ovom originalnom modelu *ex vivo* se kultivira gastrulirajući zametak štakora,

ali se prethodno embrionalni dio odvaja od ekstraembrionalnog dijela zametka (ektoplacentalnog konusa). Znači, zametak i ektoplacentalni konus kultiviraju se zasebno, čime se izbjegava njihovo tkivno međudjelovanje koje može zamaskirati biokemijsko djelovanje teratogena. U ovakvom sustavu može se, slično kao i u kulturama staničnih mikromasa, utvrditi djelovanje teratogena na molekularnom nivou, gdje se uz klasičnu morfološku analizu prate molekularni parametri razvoja (stanična diferencijacija, dioba i apoptoza) (310, 311). Dakako, novije transkriptomске analize omogućuju detekciju specifičnih promjena ekspresije gena i u ovakvim sustavima (312).

U ovom istraživanju izolirani embrionalni dio zametka (zametni štit) kultiviran je u mediju sa serumom sa dodatkom valproata i to kroz dva tjedna (uz nekoliko izmjena medija), čime je omogućeno dulje praćenje djelovanja valproata na rast i diferencijaciju nego što je to omogućeno u kratkotrajnijim *in vitro* kulturama cijelih zametaka.

Koristili smo koncentracije od 1 mM i 2 mM VPA koje su se pokazale kao netoksične u smislu preživljenja u kulturama stanica (313). U našem slučaju dodatak valproata u medij doveo je do redukcije u preživljenju što se očitovalo u značajnom smanjenom postotku razvijenih teratomu-sličnih struktura nakon dva tjedna samo kod primjene veće doze od 2 mM, kao što smo nedavno i objavili (296). Čini se da valproat u obje doze, iako netoksične, može smanjiti preživljenje također i zaobilaženjem svoje HDAC inhibitorne aktivnosti te u kombinaciji sa protutumorskim lijekom senzibilizirati stanice tumora na indukciju apoptoze putem inhibicije survivina (314). Stoga se postavlja pitanje je li i u ovom slučaju kod koncentracije od 2 mM došlo do indukcije apoptoze i zaustavljanja razvoja zametka. To je moguće jer se radi o fazi postimplantacijskog razvoja (gastrulacija), posebno osjetljivoj na teratogene, dok u ranijim preimplantacijskim fazama razvoja tretman s valproatom u dozi od 2 mM čak je i poboljšao razvoj povećavši stopu razvoja blastocista u svinje iako se to odrazilo kasnije na smanjenje preživljenja novorođenih VPA-tretiranih jedinki (315).

U našem modelu *in vitro* rast eksplantata zametnog štita najveći je u prvom tjednu (65) i u ovom tjednu je dobivena najveća supresija rasta u kulturama s valproatom, u odnosu na kontrolu. Kod primjene veće doze dobivena je supresija već od slijedećeg mjerenja (3. dan), slično kao i u drugim studijama koje opisuju da valproat u dozi od 2 mM izaziva inhibiciju staničnog ciklusa (314). Valproat u nižoj koncentraciji ima odgođen učinak, jer iako su eksplantati površinom manji od kontrole, pokazuju

značajan porast sve do 5. dana. Druge studije na kulturama cijelih zametaka štakora u ranom stadiju organogeneze pokazale su značajnu supresiju rasta već s dozom od 50 i 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Autori ističu da je tek 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NOAEL doza – bez efekta (engl. *no-observed-adverse-effect-level*) (316). Drugi pak, koristeći embrij pilića, pronalaze da je rast normalan sa dozom od 1,5 mM, no ne i navije, kada se javljaju velike malformacije neuralne cijevi (317). Na mišu i štakoru su studije pokazale da je negativni efekt valproata na preživljenje čak veći kod starijih zametaka (11.-13. dana gestacije), koji su s druge strane manje osjetljivi na razvoj malformacija. U ovoj studiji valproat je primijenjen na stadij razvoja rane neurule (10. dan gestacije kod štakora, 9. dan gestacije kod miša) 48 sati u dozama 0,6-1,8 mM. Kao i u našoj studiji, efekt na rast ovisio je o dozi, te je popraćen sa raznim dismorfo-genetskim defektima kao što su nepravilna segmentacija somita i nepravilna fuzija moždanih nabora (318).

Smanjenje rasta djelovanjem valproata povezano je sa zaustavljanjem staničnog ciklusa, ponajviše u G2/M fazi, jer se pokazalo na stanicama neuroblastoma da valproat u koncentraciji od 2 mM primijenjen tijekom 24 sata dovodi do smanjenja broja stanica u G1 fazi, i inducira zaustavljanje stanica u G2/M fazi staničnog ciklusa (314). No to opet ovisi o vrsti stanica na koje valproat djeluje jer je pokazano kod stanica kolangiokarcinoma čovjeka da obje doze (1 mM i 2 mM) mogu antiproliferativno djelovati čak i putem zaustavljanja ciklusa u G1/G0 fazi (232).

Da bismo istražili je li inhibitorni učinak valproata na rast eksplantata u prvom tjednu povezan sa smanjenjem proliferacije stanica, analizirana je ekspresija PCNA, markera proliferacije, kao i ekspresija Rb proteina, koji je jedan od glavnih regulatora staničnog ciklusa. Valproat je ovdje pokazao negativan učinak samo kod primjene veće koncentracije od 2 mM, što se može objasniti činjenicom da je supresija rasta kod primjene 1 mM u 2. tjednu kulture kompenzirana većom ekspresijom proliferacijskog markera koji potiču "oporavak". Drugim riječima, iako je došlo do inhibicije ukupnog rasta u prvom tjednu, stanice tretirane valproatom se nastavljaju dijeliti jednakim tempom kao u kontroli, pa se tako na kraju intezitet stanične proliferacije nije razlikovao od kontrolnog, iako je bio manji. Ova odgoda stanične proliferacije je pokazana i na stanicama teratokarcinoma u kulturi (319). Naša analiza ne može se usporediti sa drugim istraživanjima na kulturama stanica jer je tamo proučavan kratkotrajni učinak valproata (do 24 sata) pa je doza od 1 mM dovela do 50 %-tne inhibicije stanične proliferacije nakon 3 dana u F9 stanicama teratokarcinoma,

te nešto više, do 68% u stanicama P19 humanog teratokarcinoma, a poslije više nije istraživano (319). U prilog oporavku stanica, govori recentna studija o utjecaju valproata na diferencijaciju, gdje valproat u dozi od 1 mM primijenjen dugotrajno (do 4 tjedna) poboljšava diferencijaciju hADSc u kardiomiocite (320). Dodatno tomu, studija na staničnoj liniji humanog karcinoma ovarija potvrđuje i naš nalaz jer otkriva antiproliferacijski učinak na stanice tek kod doze od 2,5 mM. Kod ove doze primijećen je i citotoksični učinak koji se povezuje s apoptozom (321), što je vjerojatno slučaj i kod primjene u našem modelu zbog izrazito smanjenog preživljenja.

Novije studije ukazuju da HDACi (valproat i trihostatin A) blokiraju angiogenezu u tumorskim stanicama inducirajući ekspresiju endogenog inhibitora vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i receptora smrti 3 (engl. *Death receptor*, DR3) (322), štoviše, oboje djeluju i tako da direktno inhibiraju staničnu proliferaciju (323, 324). Moguće je da je i u našem sustavu došlo do indukcije ovakvih inhibitora stanične proliferacije, pa čak i receptora smrti stanice. Kako je naš eksplantat zapravo embrionalni teratom u kojem se znaju pronaći i krvni otočići i kapilare, moguće je da je blokiranje ukupnog rasta zapravo i bilo dijelom putem inhibicije ovakve primitivne angiogeneze koju ipak nismo istraživali.

Zbog supresije cjelokupnog rasta zametaka istraživali smo i mogući proapoptotični učinak valproata u našem biološkom sustavu. Povećanu apoptozu smo dokazali već nakon 3 dana, kod prve promjene medija. U nedavno objavljenom radu (296) pokazali smo da je proapoptotični učinak valproata u koncentraciji od 2 mM postojan i nakon 14 dana jer smo pronašli tipične biomarkere apoptoze u FTIR spektrima metaboloma potrošenih medija u biološkom sustavu teratoma deriviranih *in vitro* iz gastrulirajućih zametaka (296). Slično kao i sa rezultatima stanične proliferacije nakon dvotjedne kulture koja je suprimirana samo kod jače koncentracije, dobiven je također i značajan porast incidencije apoptotičnih stanica (volumenska gustoća) u volumenu tkiva samo kod primjene doze od 2 mM. To se slaže sa činjenicom da bi to bila prava proapoptotična doza, jer su koristeći istu dozu od 2 mM, u studiji na staničnim linijama raka dojke, Ma i sur. dokazali zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi pokazavši indukciju p21 i represiju ciklina D1 (ne i ciklina A i E) nakon tretmana valproatom kroz 48 sati. Autori smatraju da je intrinzični put apoptoze glavni put djelovanja valproata (325), s čime se slažu i studije utjecaja valproata na kultiviranim

pupoljcima udova *in vitro* koje također naglašavaju smanjenje survivina, te indukciju p53 i p21 (326).

Budući da je za zaustavljanje proliferacije, kao i za apoptozu, potrebno zakočiti stanični ciklus, istražili smo je li i valproat, barem u većoj dozi, djelovao tim mehanizmom na eksplantat. Stoga smo analizirali ekspresiju RB proteina, negativnog regulatora staničnog ciklusa, u kulturama s valproatom. U našim uzorcima, RB se ekspresirao u pojedinim stanicama nakon 3 dana kulture s valproatom, ali i u kontrolnim skupinama, pa je bilo nemoguće razlikovati eventualni učinak uvjeta kultiviranja i djelovanja lijeka. Ipak u kontrolama u kojima smo proveli analizu svjetlosnom mikroskopijom imunohistokemijskih signala primijetili smo ekspresiju RB proteina u jezgrama terminalno diferenciranih hodrocita, a u takvim jezgrama primjećena je i izrazita ekspresija acetiliranog histona. Prema tome, moguće je da je acetilacija histona koja razgradi nukleosome pa tako oslobodi pristup RNA polimerazi na DNA molekulu što je potrebno za transkripciju gena, možda upravo na promotoru gena *RB* dovela do mogućnosti njegove ekspresije jer se on inače i ekspresira u terminalno diferenciranim stanicama koje se nalaze u G0 fazi. *Western blot* analiza eksplantata nakon 2 tjedna nije pokazala kvantitativnu razliku u ekspresiji ovog proteina u kontroli i skupinama tretiranim valproatom koja se mogla očekivati prema prethodnim radovima (159). Sličan izgled ekspresije RB je nađen u *in vitro* studiji na stanicama, no autori su analizirali i ekspresiju fosforiliranog RB proteina koja je bila niža u stanicama tretiranim valproatom, što znači da valproat inhibira fosforilaciju RB proteina uzrokujući zastoj staničnog ciklusa i senescenciju (327).

Izostanak proapoptotičnog djelovanja kod doze od 1 mM slaže se sa prijašnjim istraživanjima na staničnim linijama neuroblastoma visokog rizika, gdje primjena ove koncentracije kroz 48 sati nije inducirala apoptozu, osim u sinergističkom djelovanju sa cisplatinom (313), što znači da VPA može senzibilizirati stanice na apoptozu vjerojatno putem inhibicije ekspresije survivina (314). Nadalje, studije na zamecima *in vivo* koje su dokazale indukciju apoptoze pojavnošću pocijepane kaspaze 3 nakon tretmana s valproatom (328) pokazale su još jednu važnu stvar - valproat djeluje tkivno specifično, istaknuvši neuralno tkivo kao najosjetljivije. Tako je *in vivo* tretman sa 500 mg/kg valproata nakon 60 minuta doveo do brze indukcije ekspresije Rad51, BRCA1, and BRCA2 u tkivima srčanog mišića što ukazuje na pokušaj popravka i očuvanja integriteta genoma, kao što je pokazano i u prijašnjim studijama gdje se ovi proteini

javlja se kao odgovor na genotoksični stres (329, 330). No indukcija *BRCA* gena nije primijećena u tkivima glave što znači da se ovdje nije aktivirao ovaj put popravka. Autori to objašnjavaju vjerojatnom razlikom u metaboliziranju i eliminaciji valproata iz tkiva, a zna se da je neuroepitel metabolički najaktivniji u tom razdoblju pa pokazuje osobine brzog upijanja i slabe eliminacije (331). Također, zna se da VPA mijenja ekspresiju gena koji reguliraju razvoj i zatvaranje neuralne cijevi što je dokazano putem inhibicije HDAC (332).

Vodeći se tom pretpostavkom, analizirana je i diferencijacija tkiva nakon kulture s valproatom koja je omogućena u ovom modelu jer se zametak kultivira do 2 tjedna razvoja u teratomu slične strukture u kojima dolazi do diferencijacije svih derivata zametnih listića (63, 65). Nakon dvotjedne kulture s dodatkom valproata, u eksplantatima tretiranim valproatom nađeni su tkivni derivati svih triju zametnih listića kao u kontroli (epidermis, mišićno tkivo, hrskavica, neuralno tkivo, epitel sličan crijevnom, žljezdani epitel). To znači da je u našem modelu, unatoč slabijem rastu i preživljenju, sposobnost za diferencijaciju i dalje prisutna. Iako su *in vivo* studije pokazale da HDACi induciraju zastoj u gastrulaciji, perturbaciju formacije mezoderma te reduciran oblik srednjeg i stražnjeg dijela tijela (209), brojne *in vitro* studije, poglavito na matičnim i tumorskim stanicama ističu prodiferencijacijsku ulogu valproata prema ektodermalnoj (190, 319) mezodermalnoj (333) i endodermalnoj liniji (334). Noviji podaci ističu pozitivan utjecaj valproata u regenerativnoj medicini u dobivanju induciranih neuralnih matičnih stanica i njihove diferencijacije u nerone aktivacijom mTOR i glikogen sintaze  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) signalnog puta (335, 336).

Ipak, primijenjena koncentracija od 2 mM VPA značajno je smanjila diferencijaciju svih tkiva, što može biti i korelirano sa supresijom rasta i preživljenja. Ponajviše se to odrazilo na prisutnost markera živčanog tkiva, dok je u 50 % eksplantata tretiranih sa 2 mM VPA ipak došlo do razvoja epidermisa i miotuba. Što se epidermisa tiče, u studijama na našem modelu pokazalo se da je njegov diferencijacijski put najmanje osjetljiv na različite agense i kemijske uvjete (62), a pokazalo se da valproat i poboljšava njegovu diferencijaciju (337). Nadalje, iako značajno slabiji nego u kontrolama, nešto bolji razvoj miotuba nego ostalih tkiva s koncentracijom od 2 mM VPA u našem modelu slaže se sa najnovijim spoznajama o epigenetičkoj regulaciji razvoja mišićnog tkiva koja je iznjedrila i ideju o manipulaciji miogeneze epigenetičkim lijekovima u liječenju mišićne distrofije (338, 339).



Za valproat, kao i za trihostatin A, pokazano je da poboljšavaju fuziju mioblasta u miotube (340), te razvoj skeletnih miocita *in vitro* iz pluripotentnih matičnih stanica u manjoj dozi od 0,5 mM (341), vjerojatno putem djelovanja na MyoD-posredovano epigenetičko programiranje tijekom procesa diferencijacije (342, 343). Valproat čak slovi kao "booster" miogenog potencijala (344) jer omogućuje diferencijaciju miocita iz pluripotentnih matičnih stanica, čak iz bez prethodne konverzije u mezoderm (dakle, direktno transdiferencijacijom fibroblasta i matičnih stanica iz masnog tkiva) (345, 346). U nekim studijama nađen je kontra-učinak valproata na miogenu diferencijaciju (347), koje su pokazale da valproat djeluje ovisno o razvojnom stadiju.

U ovoj disertaciji valproat je primijenjen na stanice gastrulirajućeg zametka kroz prolongirani period od 2 tjedna, te i kada se radilo o netoksičnoj dozi od 1 mM došlo je do značajne inhibicije razvoja živčanog tkiva, što je dokazano nedostatkom imunohistokemijske ekspresije neurofilamenta NF1 i GFAP. Neke studije ukazuju na to da valproat djeluje suprotno, kao pojačivač diferencijacije neuralnih progenitora u neurone (221), ili pak kao induktor neuroprogenitora iz mezenhimalnih stromalnih stanica (348), dok druge studije na hipokampalnim stanicama štakora izoliranog iz neonatusa sa sličnom dozom ukazuju na inhibitornu ulogu valproata u razvoju astrocita jer dovodi do smanjenja GFAP proteina, markera astrocita, promovirajući neuronalnu diferencijaciju (349).

Dakle, valproat vjerojatno pokazuje dvojak efekt ovisan o dozi, budući da se diferencijacija poboljšava sa manjom dozom (0,2 – 0,5 mM) (348). S druge strane, rezultati *in vitro* su oprečni s onima *in vivo* gdje je recentno pokazano na primatima da valproat inhibira NeuN i povećava ekspresiju GFAP, no samo u određenim dijelovima mozga, što dovdi do autističnog ponašanja (272).

Što se tiče drugog markera, NF160, čija je ekspresija bila očito smanjena kod doze od 1 mM, pokazano je i na stanicama neuroblastoma da valproat modulira njegovu ekspresiju inhibirajući rast neurita, čak i kod terapijske doze u plazmi od 0,5 mM (350). Zanimljivo, ukoliko se ukloni valproat, dolazi do reverznog procesa i ekspresije NF160. Kad uspoređujemo druga istraživanja na staničnoj liniji teratokarcinoma, porijeklom iz zametka stadija gastrulacije (kao što i naš model), nađeno je da valproat djeluje prodiferencijacijski u manjoj dozi od 1 mM inducirajući specifične diferencijacijske markere, različite od drugih teratogena koji djeluju na F9

EC stanice. Ovdje valproat inducira ekspresiju *c-fos*, keratina 18, te posebno aktivirajućeg proteina 2 transkripcijskog faktora (AP-2a), regulatora diferencijacije stanica sličnih stanicama neuralnog grebena. Ono što je zanimljivo je da kemikalije koje su strukturno slične valproatu nisu pokazale ovakav efekt, dakle specifičan je za valproat (319).

Da bismo dokazali da je valproat djelovao kao inhibitor histonskih deacetilaza, napravili smo analizu acetiliranog histona H3 u uzorcima eksplantata nakon dva tjedna kulture. Kvantitativna analiza pokazala je porast ovisan o dozi, no značajan porast acetilacije bio je samo kod veće koncentracije od 2 mM, kao što smo nedavno objavili (296). Rezultati koje smo dobili reflektiraju ranije studije na HeLa stanicama gdje je pokazano da primjena doze valproata od 0,25 mM dovodi do pojačane acetilacije, koncentracija od 1 mM dovodi već nakon 12-16 sati do maksimalne acetilacije histona (190), a sa dozom od 2 mM se postiže masovna acetilacija stanica. Dakle, možemo zaključiti da je embriotoksično djelovanje valproata u našem modelu također posljedica povećane acetilacije histona, što smo potvrdili i FTIR spektroskopijom, pokazavši da se acetilacijski učinak valproata može vidjeti i u odgovarajućim FTIR biomarkerima u metabolomu potrošenog kultivacijskog medija (296). Studije na *in vitro* modelu F9 stanica teratokarcinoma, potvrđuju naš nalaz pa bi upravo acetilacijski učinak valproata bio odgovoran za teratogeni efekt (351).

U radu smo analizirali i učinak valproata na globalne metilacijske promjene u eksplantatima, jer se zna da valproat može mijenjati i globalnu metilaciju DNA (352, 353), kao i metilaciju pojedinih gena (354), čime se objašnjava npr. njegov prodiferencijacijski učinak (291). U našem modelu metilacija je analizirana pirosekvenciranjem LINE 1 sekvenci, kojima se istražuje globalna metilacija genoma (305). Analizirali smo metilaciju LINE 1 nakon 14 dana i nismo dobili statistički značajnu razliku između kontrole i valproatom-tretiranih skupina. To nije u skladu s našim očekivanjima jer je uglavnom putem tretmana valproatom pokazano međudjelovanje acetilacije histonskih repova i promjene u DNA metilaciji na brojnim staničnim kulturama kao što su humane stanične linije raka dojke (355), stanice neuroblastoma (161), neuralne matične stanice štakora (354, 356) i stanice tumora pluća (352). Novije studije na HeLa stanicama ukazuju na djelovanje valproata u repakiranju kromatina opet ovisno o koncentraciji (357), gdje manja doza (1 mM) potiče aktivni proces demetilacije (putem indukcije 5-hMC), uz vjerojatnost indukcije demetilacije putem

pasivnog puta (smanjujući ekspresiju DNMT) u proliferirajućim stanicama (358). Iako je proces acetilacije histona vrlo brz i promjenjiv, to nije slučaj s DNA metilacijom, koja ima trajniji efekt (359, 360), a shodno ovim studijama koje su koristile koncentracije valproata od 1 i 20 mM moguće je da valproat mijenja metilaciju samo u većoj koncentraciji. Isto tako, nedostatak efekta na metilaciju u proučavanim dozama valproata u našem modelu može se objasniti specifičnošću djelovanja valproata jer smo tretirali stanice zametka, a niti na mišjim embrionalnim stanicama valproat nije izazvao promjene u metilaciji DNA (361).

Na kraju istražili smo učinak valproata i na razvoj ektoplacentalnog konusa *in vitro*. Ektoplacentalni konus je embrionalna struktura, koja nastaje iz trofoblasta zametka, koja će u interakciji s majčinim uterušnim decidualnim stanicama doprinijeti razvoju placente (5). Kada se ektoplacentalni konus kultivira zasebno od embrionalnog dijela, može se istraživati utjecaj epigenetičkih lijekova poput 5-azacitidina direktno na ekstraembrionalni dio zametka koji je izvor stanica buduće placente (307). Kultivirali smo ektoplacentalni konus samo 3 dana, zbog iznimne osjetljivosti tkiva na *in vitro* uvjete (307). Utjecaj valproata bio je sličan kao i na zametni štit, smanjivši značajno rast eksplantata u odnosu na kontrole. Vjerojatno se radi opet o dobro pogođenoj dozi, jer je primjena valproata *in vitro* na humanu staničnu liniju trofoblasta (HTR-8/SVneo) u manjim dozama (od 25-400 mikromola), negativno utjecala na migracijsku sposobnost, ali ne i na proliferaciju stanica (362). Treba također reći da se kod nas radilo o, iz živog organizma izoliranoj, čitavoj embrionalnoj strukturi koja je sama po sebi trodimenzionalna, a ne o 2D kulturi stanica.

Nadalje, u slučaju ektoplacentalnih konusa, parametar ukupnog rasta nije baš uvjerljivo bio povezan s negativnim utjecajem na preživljenje, jer su i eksplantati same kontrolne skupine smanjeno preživljavali. Ipak, nakon 3 dana su bile pronađene sporadične divovske stanice trofoblasta (307). Samo u V1 skupini dokazan je CD36 marker koji upućuje na metaboliziranje lipida u *in vitro* kultiviranim stanicama trofoblasta, kao i u placentama *in vivo* (363, 364). CD36 je multiligandni glikoproteinski receptor, najpoznatiji po vezanju trombospodina 1 (TSP-1), koji djeluje kao negativni regulator angiogeneze (365, 366). Poznato je da CD36 djeluje kao prijenosnik i senzor slobodnih masnih kiselina (367, 368) i receptor za uklanjanje tvari koji veže brojne faktore i sudjeluje u internalizaciji stanica, patogena i različitih lipoproteina (369), što

znači da je i u slučaju tretmana konusa sa 1 mM valproata zadržana metabolička aktivnost stanica.

Kod našeg modela, vjerojatno se radi veličini doze, jer kod manjih doza (100 mikroM) je uočeno da valproat ne utječe na diferencijaciju multijezgrenih divovskih stanica trofoblasta u modelima *in vitro* (370). Smatra se da valproat nije primarni supstrat za stanične transportere u placenti i izgleda da se ne akumulira značajno u zametku (371). S druge strane, na humanim decidualnim stanicama *in vitro* pokazan je negativan učinak valproata na sekreciju embrionalnih ektoplacentalnih stanica koja je nužna za kontinuitet placentalnih struktura. Naime, nađeno je da valproat inhibira ekspresiju vimentina u ektoplacentalnim stanicama, koji je nužan za invaziju trofoblasta i implantaciju, te negativno utječe na mehanizam adhezije embrija u uterusu smanjujući ekspresiju laminina i kolagena IV (372).

Na kraju zaključujemo da je u našem *ex vivo* modelu dvotjedne *in vitro* kulture zametnog štita štakora dodatak epigenetičkog lijeka valproata u medij imao negativni učinak na razvojne parametre ovisno o primijenjenoj koncentraciji lijeka, a putem inhibicije histonske deacetilacije iako bez promjene globalne DNA metilacije.

Rezultati ovog istraživanja doprinose modernim spoznajama o epigenetičkim mehanizmima djelovanja valproata koji, mijenjajući razvojne procese na staničnoj i tkivnoj razini, djeluje embriotoksično i teratogeno. S druge strane gledano, u ovom originalnom 3D biološkom sustavu iz zametka se razvija embrionalni teratom, a navedeni rezultati smanjenja rasta, proliferacije i povećanja apoptoze koje smo dobili istraživanjem mehanizma utjecaja valproata upućuju na važnost daljnjeg istraživanja valproata u liječenju tumora *in vivo*, a posebno onih pretpostavljenog embrionalnog porijekla, kao što su tumori testisa (293).

Dobiveni rezultati ističu također važnost bazičnih istraživanja za moguću kliničku uporabu valproata i ostalih HDAC inhibitora u nekim novim indikacijama u smislu poboljšanja miogeneze i slično (373, 374) (375, 376).

U našem nedavno objavljenom radu o istraživanju metaboloma potrošenih medija u ovom modelu kulture zametaka štakora, djelovanje valproata moglo se uočiti i na molekularnoj razini osjetljivom i brzom metodom FTIR spektroskopije. Potvrdili smo i u svom istraživanju već prije opisane promjene u vibraciji kemijskih veza koje predstavljaju FTIR-biomarkere povećane acetilacije i apoptoze u skupinama

tretiranim sa 2 mM valproatom *in vitro* (296). Primjenom analize potrošenog medija s valproatom, kompletirali smo svoj originalni biološki sustav čiji jedini preostali dio koji prethodno nije bio podvrgnut analizi je bio upravo potrošeni medij. Sada možemo slobodno reći da raspolažemo s kompletnim biološkim sustavom za probir novih lijekova u kojemu se svi pojedini parametri mogu analizirati i uspoređivati, pa u njemu možemo još preciznije i brže proučavati embriotoksične i antitumorske terapije koje negativno utječu na proliferaciju, a pozitivno na apoptozu.

## 7. ZAKLJUČCI

Iz prikazanih rezultata disertacije mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. U *ex vivo* modelu dvotjedne *in vitro* kulture gastrulirajućeg zametka u užem smislu, dodatak epigenetičkog lijeka valproata (1 mM ili 2 Mm) u medij imao je negativni učinak na preživljenje u većoj koncentraciji. Prema tome, VPA je negativno djelovao na preživljenje gastrulirajućeg zametka sisavca ovisno o primijenjenoj koncentraciji lijeka, tj. bio je embriotoksičan u većoj koncentraciji.
2. VPA je negativno djelovao na ukupni rast zametka u obje koncentracije već tijekom prvog tjedna kulture, a negativni učinak je bio također veći sa većom dozom VPA, pa se i ovdje zaključuje da je djelovanje valproata na rast bilo također u ovisnosti o koncentraciji lijeka.
3. Sukladno djelovanju na rast, valproat je negativno djelovao i na proliferativnu aktivnost ovisno o koncentraciji jer značajno smanjuje indeks proliferacije stanica samo u većoj koncentraciji. Zaključujemo da je smanjenje ukupnog rasta dijelom uzrokovano smanjenjem potencijala za proliferaciju s većom koncentracijom VPA.
4. Dodatak valproata u medij ima proapoptotični učinak, također ovisno o dozi, jer je povećana apoptoza nađena samo kod primjene veće koncentracije. Prema tome, veća koncentracija VPA djelovala je također putem apoptoze na smanjenje ukupnog rasta.
5. Nakon dvotjedne kulture s dodatkom valproata, razvijene teratomu-slične strukture sadržavale su ista tkiva kao u kontroli, no sa značajno manjom incidencijom živčanog tkiva koja je bila još manja u većoj koncentraciji VPA. Kod veće koncentracije, incidencija svih diferenciranih tkiva, osim nezrelog mezenhima, bila je značajno smanjena u odnosu na kontrolu, što znači da sposobnost za diferencijaciju nije posve blokirana, no opada s porastom doze. Dakle, valproat djeluje negativno na diferencijaciju, posebno živčanog tkiva, opet u ovisnosti o dozi.

6. Valproat je pokazao svoje epigenetičko djelovanje inhibitora histonskih deacetilaza (HDACi) jer je uzrokovao povećanu acetilaciju histona u strukturi embrionalnog teratoma nakon dvotjedne kulture, tim veću uz primjenu veće koncentracije, ali takvo njegovo djelovanje nije bilo povezano sa promjenom globalne metilacije DNA. I ovdje zaključujemo da je HDACi aktivnost ovisna o dozi.
7. U originalnom modelu kultivacije ektoplacentalnog konusa izoliranog iz čitavog gastrulirajućeg zametka sisavaca dodatak valproata imao je slično djelovanje kao i na zametak u užem smislu riječi smanjivši značajno rast u obje koncentracije valproata. Što se tiče preživljenja i diferencijacije stanica trofoblasta, u usporedbi dvaju VPA tretmana, čini se slabije s većom koncentracijom VPA.



## 8. SAŽETAK

Valproat (VPA), antiepileptički lijek/teratogen je također epigenetički inhibitor histonske deacetilaze (HDACi). Cilj disertacije bio je istražiti aktivnost VPA na gastrulaciju sisavaca u modelu *ex vivo* lišenog složenog majčinog utjecaja. Štakorski Fisher zameci stari 9,5 dana (tri zametna listića) uzgajali su se 14 dana, a ektoplacentalni konusi (podrijetlo buduće posteljice) 3 dana. Korišten je Eagle-ov MEM i serum štakora (1:1) s 1 mM ili 2 mM VPA. Pronađen je negativni utjecaj 2 mM valproata na preživljenje, rast, indeks proliferacije stanica i povećanu volumensku gustoću apoptotičnih stanica, zajedno sa značajno nižom učestalošću svih diferenciranih derivata triju zametnih listića (epidermisa, živčanog tkiva, hrskavice, mišića, crijevnog epitela) u teratomima koji se razvijaju tijekom kulture. 1 mM VPA manje je negativno utjecao na rast i na diferencijaciju živčanog tkiva. VPA je povećao acetilaciju histona H3AcK9, a da nije promijenio globalnu metilaciju DNA procijenjenu pirosekvenciranjem. Valproat je negativno utjecao na preživljenje i rast ektoplacentalnih konusa. U našem prirodnom 3D *in vitro* biološkom sustavu dokazana je embriotoksičnost ovisna o dozi, uzrokovana VPA-induciranom acetilacijom histona već pri gastrulaciji. Budući da je VPA istodobno negativno utjecao na razvoj embrionalnog teratoma, to bi bilo relevantno za novi terapijski pristup sličnim tumorima u ljudi.

## 9. SUMMARY

### Impact of valproate on postimplantation embryos in an *ex vivo* model of rat development

MILVIJA PLAZIBAT

2020

Valproate (VPA), an antiepileptic drug/teratogen is also an epigenetic histone deacetylase inhibitor (HDACi). The aim of dissertation was to investigate VPA activity on mammalian gastrulation in the *ex vivo* model devoid of complex maternal influence. 9.5 day-old rat Fisher embryos (three germ layers) were cultivated for 14 days and ectoplacental cones (origin of future placenta) for 3 days. Eagle's MEM and rat serum (1:1) with 1 mM or 2 mM VPA was used. The negative influence of 2 mM valproate on survival, growth, cell proliferation index and increased volume density of apoptotic cells was assessed, together with a significantly lower incidence of all differentiated three germ layer derivatives (epidermis, neural tissue, cartilage, muscle, gut epithelium) in teratoma that develops during the culture. 1 mM VPA less negatively influenced growth and differentiation of nervous tissue alone. VPA increased H3AcK9 histone acetylation without altering global DNA methylation assessed by pyrosequencing. Valproate negatively affected survival and growth of ectoplacental cones. In our natural 3D *in vitro* biological system, a dose dependent embryotoxicity, caused by VPA-induced histone acetylation already at gastrulation, was demonstrated. Since VPA simultaneously negatively affected the development of embryonic teratoma, this would be relevant for a new therapeutic approach of similar tumors in humans.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Giussani DA, Davidge ST. Developmental programming of cardiovascular disease by prenatal hypoxia. *J Dev Orig Health Dis*. 2013;4(5):328-37.
2. Muzic V, Katusic Bojanac A, Juric-Lekic G, Himmelreich M, Tupek K, Serman L, et al. Epigenetic drug 5-azacytidine impairs proliferation of rat limb buds in an organotypic model-system in vitro. *Croat Med J*. 2013;54(5):489-95.
3. Hadjkacem I, Ayadi H, Turki M, Yaich S, Khemekhem K, Walha A, et al. Prenatal, perinatal and postnatal factors associated with autism spectrum disorder. *J Pediatr (Rio J)*. 2016;92(6):595-601.
4. Katusic Bojanac A, Rogosic S, Sincic N, Juric-Lekic G, Vlahovic M, Serman L, et al. Influence of hyperthermal regimes on experimental teratoma development in vitro. *Int J Exp Pathol*. 2018;99(3):131-44.
5. Gilbert SF, Barresi MJF. *Developmental biology*, 11th edition 2016. American Journal of Medical Genetics Part A. 2017;173(5):1430-.
6. Wells PG, Kim PM, Laposa RR, Nicol CJ, Parman T, Winn LM. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res*. 1997;396(1-2):65-78.
7. Hansen JM, Gong SG, Philbert M, Harris C. Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappaB-dependent limb outgrowth pathway by thalidomide. *Dev Dyn*. 2002;225(2):186-94.
8. Tung EW, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;248(3):201-9.
9. Bulic-Jakus F, Ulamec M, Vlahovic M, Sincic N, Katusic A, Juric-Lekc G, et al. Of mice and men: teratomas and teratocarcinomas. *Coll Antropol*. 2006;30(4):921-4.
10. Lendvai A, Deutsch MJ, Plosch T, Ensenauer R. The peroxisome proliferator-activated receptors under epigenetic control in placental metabolism and fetal development. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;310(10):E797-810.
11. Hogan BL, Blessing M, Winnier GE, Suzuki N, Jones CM. Growth factors in development: the role of TGF-beta related polypeptide signalling molecules in embryogenesis. *Dev Suppl*. 1994:53-60.
12. Sadler TW. Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005;15(1):2-8.

13. Chang C, Hemmati-Brivanlou A. Cell fate determination in embryonic ectoderm. *J Neurobiol.* 1998;36(2):128-51.
14. Burke AC, Nowicki JL. A new view of patterning domains in the vertebrate mesoderm. *Dev Cell.* 2003;4(2):159-65.
15. Tam PP, Kanai-Azuma M, Kanai Y. Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(4):393-400.
16. Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review. *Placenta.* 2005;26(9):015.
17. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science.* 1994;266(5190):1508-18.
18. Jollie WP. Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology.* 1990;41(4):361-81.
19. Slikker Jr W, Miller RK. Role in Developmental Toxicology. *Developmental toxicology.* 1994:245.
20. Burton GJ, Kaufmann P, Huppertz B. Anatomy and genesis of the placenta. *Knobil and Neill's physiology of reproduction.* 2006;1:189-244.
21. Carter AM, Martin RD. Comparative anatomy and placental evolution. *Placental Bed Disorders*, 1st ed R Pijnenborg, I Brosens, and R Romero (eds) Cambridge University Press, Cambridge. 2010:109-26.
22. Khera KS. A morphologic basis postulated for valproic acid's embryotoxic action in rats. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1992;12(6):277-89.
23. Khera KS. Valproic acid-induced placental and teratogenic effects in rats. *Teratology.* 1992;45(6):603-10.
24. Semczuk-Sikora A, Semczuk M. [Effect of anti-epileptic drugs on human placenta and the fetus]. *Ginekol Pol.* 2004;75(2):166-9.
25. Kohan-Ghadr HR, Kadam L, Jain C, Armant DR, Drewlo S. Potential role of epigenetic mechanisms in regulation of trophoblast differentiation, migration, and invasion in the human placenta. *Cell Adh Migr.* 2016;10(1-2):126-35.
26. Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta.* 1981;2(1):71-91.
27. Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Hagio S, Ogawa I. Toxicological pathology in the rat placenta. *J Toxicol Pathol.* 2011;24(2):95-111.

28. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*. 2002;23(1):3-19.
29. Maranghi F, Macri C, Ricciardi C, Stazi AV, Mantovani A. Evaluation of the placenta: suggestions for a greater role in developmental toxicology. *Adv Exp Med Biol*. 1998;444:129-36.
30. Edwards MJ, Walsh DA, Li Z. Hyperthermia, teratogenesis and the heat shock response in mammalian embryos in culture. *Int J Dev Biol*. 1997;41(2):345-58.
31. Wilson JG. Experimental studies on congenital malformations. *J Chronic Dis*. 1959;10(2):111-30.
32. Alwan S, Chambers CD. Identifying Human Teratogens: An Update. *J Pediatr Genet*. 2015;4(2):39-41.
33. Shepard TH, Lemire RJ. *Catalog of Teratogenic Agents*: Johns Hopkins University Press; 2007.
34. Crnek V, Vlahovic M, Skreb N. Retinoic acid can change normal differentiation of rat egg-cylinders cultured in vitro. *Int J Dev Biol*. 1991;35(3):197-202.
35. Skreb N, Bulic-Jakus F, Crnek V, Stepic J, Vlahovic M. Differentiation and growth of rat egg-cylinders cultured in vitro in a serum-free and protein-free medium. *Int J Dev Biol*. 1993;37(1):151-4.
36. Lancaster PA. Causes of birth defects: lessons from history. *Congenit Anom*. 2011;51(1):2-5.
37. McBride WG. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*. 1961;2(1358):90927-8.
38. Bulic-Jakus F, Vlahovic M, Juric-Lekic G, Crnek-Kunstelj V, Serman D. Gastrulating Rat Embryo in a Serum-free Culture Model: Changes of Development Caused by Teratogen 5-Azacytidine. *Altern Lab Anim*. 1999;27(6):925-33.
39. Serman L, Vlahovic M, Sijan M, Bulic-Jakus F, Serman A, Sincic N, et al. The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. *Placenta*. 2007;28(8-9):803-11.
40. Vlahovic M, Bulic-Jakus F, Juric-Lekic G, Fucic A, Maric S, Serman D. Changes in the placenta and in the rat embryo caused by the demethylating agent 5-azacytidine. *Int J Dev Biol*. 1999;43(8):843-6.
41. Brent RL. The effects of embryonic and fetal exposure to X-ray, microwaves, and ultrasound. *Clin Obstet Gynecol*. 1983;26(2):484-510.

42. Alves-Pimenta S, Colaco B, Oliveira PA, Venancio C. Biological Concerns on the Selection of Animal Models for Teratogenic Testing. *Methods Mol Biol.* 2018;7883-0\_3.
43. Calap-Quintana P, Gonzalez-Fernandez J, Sebastia-Ortega N, Llorens JV, Molto MD. *Drosophila melanogaster* Models of Metal-Related Human Diseases and Metal Toxicity. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
44. Hunt PR. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J Appl Toxicol.* 2017;37(1):50-9.
45. Nigon VM, Felix MA. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook.* 2017;7:1-84.
46. Delvecchio C, Tiefenbach J, Krause HM. The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay Drug Dev Technol.* 2011;9(4):354-61.
47. Segerdell E, Ponferrada VG, James-Zorn C, Burns KA, Fortriede JD, Dahdul WM, et al. Enhanced XAO: the ontology of *Xenopus* anatomy and development underpins more accurate annotation of gene expression and queries on Xenbase. *J Biomed Semantics.* 2013;4(1):2041-1480.
48. Sobocan N, Katusic Bojanac A, Sincic N, Himmelreich-Peric M, Krasic J, Majic Z, et al. A Free Radical Scavenger Ameliorates Teratogenic Activity of a DNA Hypomethylating Hematological Therapeutic. *Stem Cells Dev.* 2019;28(11):717-33.
49. Leroy M, Allais L. Teratology studies in the rat. *Methods Mol Biol.* 2013;947:95-109.
50. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013;4(6):624-30.
51. Piersma AH, Genschow E, Verhoef A, Spanjersberg MQ, Brown NA, Brady M, et al. Validation of the postimplantation rat whole-embryo culture test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern Lab Anim.* 2004;32(3):275-307.
52. Zhang CX, Danberry T, Jacobs MA, Augustine-Rauch K. A dysmorphology score system for assessing embryo abnormalities in rat whole embryo culture. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2010;89(6):485-92.
53. Harmonised tripartite guideline. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility, ICH Topic S 5 (R2), Stat. CPMP/ICH/386/95 (2000).

54. Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology. Amsterdam: Academic Press; 2013; Available from: <http://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20101678509>.
55. Friedman L. Teratological research using in vitro systems. II. Rodent limb bud culture system. *Environ Health Perspect.* 1987;72:211-9.
56. Smith EL, Kanczler JM, Oreffo RO. A new take on an old story: chick limb organ culture for skeletal niche development and regenerative medicine evaluation. *Eur Cell Mater.* 2013;26:91-106.
57. Harris C. Rat Whole Embryo Culture. *Methods Mol Biol.* 2019:9182-2\_14.
58. New DA. The culture of postimplantation embryos. *Hum Reprod.* 1991;6(1):58-63.
59. Sturm K, Tam PP. Isolation and culture of whole postimplantation embryos and germ layer derivatives. *Methods Enzymol.* 1993;225:164-90.
60. Cockroft DL. A comparative and historical review of culture methods for vertebrates. *Int J Dev Biol.* 1997;41(2):127-37.
61. Bulic-Jakus F, Skreb N, Juric-Lekic G, Svajger A. Transferrin enhances lentoid differentiation in rat egg cylinders cultivated in a chemically defined medium. *Int J Dev Biol.* 1990;34(2):275-9.
62. Bulic-Jakus F, Strahinic-Belovari T, Maric S, Jezek D, Juric-Lekic G, Vlahovic M, et al. Chemically defined protein-free in vitro culture of mammalian embryo does not restrict its developmental potential for differentiation of skin appendages. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(2):134-43.
63. Skreb N, Svajger A. Histogenetic capacity of rat and mouse embryonic shields cultivated in vitro. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org.* 1973;173(3):228-34.
64. De Valck D, Luyten FP. Caspase inhibition supports proper gene expression in ex vivo mouse limb cultures. *Cell Death Differ.* 2001;8(10):985-94.
65. Skreb N, Crnek V. Development of embryo-derived teratomas in vitro. *Results Probl Cell Differ.* 1980;11:283-9.
66. Belovari T, Bulic-Jakus F, Juric-Lekic G, Maric S, Jezek D, Vlahovic M. Differentiation of rat neural tissue in a serum-free embryo culture model followed by in vivo transplantation. *Croat Med J.* 2001;42(6):611-7.
67. Bulic-Jakus F, Juric-Lekic G, Vlahovic M, Rasic S, Lokosek V, Radujkovic V, et al. Development of epithelia in experimental teratomas derived from rodent embryos. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2008;16(3):119-22.



68. Bulic-Jakus F, Katusic Bojanac A, Juric-Lekic G, Vlahovic M, Sincic N. Teratoma: from spontaneous tumors to the pluripotency/malignancy assay. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2016;5(2):186-209.
69. Skreb N, Bulic F. Partial differentiation of rat egg cylinders in serum-free and protein-free medium. *Dev Biol.* 1987;120(2):584-6.
70. Belovari T, Stevic N, Gajovic S, Kostovic-Knezevic L. Differentiation and developmental potential of rat post-implantation embryo without extra-embryonic membranes cultured in vitro or grafted in vivo. *Anat Histol Embryol.* 2004;33(2):90-5.
71. Fabijanovic D, Serman A, Jezic M, Katusic A, Sincic N, Curkovic-Perica M, et al. Impact of 5-azacytidine on rat decidual cell proliferation. *Int J Exp Pathol.* 2014;95(4):238-43.
72. Caluwaerts S, Pijnenborg R, Luyten C, Van Assche FA. Growth characteristics of diabetic rat ectoplacental cones in vivo and in vitro. *Diabetologia.* 2000;43(7):939-45.
73. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
74. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(4):1286-90.
75. Jones SM, Kazlauskas A. Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Biol.* 2001;3(2):165-72.
76. Zwang Y, Sas-Chen A, Drier Y, Shay T, Avraham R, Lauriola M, et al. Two phases of mitogenic signaling unveil roles for p53 and EGR1 in elimination of inconsistent growth signals. *Mol Cell.* 2011;42(4):524-35.
77. Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10699-704.
78. Hinds PW, Mitnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell.* 1992;70(6):993-1006.
79. Zarkowska T, Mitnacht S. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 1997;272(19):12738-46.
80. Ludlow JW, Glendening CL, Livingston DM, DeCarprio JA. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 1993;13(1):367-72.

81. Akiyama T, Ohuchi T, Sumida S, Matsumoto K, Toyoshima K. Phosphorylation of the retinoblastoma protein by cdk2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(17):7900-4.
82. Weinberg RA. *The biology of cancer*: Garland science; 2013.
83. Zetterberg A, Larsson O. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(16):5365-9.
84. Moser J, Miller I, Carter D, Spencer SL. Control of the Restriction Point by Rb and p21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(35):E8219-E27.
85. Spencer SL, Cappell SD, Tsai FC, Overton KW, Wang CL, Meyer T. The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell*. 2013;155(2):369-83.
86. Naetar N, Soundarapandian V, Litovchick L, Goguen KL, Sablina AA, Bowman-Colin C, et al. PP2A-mediated regulation of Ras signaling in G2 is essential for stable quiescence and normal G1 length. *Mol Cell*. 2014;54(6):932-45.
87. Arora M, Moser J, Phadke H, Basha AA, Spencer SL. Endogenous Replication Stress in Mother Cells Leads to Quiescence of Daughter Cells. *Cell Rep*. 2017;19(7):1351-64.
88. Barr AR, Cooper S, Heldt FS, Butera F, Stoy H, Mansfeld J, et al. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nat Commun*. 2017;8(14728).
89. Yang HW, Chung M, Kudo T, Meyer T. Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. *Nature*. 2017;549(7672):404-8.
90. Lezaja A, Altmeyer M. Inherited DNA lesions determine G1 duration in the next cell cycle. *Cell Cycle*. 2018;17(1):24-32.
91. Coleman KE, Grant GD, Haggerty RA, Brantley K, Shibata E, Workman BD, et al. Sequential replication-coupled destruction at G1/S ensures genome stability. *Genes & development*. 2015;29(16):1734-46.
92. Overton KW, Spencer SL, Noderer WL, Meyer T, Wang CL. Basal p21 controls population heterogeneity in cycling and quiescent cell cycle states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(41):E4386-E93.
93. Harrigan JA, Belotserkovskaya R, Coates J, Dimitrova DS, Polo SE, Bradshaw CR, et al. Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *Journal of Cell Biology*. 2011;193(1):97-108.

94. Mattock H, Lane DP, Warbrick E. Inhibition of cell proliferation by the PCNA-binding region of p21 expressed as a GFP miniprotein. *Exp Cell Res.* 2001;265(2):234-41.
95. Slade D. Maneuvers on PCNA Rings during DNA Replication and Repair. *Genes.* 2018;9(8).
96. Fridman Y, Palgi N, Dovrat D, Ben-Aroya S, Hieter P, Aharoni A. Subtle alterations in PCNA-partner interactions severely impair DNA replication and repair. *PLoS Biol.* 2010;8(10):1000507.
97. Boehm EM, Goldenberg MS, Washington MT. The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *Enzymes.* 2016;39:231-54.
98. Choe KN, Moldovan GL. Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork. *Mol Cell.* 2017;65(3):380-92.
99. De March M, De Biasio A. The dark side of the ring: role of the DNA sliding surface of PCNA. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2017;52(6):663-73.
100. Mailand N, Gibbs-Seymour I, Bekker-Jensen S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(5):269-82.
101. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 2007;129(4):665-79.
102. Knudsen KE, Booth D, Naderi S, Sever-Chroneos Z, Fribourg AF, Hunton IC, et al. RB-dependent S-phase response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2000;20(20):7751-63.
103. Chau BN, Pan CW, Wang JY. Separation of anti-proliferation and anti-apoptotic functions of retinoblastoma protein through targeted mutations of its A/B domain. *PLoS One.* 2006;1(1):0000082.
104. Indovina P, Pentimalli F, Casini N, Vocca I, Giordano A. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget.* 2015;6(20):17873-90.
105. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(5):297-306.
106. Munro S, Carr SM, La Thangue NB. Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene.* 2012;31(40):4343-52.
107. Hilgendorf KI, Leshchiner ES, Nedelcu S, Maynard MA, Calo E, Ianari A, et al. The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes Dev.* 2013;27(9):1003-15.

108. Dupont C, Froenicke L, Lyons LA, Bavister BD, Brenner CA. Chromosomal instability in rhesus macaque preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 2009;91(4):1230-7.
109. Barrero MJ, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Epigenetic mechanisms that regulate cell identity. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):565-70.
110. Buljubasic R, Buljubasic M, Bojanac AK, Ulamec M, Vlahovic M, Jezek D, et al. Epigenetics and testicular germ cell tumors. *Gene*. 2018;661:22-33.
111. Serman A, Vlahovic M, Serman L, Bulic-Jakus F. DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. *Coll Antropol*. 2006;30(3):665-71.
112. Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res*. 2012;18(10):2768-79.
113. Siprashvili Z, Webster DE, Kretz M, Johnston D, Rinn JL, Chang HY, et al. Identification of proteins binding coding and non-coding human RNAs using protein microarrays. *BMC Genomics*. 2012;13(633):1471-2164.
114. Willbanks A, Leary M, Greenshields M, Tyminski C, Heerboth S, Lapinska K, et al. The Evolution of Epigenetics: From Prokaryotes to Humans and Its Biological Consequences. *Genet Epigenet*. 2016;8:25-36.
115. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33:245-54.
116. Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol*. 2007;1(1):26-41.
117. Herceg Z. Epigenetic Mechanisms as an Interface Between the Environment and Genome. *Adv Exp Med Biol*. 2016;903:3-15.
118. Blomen VA, Boonstra J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(1):27-44.
119. Anderson JD, Lowary PT, Widom J. Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol*. 2001;307(4):977-85.
120. Turner BM. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1534):3403-18.

121. Herceg Z, Ghantous A, Wild CP, Sklias A, Casati L, Duthie SJ, et al. Roadmap for investigating epigenome deregulation and environmental origins of cancer. *Int J Cancer*. 2018;142(5):874-82.
122. Ehrlich M. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem*. 2003;88(5):899-910.
123. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(8):2709-21.
124. Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained: *Nat Rev Genet*; 2009.
125. Lister R, Ecker JR. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res*. 2009;19(6):959-66.
126. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:481-514.
127. Sincic N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Curr Opin Oncol*. 2011;23(1):69-76.
128. Maatouk DM, Kellam LD, Mann MR, Lei H, Li E, Bartolomei MS, et al. DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development*. 2006;133(17):3411-8.
129. Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schubeler D, Sasaki H, et al. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat Genet*. 2010;42(12):1093-100.
130. Ferguson-Smith AC, Bourc'his D. The discovery and importance of genomic imprinting. *Elife*. 2018;22(7):42368.
131. Kaneda M, Sado T, Hata K, Okano M, Tsujimoto N, Li E, et al. Role of de novo DNA methyltransferases in initiation of genomic imprinting and X-chromosome inactivation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2004;69:125-9.
132. Davis CM, Constantinides PG, van der Riet F, van Schalkwyk L, Gevers W, Parker MI. Activation and demethylation of the intracisternal A particle genes by 5-azacytidine. *Cell Differ Dev*. 1989;27(2):83-93.
133. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation: *Nat Genet*.; 1998.

134. Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev.* 1995;9(19):2325-34.
135. Hansen RS, Canfield TK, Fjeld AD, Gartler SM. Role of late replication timing in the silencing of X-linked genes. *Hum Mol Genet.* 1996;5(9):1345-53.
136. Branco MR, King M, Perez-Garcia V, Bogutz AB, Caley M, Fineberg E, et al. Maternal DNA Methylation Regulates Early Trophoblast Development. *Dev Cell.* 2016;36(2):152-63.
137. Perez-Palacios R, Bourc'his D. A single-cell chromatin map of human embryos. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):742-4.
138. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Herault Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science.* 2016;354(6314):909-12.
139. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
140. Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran JV. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011;12:187-215.
141. Zhang W, Barger CJ, Link PA, Mhawech-Fauceglia P, Miller A, Akers SN, et al. DNA hypomethylation-mediated activation of Cancer/Testis Antigen 45 (CT45) genes is associated with disease progression and reduced survival in epithelial ovarian cancer. *Epigenetics.* 2015;10(8):736-48.
142. Cheishvili D, Stefanska B, Yi C, Li CC, Yu P, Arakelian A, et al. A common promoter hypomethylation signature in invasive breast, liver and prostate cancer cell lines reveals novel targets involved in cancer invasiveness. *Oncotarget.* 2015;6(32):33253-68.
143. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(15):8681-6.
144. Yin AA, Lu N, Etcheverry A, Aubry M, Barnholtz-Sloan J, Zhang LH, et al. A novel prognostic six-CpG signature in glioblastomas. *CNS Neurosci Ther.* 2018;24(3):167-77.
145. Smith ZD, Meissner A. The simplest explanation: passive DNA demethylation in PGCs. *Embo J.* 2013;32(3):318-21.

146. Ziller MJ, Gu H, Muller F, Donaghey J, Tsai LT, Kohlbacher O, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*. 2013;500(7463):477-81.
147. Brinkman AB, Gu H, Bartels SJ, Zhang Y, Matarese F, Simmer F, et al. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res*. 2012;22(6):1128-38.
148. Krebs AR, Dessus-Babus S, Burger L, Schubeler D. High-throughput engineering of a mammalian genome reveals building principles of methylation states at CG rich regions. *Elife*. 2014;26(3):04094.
149. Kribelbauer JF, Laptenko O, Chen S, Martini GD, Freed-Pastor WA, Prives C, et al. Quantitative Analysis of the DNA Methylation Sensitivity of Transcription Factor Complexes. *Cell Rep*. 2017;19(11):2383-95.
150. Hu S, Wan J, Su Y, Song Q, Zeng Y, Nguyen HN, et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife*. 2013;3(2):00726.
151. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun*. 2013;4(2126).
152. Maurano MT, Haugen E, Sandstrom R, Vierstra J, Shafer A, Kaul R, et al. Large-scale identification of sequence variants influencing human transcription factor occupancy in vivo. *Nat Genet*. 2015;47(12):1393-401.
153. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1998;18(11):6538-47.
154. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*. 1999;23(1):58-61.
155. Kokura K, Kaul SC, Wadhwa R, Nomura T, Khan MM, Shinagawa T, et al. The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem*. 2001;276(36):34115-21.
156. Lyst MJ, Ekiert R, Ebert DH, Merusi C, Nowak J, Selfridge J, et al. Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor. *Nat Neurosci*. 2013;16(7):898-902.
157. Brunmeir R, Lager S, Simboeck E, Sawicka A, Egger G, Hagelkruys A, et al. Epigenetic regulation of a murine retrotransposon by a dual histone modification mark. *PLoS Genet*. 2010;6(4):1000927.



158. Reichmann J, Crichton JH, Madej MJ, Taggart M, Gautier P, Garcia-Perez JL, et al. Microarray analysis of LTR retrotransposon silencing identifies Hdac1 as a regulator of retrotransposon expression in mouse embryonic stem cells. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(4):26.
159. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet.* 1999;21(1):103-7.
160. Cusack M, Scotting P. DNA methylation in germ cell tumour aetiology: current understanding and outstanding questions. *Reproduction.* 2013;146(2):12-0382.
161. Gu S, Tian Y, Chlenski A, Salwen HR, Lu Z, Raj JU, et al. Valproic acid shows a potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. *Anticancer Drugs.* 2012;23(10):1054-66.
162. Kalac M, Scotto L, Marchi E, Amengual J, Seshan VE, Bhagat G, et al. HDAC inhibitors and decitabine are highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLBCL. *Blood.* 2011;118(20):5506-16.
163. Backlund L, Wei YB, Martinsson L, Melas PA, Liu JJ, Mu N, et al. Mood Stabilizers and the Influence on Global Leukocyte DNA Methylation in Bipolar Disorder. *Mol Neuropsychiatry.* 2015;1(2):76-81.
164. Guidotti A, Auta J, Chen Y, Davis JM, Dong E, Gavin DP, et al. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology.* 2011;60(7-8):1007-16.
165. Ni G, Qin J, Li H, Chen Z, Zhou Y, Fang Z, et al. Effects of antiepileptic drug monotherapy on one-carbon metabolism and DNA methylation in patients with epilepsy. *PLoS One.* 2015;10(4).
166. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389(6648):251-60.
167. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293(5532):1074-80.
168. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000;403(6765):41-5.

169. Schneider TD, Arteaga-Salas JM, Mentele E, David R, Nicetto D, Imhof A, et al. Stage-specific histone modification profiles reveal global transitions in the *Xenopus* embryonic epigenome. *PLoS One*. 2011;6(7):22.
170. Kunert N, Brehm A. Novel Mi-2 related ATP-dependent chromatin remodelers. *Epigenetics*. 2009;4(4):209-11.
171. Josling GA, Selvarajah SA, Petter M, Duffy MF. The role of bromodomain proteins in regulating gene expression. *Genes*. 2012;3(2):320-43.
172. Talbert PB, Henikoff S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):264-75.
173. Kouzarides T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell*. 2007;131(4):005.
174. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1964;51:786-94.
175. Ord MG, Stocken LA. Metabolic properties of histones from rat liver and thymus gland. *Biochem J*. 1966;98(3):888-97.
176. Goldknopf IL, Busch H. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(3):864-8.
177. Fingerman IM, Du HN, Briggs SD. Controlling histone methylation via trans-histone pathways. *Epigenetics*. 2008;3(5):237-42.
178. Clayton AL, Hazzalin CA, Mahadevan LC. Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol Cell*. 2006;23(3):289-96.
179. Farrona S, Coupland G, Turck F. The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(6):560-73.
180. Henikoff S, Grosveld F. Welcome to epigenetics & chromatin. *Epigenetics Chromatin*. 2008;1(1):1756-8935.
181. Jin C, Felsenfeld G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev*. 2007;21(12):1519-29.
182. Xu Y, Wu X, Her C. hMSH5 Facilitates the Repair of Camptothecin-induced Double-strand Breaks through an Interaction with FANCI. *J Biol Chem*. 2015;290(30):18545-58.
183. Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, et al. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. 2005;120(2):169-81.

184. Schubeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, et al. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* 2004;18(11):1263-71.
185. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 2001;410(6824):116-20.
186. Wang X, Hayes JJ. Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure. *Mol Cell Biol.* 2008;28(1):227-36.
187. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature.* 1999;399(6735):491-6.
188. Pillonel V, Reichert N, Cao C, Heideman MR, Yamaguchi T, Matthias G, et al. Histone deacetylase 1 plays a predominant pro-oncogenic role in Emu-myc driven B cell lymphoma. *Sci Rep.* 2016;6(37772).
189. Jazi MS, Mohammadi S, Yazdani Y, Sedighi S, Memarian A, Aghaei M. Effects of valproic acid and pioglitazone on cell cycle progression and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia Jurkat cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(7):779-86.
190. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer 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.
191. Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett.* 2009;280(2):168-76.
192. Zhao X, Yang W, Pei F, Ma W, Wang Y. Downregulation of matrix metalloproteinases contributes to the inhibition of cell migration and invasion in HepG2 cells by sodium valproate. *Oncol Lett.* 2015;10(1):531-5.
193. Atmaca A, Al-Batran SE, Maurer A, Neumann A, Heinzl T, Hentsch B, et al. Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. *Br J Cancer.* 2007;97(2):177-82.
194. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol.* 2010;220(2):126-39.
195. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642-55.
196. Collins LJ. The RNA infrastructure: an introduction to ncRNA networks. *Adv Exp Med Biol.* 2011;722:1-19.

197. Kala R, Peek GW, Hardy TM, Tollefsbol TO. MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics. *J Clin Bioinforma.* 2013;3(1):2043-9113.
198. Atkinson SP, Keith WN. Epigenetic control of cellular senescence in disease: opportunities for therapeutic intervention. *Expert Rev Mol Med.* 2007;9(7):1-26.
199. Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med.* 2012;85(2):187-200.
200. Cohen MB, Glazer RI. Cytotoxicity and the inhibition of ribosomal RNA processing in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 1985;27(2):308-13.
201. Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N, et al. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(6):1718-27.
202. Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res.* 2004;64(3):1079-86.
203. Kosugi H, Towatari M, Hatano S, Kitamura K, Kiyoi H, Kinoshita T, et al. Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy. *Leukemia.* 1999;13(9):1316-24.
204. Weichert W, Denkert C, Noske A, Darb-Esfahani S, Dietel M, Kalloger SE, et al. Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas. *Neoplasia.* 2008;10(9):1021-7.
205. Yang J, Farren MR, Ahn D, Bekaii-Saab T, Lesinski GB. Signaling pathways as therapeutic targets in biliary tract cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21(5):485-98.
206. Yang WM, Yao YL, Sun JM, Davie JR, Seto E. Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem.* 1997;272(44):28001-7.
207. Menegola E, Broccia ML, Nau H, Prati M, Ricolfi R, Giavini E. Teratogenic effects of sodium valproate in mice and rats at midgestation and at term. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1996;16(2):97-108.
208. Menegola E, Broccia ML, Prati M, Giavini E. Stage-dependent skeletal malformations induced by valproic acid in rat. *Int J Dev Biol.* 1998;42(1):99-102.

209. Menegola E, Di Renzo F, Broccia ML, Prudenziati M, Minucci S, Massa V, et al. Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2005;74(5):392-8.
210. Kristen AV, Ajroud-Driss S, Conceição I, Gorevic P, Kyriakides T, Obici L. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegenerative Disease Management.* 2019;9(1):5-23.
211. Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, Groth C-G, Ericzon B-G, Eriksson S, et al. Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clinical Genetics.* 1991;40(3):242-6.
212. Dong XJ, Zhang GR, Zhou QJ, Pan RL, Chen Y, Xiang LX, et al. Direct hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells induced by valproic acid and cytokines. *World J Gastroenterol.* 2009;15(41):5165-75.
213. Tomson T, Battino D, Perucca E. The remarkable story of valproic acid. *Lancet Neurol.* 2016;15(2):00398-1.
214. Johannessen CU. Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochem Int.* 2000;37(2-3):103-10.
215. EMA. Valproate European review 2018. 2018 [cited 2019. 30.12.2019.]; Available from:  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Valproate\\_and\\_related\\_substances/human\\_referral\\_prac\\_000066.jsp&mid=WC0b01ac05805c516f](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Valproate_and_related_substances/human_referral_prac_000066.jsp&mid=WC0b01ac05805c516f).
216. Đikić D, Jutrić D, Dominko K. Dual Nature of the Antiepileptic Drug Valproic Acid, With Possible Beneficial Effects in Alzheimer's Disease. *SEEMEDJ.* 2017 2017-05-09;1(1).
217. Langley B, D'Annibale MA, Suh K, Ayoub I, Tolhurst A, Bastan B, et al. Pulse inhibition of histone deacetylases induces complete resistance to oxidative death in cortical neurons without toxicity and reveals a role for cytoplasmic p21(waf1/cip1) in cell cycle-independent neuroprotection. *J Neurosci.* 2008;28(1):163-76.
218. Coppola G. Update on rufinamide in childhood epilepsy. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2011;7:399-407.
219. Calleja S, Salas-Puig J, Ribacoba R, Lahoz CH. Evolution of juvenile myoclonic epilepsy treated from the outset with sodium valproate. *Seizure.* 2001;10(6):424-7.

220. Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*. 2005;19(10):1751-9.
221. 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):16659-64.
222. Saha RN, Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ*. 2006;13(4):539-50.
223. Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, et al. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *Embo J*. 2003;22(13):3411-20.
224. Kawano T, Akiyama M, Agawa-Ohta M, Mikami-Terao Y, Iwase S, Yanagisawa T, et al. Histone deacetylase inhibitors valproic acid and depsipeptide sensitize retinoblastoma cells to radiotherapy by increasing H2AX phosphorylation and p53 acetylation-phosphorylation. *Int J Oncol*. 2010;37(4):787-95.
225. Mohammed TA, Holen KD, Jaskula-Sztul R, Mulkerin D, Lubner SJ, Schelman WR, et al. A pilot phase II study of valproic acid for treatment of low-grade neuroendocrine carcinoma. *Oncologist*. 2011;16(6):835-43.
226. Naryzhny SN, Lee H. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Lett*. 2010;584(20):4292-8.
227. Bacon CL, Gallagher HC, Haughey JC, Regan CM. Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase. *J Neurochem*. 2002;83(1):12-9.
228. Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, Cinatl J, Jr. Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem*. 2002;9(15):1417-33.
229. Rocchi P, Tonelli R, Camerin C, Purgato S, Fronza R, Bianucci F, et al. p21Waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. *Oncol Rep*. 2005;13(6):1139-44.
230. Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, et al. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination

with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2006;106(1):112-9.

231. Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Chen G. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem*. 2001;276(34):31674-83.

232. Wang B, Yang R, Wu Y, Li H, Hu Z, Chen Y, et al. Sodium valproate inhibits the growth of human cholangiocarcinoma in vitro and in vivo. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;374593(10):13.

233. Chodurek E, Kulczycka A, Orchel A, Aleksander-Konert E, Dzierzewicz Z. Effect of valproic acid on the proliferation and apoptosis of the human melanoma G-361 cell line. *Acta Pol Pharm*. 2014;71(6):917-21.

234. Booth L, Roberts JL, Poklepovic A, Kirkwood J, Dent P. HDAC inhibitors enhance the immunotherapy response of melanoma cells. *Oncotarget*. 2017;8(47):83155-70.

235. Cornago M, Garcia-Alberich C, Blasco-Angulo N, Vall-Llaura N, Nager M, Herreros J, et al. Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1435.

236. Hoja S, Schulze M, Rehli M, Proescholdt M, Herold-Mende C, Hau P, et al. Molecular dissection of the valproic acid effects on glioma cells. *Oncotarget*. 2016;7(39):62989-3002.

237. Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(12):1912-22.

238. Kostrouchova M, Kostrouchova V, Yilma P, Benda A, Mandys V. Valproic Acid Decreases the Nuclear Localization of MDT-28, the Nematode Orthologue of MED28. *Folia Biol*. 2018;64(1):1-9.

239. Kostrouchova M, Kostrouch Z. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biol*. 2007;53(2):37-49.

240. Gurvich N, Klein PS. Lithium and valproic acid: parallels and contrasts in diverse signaling contexts. *Pharmacol Ther*. 2002;96(1):45-66.

241. Rosenberg G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(16):2090-103.

242. Gould TD, Chen G, Manji HK. In vivo evidence in the brain for lithium inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(1):32-8.
243. Bug G, Gül H, Schwarz K, Pfeifer H, Kampfmann M, Zheng X, et al. Valproic Acid Stimulates Proliferation and Self-renewal of Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Research*. 2005;65(7):2537-41.
244. 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.
245. Shen S, Li J, Casaccia-Bonnel P. Histone modifications affect timing of oligodendrocyte progenitor differentiation in the developing rat brain. *J Cell Biol*. 2005;169(4):577-89.
246. Cho JH, Kim SH, Park KD, Jung MC, Yang WI, Han SW, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer. *Biomaterials*. 2004;25(26):5743-51.
247. Cavanagh JF, Mione MC, Pappas IS, Parnavelas JG. Basic fibroblast growth factor prolongs the proliferation of rat cortical progenitor cells in vitro without altering their cell cycle parameters. *Cereb Cortex*. 1997;7(4):293-302.
248. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287(5457):1433-8.
249. Park KS, Jeon SH, Kim SE, Bahk YY, Holmen SL, Williams BO, et al. APC inhibits ERK pathway activation and cellular proliferation induced by RAS. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 5):819-27.
250. Jeon SH, Yoon JY, Park YN, Jeong WJ, Kim S, Jho EH, et al. Axin inhibits extracellular signal-regulated kinase pathway by Ras degradation via beta-catenin. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14482-92.
251. Biermann J, Grieshaber P, Goebel U, Martin G, Thanos S, Di Giovanni S, et al. Valproic acid-mediated neuroprotection and regeneration in injured retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(1):526-34.
252. Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol*. 2010;10(479364):29.
253. Suda S, Katsura K, 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.



254. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol.* 2009;28(1):1-10.
255. Colleoni S, Galli C, Gaspar JA, Meganathan K, Jagtap S, Hescheler J, et al. A comparative transcriptomic study on the effects of valproic acid on two different hESCs lines in a neural teratogenicity test system. *Toxicol Lett.* 2014;231(1):38-44.
256. DiLiberti JH, Farndon PA, Dennis NR, Curry CJ. The fetal valproate syndrome. *Am J Med Genet.* 1984;19(3):473-81.
257. Mutlu-Albayrak H, Bulut C, Caksen H. Fetal Valproate Syndrome. *Pediatr Neonatol.* 2017;58(2):158-64.
258. Kikuchi N, Ohira S, Asaka R, Tanaka K, Takatsu A, Shiozawa T. Prenatal sonographic diagnosis of fetal valproate syndrome: a case report. *J Med Case Rep.* 2016;10(1):312.
259. Zaki SA, Phulsundar A, Shanbag P, Mauskar A. Fetal valproate syndrome in a 2-month-old male infant. *Ann Saudi Med.* 2010;30(3):233-5.
260. Jentink J, Loane MA, Dolk H, Barisic I, Garne E, Morris JK, et al. Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *N Engl J Med.* 2010;362(23):2185-93.
261. Robert E, Guibaud P. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects: *Lancet* 1982.
262. Omtzigt JG, Los FJ, Grobbee DE, Pijpers L, Jahoda MG, Brandenburg H, et al. The risk of spina bifida aperta after first-trimester exposure to valproate in a prenatal cohort. *Neurology.* 1992;42(4 Suppl 5):119-25.
263. Wiedemann K, Stuber T, Rehn M, Frieauff E. Fetal Valproate Syndrome - Still a Problem Today! *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2017;221(5):243-6.
264. Nau H, Hauck RS, Ehlers K. Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacol Toxicol.* 1991;69(5):310-21.
265. Downing C, Biers J, Larson C, Kimball A, Wright H, Ishii T, et al. Genetic and maternal effects on valproic acid teratogenesis in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol Sci.* 2010;116(2):632-9.
266. Wu G, Nan C, Rollo JC, Huang X, Tian J. Sodium valproate-induced congenital cardiac abnormalities in mice are associated with the inhibition of histone deacetylase. *J Biomed Sci.* 2010;17(16):1423-0127.

267. Gurvich N, Berman MG, Wittner BS, Gentleman RC, Klein PS, Green JB. Association of valproate-induced teratogenesis with histone deacetylase inhibition in vivo. *Faseb J.* 2005;19(9):1166-8.
268. Fujiki R, Sato A, Fujitani M, Yamashita T. A proapoptotic effect of valproic acid on progenitors of embryonic stem cell-derived glutamatergic neurons. *Cell Death Dis.* 2013;20(4):205.
269. Tung EW, Winn LM. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol.* 2011;80(6):979-87.
270. Chaudhary S, Parvez S. An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. *Neuroscience.* 2012;225:258-68.
271. Stodgell CJ, Ingram JL, O'Bara M, Tisdale BK, Nau H, Rodier PM. Induction of the homeotic gene *Hoxa1* through valproic acid's teratogenic mechanism of action. *Neurotoxicol Teratol.* 2006;28(5):617-24.
272. Zhao H, Wang Q, Yan T, Zhang Y, Xu HJ, Yu HP, et al. Maternal valproic acid exposure leads to neurogenesis defects and autism-like behaviors in non-human primates. *Transl Psychiatry.* 2019;9(1):019-0608.
273. Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci.* 2005;23(2-3):189-99.
274. Bossu JL, Roux S. [The valproate model of autism]. *Med Sci.* 2019;35(3):236-43.
275. Renoir T, Pang TY, Hannan AJ. Effects of environmental manipulations in genetically targeted animal models of affective disorders. *Neurobiol Dis.* 2013;57:12-27.
276. Margulis AV, Hernandez-Diaz S, McElrath T, Rothman KJ, Plana E, Almqvist C, et al. Relation of in-utero exposure to antiepileptic drugs to pregnancy duration and size at birth. *PLoS One.* 2019;14(8).
277. Ploeger A, Raijmakers ME, van der Maas HL, Galis F. The association between autism and errors in early embryogenesis: what is the causal mechanism? *Biol Psychiatry.* 2010;67(7):602-7.
278. Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ. Validating gamma oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry.* 2010;68(12):1100-6.

279. Jacob J, Ribes V, Moore S, Constable SC, Sasai N, Gerety SS, et al. Valproic acid silencing of *ascl1b/Ascl1* results in the failure of serotonergic differentiation in a zebrafish model of fetal valproate syndrome. *Dis Model Mech*. 2014;7(1):107-17.
280. Balasubramanian D, Pearson JF, Kennedy MA. Gene expression effects of lithium and valproic acid in a serotonergic cell line. *Physiol Genomics*. 2019;51(2):43-50.
281. Valanciute A, Mozuraite R, Balnyte I, Didziapetriene J, Matusevicius P, Stakisaitis D. Sodium valproate effect on the structure of rat glandule thymus: Gender-related differences. *Exp Toxicol Pathol*. 2015;67(7-8):399-406.
282. Tung EW, Winn LM. Valproic acid-induced DNA damage increases embryonic p27(KIP1) and caspase-3 expression: a mechanism for valproic-acid induced neural tube defects. *Reprod Toxicol*. 2011;32(3):255-60.
283. Komariah K, Manalu W, Kiranadi B, Winarto A, Handharyani E, Roeslan MO. Valproic Acid Exposure of Pregnant Rats During Organogenesis Disturbs Pancreas Development in Insulin Synthesis and Secretion of the Offspring. *Toxicol Res*. 2018;34(2):173-82.
284. Mowery TM, Wilson SM, Kostylev PV, Dina B, Buchholz JB, Prieto AL, et al. Embryological exposure to valproic acid disrupts morphology of the deep cerebellar nuclei in a sexually dimorphic way. *Int J Dev Neurosci*. 2015;40:15-23.
285. Semmler A, Frisch C, Bleul C, Smith D, Bigler L, Prost JC, et al. Intrauterine valproate exposure is associated with alterations in hippocampal cell numbers and folate metabolism in a rat model of valproate teratogenicity. *Seizure*. 2017;46:7-12.
286. Tiboni GM, Ponzano A. Nitric oxide and teratogenesis: an update. *Curr Pharm Des*. 2014;20(34):5443-7.
287. FDA. FDA Drug Safety Communication: Children born to mothers who took Valproate products while pregnant may have impaired cognitive development. 2011. [cited 2019. 20.12.]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-children-born-mothers-who-took-valproate-products-while-pregnant-may>.
288. Clayton-Smith J, Bromley R, Dean J, Journal H, Odent S, Wood A, et al. Diagnosis and management of individuals with Fetal Valproate Spectrum Disorder; a consensus statement from the European Reference Network for Congenital Malformations and Intellectual Disability. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):019-1064.

289. Vorhees CV. Teratogenicity and developmental toxicity of valproic acid in rats. *Teratology*. 1987;35(2):195-202.
290. Pennell PB. Use of Antiepileptic Drugs During Pregnancy: Evolving Concepts. *Neurotherapeutics*. 2016;13(4):811-20.
291. Riva G, Cilibrasi C, Bazzoni R, Cadamuro M, Negroni C, Butta V, et al. Valproic Acid Inhibits Proliferation and Reduces Invasiveness in Glioma Stem Cells Through Wnt/beta Catenin Signalling Activation. *Genes*. 2018;9(11).
292. Theunissen PT, Robinson JF, Pennings JL, de Jong E, Claessen SM, Kleinjans JC, et al. Transcriptomic concentration-response evaluation of valproic acid, cyproconazole, and hexaconazole in the neural embryonic stem cell test (ESTn). *Toxicol Sci*. 2012;125(2):430-8.
293. Lagger S, Meunier D, Mikula M, Brunmeir R, Schleder M, Artaker M, et al. Crucial function of histone deacetylase 1 for differentiation of teratomas in mice and humans. *Embo J*. 2010;29(23):3992-4007.
294. Dovey OM, Foster CT, Cowley SM. Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(18):8242-7.
295. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol*. 1998;51(7):506-11.
296. Plazibat M, Katusic Bojanac A, Himerleich Peric M, Gamulin O, Rasic M, Radonic V, et al. Embryo-derived teratoma in vitro biological system reveals antitumor and embryotoxic activity of valproate. *Febs J*. 2020;13(10):15248.
297. Kemp C, Alberti VN, de Lima GR, de Carvalho FM. How should PCNA be assessed? Total of stained cells or only the most intensely stained ones? *Sao Paulo Med J*. 1998;116(2):1667-74.
298. Zorc M, Vraspir-Porenta O, Zorc-Pleskovic R, Radovanovic N, Petrovic D. Apoptosis of myocytes and proliferation markers as prognostic factors in end-stage dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol*. 2003;12(1):36-9.
299. Kališnik M. Temelji stereologije. *Acta Stereologica*. 1985.
300. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.

301. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
302. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int*. 2014;361590(10):16.
303. Vaissiere T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*. 2009;69(1):243-52.
304. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1827-31.
305. Kim HH, Park JH, Jeong KS, Lee S. Determining the global DNA methylation status of rat according to the identifier repetitive elements. *Electrophoresis*. 2007;28(21):3854-61.
306. Koprinarova M, Schnekenburger M, Diederich M. Role of Histone Acetylation in Cell Cycle Regulation. *Curr Top Med Chem*. 2016;16(7):732-44.
307. Šerman A. Učinak 5-azacitidina na rast ektoplacentalnog stošca i proliferacijsku sposobnost decidua stanica štakora [Doktorska disertacija]. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2009.
308. Belair DG, Wolf CJ, Moorefield SD, Wood C, Becker C, Abbott BD. A Three-Dimensional Organoid Culture Model to Assess the Influence of Chemicals on Morphogenetic Fusion. *Toxicological Sciences*. 2018;166(2):394-408.
309. Robinson JF, van Beelen VA, Verhoef A, Renkens MF, Luijten M, van Herwijnen MH, et al. Embryotoxicant-specific transcriptomic responses in rat postimplantation whole-embryo culture. *Toxicol Sci*. 2010;118(2):675-85.
310. Flint OP. In vitro tests for teratogens: desirable endpoints, test batteries and current status of the micromass teratogen test. *Reprod Toxicol*. 1993;1:103-11.
311. Schumann J. Teratogen screening: state of the art. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2010;2(3):115-21.
312. Robinson JF, Verhoef A, Pennings JLA, Pronk TE, Piersma AH. A Comparison of Gene Expression Responses in Rat Whole Embryo Culture and In Vivo: Time-Dependent Retinoic Acid-Induced Teratogenic Response. *Toxicological Sciences*. 2012;126(1):242-54.

313. Groh T, Hrabeta J, Khalil MA, Doktorova H, Eckschlager T, Stiborova M. The synergistic effects of DNA-damaging drugs cisplatin and etoposide with a histone deacetylase inhibitor valproate in high-risk neuroblastoma cells. *Int J Oncol.* 2015;47(1):343-52.
314. Shah RD, Jagtap JC, Mruthyunjaya S, Shelke GV, Pujari R, Das G, et al. Sodium valproate potentiates staurosporine-induced apoptosis in neuroblastoma cells via Akt/survivin independently of HDAC inhibition. *J Cell Biochem.* 2013;114(4):854-63.
315. Kang JD, Li S, Lu Y, Wang W, Liang S, Liu X, et al. Valproic acid improved in vitro development of pig cloning embryos but did not improve survival of cloned pigs to adulthood. *Theriogenology.* 2013;79(2):306-11.
316. Biernacki B, Wlodarczyk B, Minta M. Effect of sodium valproate on rat embryo development in vitro. *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy.* 2000;44:201-6.
317. Kelly PG, Regan CM. Studies on valproate-induced perturbations of neurulation in the explanted chick embryo. *Toxicology.* 1992;71(1-2):137-44.
318. Kao J, Brown NA, Schmid B, Goulding EH, Fabro S. Teratogenicity of valproic acid: In vivo and in vitro investigations. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis.* 1981;1(4):367-82.
319. Werling U, Siehler S, Litfin M, Nau H, Gottlicher M. Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta by valproic acid and its teratogenic derivatives. *Mol Pharmacol.* 2001;59(5):1269-76.
320. Najafipour H, Bagheri-Hosseini Z, Eslaminejad T, Mollaei HR. The effect of sodium valproate on differentiation of human adipose-derived stem cells into cardiomyocyte-like cells in two-dimensional culture and fibrin scaffold conditions. *Cell Tissue Res.* 2019;378(1):127-41.
321. Kwiecinska P, Tauboll E, Gregoraszczyk EL. Effects of valproic acid and levetiracetam on viability and cell cycle regulatory genes expression in the OVCAR-3 cell line. *Pharmacol Rep.* 2012;64(1):157-65.
322. Yamanegi K, Kawabe M, Futani H, Nishiura H, Yamada N, Kato-Kogoe N, et al. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, modulates the vascular endothelial growth inhibitor-mediated cell death in human osteosarcoma and vascular endothelial cells. *Int J Oncol.* 2015;46(5):1994-2002.
323. Chew LJ, Pan H, Yu J, Tian S, Huang WQ, Zhang JY, et al. A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor. *Faseb J.* 2002;16(7):742-4.

324. Hou W, Medynski D, Wu S, Lin X, Li LY. VEGI-192, a new isoform of TNFSF15, specifically eliminates tumor vascular endothelial cells and suppresses tumor growth. *Clin Cancer Res.* 2005;11(15):5595-602.
325. Ma XJ, Wang YS, Gu WP, Zhao X. The role and possible molecular mechanism of valproic acid in the growth of MCF-7 breast cancer cells. *Croat Med J.* 2017;58(5):349-57.
326. Paradis FH, Hales BF. Valproic Acid Induces the Hyperacetylation of P53, Expression of P53 Target Genes, and Markers of the Intrinsic Apoptotic Pathway in Midorganogenesis Murine Limbs. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2015;104(5):177-83.
327. An HM, Xue YF, Shen YL, Du Q, Hu B. Sodium valproate induces cell senescence in human hepatocarcinoma cells. *Molecules.* 2013;18(12):14935-47.
328. Lamparter C, Winn LM. Tissue-specific effects of valproic acid on DNA repair genes and apoptosis in postimplantation mouse embryos. *Toxicol Sci.* 2014;141(1):59-67.
329. De Siervi A, De Luca P, Byun JS, Di LJ, Fufa T, Haggerty CM, et al. Transcriptional autoregulation by BRCA1. *Cancer Res.* 2010;70(2):532-42.
330. Volcic M, Karl S, Baumann B, Salles D, Daniel P, Fulda S, et al. NF-kappaB regulates DNA double-strand break repair in conjunction with BRCA1-CtIP complexes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(1):181-95.
331. Dencker L, Nau H, D'Argy R. Marked accumulation of valproic acid in embryonic neuroepithelium of the mouse during early organogenesis. *Teratology.* 1990;41(6):699-706.
332. Jergil M, Kultima K, Gustafson AL, Dencker L, Stigson M. Valproic acid-induced deregulation in vitro of genes associated in vivo with neural tube defects. *Toxicol Sci.* 2009;108(1):132-48.
333. Chen J, Lacroix N, Li Q. Histone deacetylase inhibitor valproic acid as a small molecule inducer to direct the differentiation of pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol.* 2013;977:359-63.
334. Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, et al. Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One.* 2014;9(8).
335. Duan Q, Li S, Wen X, Sunnassee G, Chen J, Tan S, et al. Valproic Acid Enhances Reprogramming Efficiency and Neuronal Differentiation on Small Molecules

Staged-Induction Neural Stem Cells: Suggested Role of mTOR Signaling. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13(867).

336. Moon BS, Lu W, Park HJ. Valproic acid promotes the neuronal differentiation of spiral ganglion neural stem cells with robust axonal growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(4):2728-35.

337. Jung M, Bakin R. HDAC2 Cytoplasmic Sequestration Potentiates Keratinocyte Terminal Differentiation. *The Open Cell Development & Biology Journal*. 2008;1:1-9.

338. Consalvi S, Mozzetta C, Bettica P, Germani M, Fiorentini F, Del Bene F, et al. Preclinical studies in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy with the histone deacetylase inhibitor givinostat. *Mol Med*. 2013;19:79-87.

339. Minetti GC, Colussi C, Adami R, Serra C, Mozzetta C, Parente V, et al. Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat Med*. 2006;12(10):1147-50.

340. Iezzi S, Di Padova M, Serra C, Caretti G, Simone C, Maklan E, et al. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev Cell*. 2004;6(5):673-84.

341. Li Q, Foote M, Chen J. Effects of histone deacetylase inhibitor valproic acid on skeletal myocyte development. *Sci Rep*. 2014;4(7207).

342. Forcales SV, Albini S, Giordani L, Malecova B, Cignolo L, Chernov A, et al. Signal-dependent incorporation of MyoD-BAF60c into Brg1-based SWI/SNF chromatin-remodelling complex. *Embo J*. 2012;31(2):301-16.

343. Saccone V, Consalvi S, Giordani L, Mozzetta C, Barozzi I, Sandona M, et al. HDAC-regulated myomiRs control BAF60 variant exchange and direct the functional phenotype of fibro-adipogenic progenitors in dystrophic muscles. *Genes Dev*. 2014;28(8):841-57.

344. Breuls N, Giacomazzi G, Sampaolesi M. (Epi)genetic Modifications in Myogenic Stem Cells: From Novel Insights to Therapeutic Perspectives. *Cells*. 2019;8(5).

345. Albini S, Coutinho P, Malecova B, Giordani L, Savchenko A, Forcales SV, et al. Epigenetic reprogramming of human embryonic stem cells into skeletal muscle cells and generation of contractile myospheres. *Cell Rep*. 2013;3(3):661-70.

346. Bansal V, De D, An J, Kang TM, Jeong HJ, Kang JS, et al. Chemical induced conversion of mouse fibroblasts and human adipose-derived stem cells into skeletal muscle-like cells. *Biomaterials*. 2019;193:30-46.



347. Johnston LA, Tapscott SJ, Eisen H. Sodium butyrate inhibits myogenesis by interfering with the transcriptional activation function of MyoD and myogenin. *Mol Cell Biol.* 1992;12(11):5123-30.
348. Jeong SG, Ohn T, Kim SH, Cho GW. Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of neuroprogenitors in human bone-marrow mesenchymal stromal cells. *Neurosci Lett.* 2013;554:22-7.
349. Cui X, Hong S, Huang D, Hu Y, Wu P, Jiang L. Effects of valproic acid on the differentiation of endogenous neural stem cells of the hippocampus in rats. 2017;10:4732-9.
350. Qian Y, Zheng Y, Tiffany-Castiglioni E. Valproate reversibly reduces neurite outgrowth by human SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2009;11:21-33.
351. Jergil M, Forsberg M, Salter H, Stockling K, Gustafson AL, Dencker L, et al. Short-time gene expression response to valproic acid and valproic acid analogs in mouse embryonic stem cells. *Toxicol Sci.* 2011;121(2):328-42.
352. Brodie SA, Li G, El-Kommos A, Kang H, Ramalingam SS, Behera M, et al. Class I HDACs are mediators of smoke carcinogen-induced stabilization of DNMT1 and serve as promising targets for chemoprevention of lung cancer. *Cancer Prev Res.* 2014;7(3):351-61.
353. Detich N, Bovenzi V, Szyf M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem.* 2003;278(30):27586-92.
354. Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis.* 2007;28(3):560-71.
355. Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res.* 2005;65(9):3815-22.
356. Zhang X, He X, Li Q, Kong X, Ou Z, Zhang L, et al. PI3K/AKT/mTOR Signaling Mediates Valproic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells through Epigenetic Modifications. *Stem Cell Reports.* 2017;8(5):1256-69.
357. Veronezi GM, Felisbino MB, Gatti MS, Mello ML, Vidal BC. DNA Methylation Changes in Valproic Acid-Treated HeLa Cells as Assessed by Image Analysis, Immunofluorescence and Vibrational Microspectroscopy. *PLoS One.* 2017;12(1).
358. Rocha MA, Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Tamashiro W, Mello MLS. Sodium valproate and 5-aza-2'-deoxycytidine differentially modulate DNA

demethylation in G1 phase-arrested and proliferative HeLa cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):019-54848.

359. Boudadi E, Stower H, Halsall JA, Rutledge CE, Leeb M, Wutz A, et al. The histone deacetylase inhibitor sodium valproate causes limited transcriptional change in mouse embryonic stem cells but selectively overrides Polycomb-mediated Hoxb silencing. *Epigenetics Chromatin.* 2013;6(1):1756-8935.

360. Perisic T, Zimmermann N, Kirmeier T, Asmus M, Tuorto F, Uhr M, et al. Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(3):792-805.

361. Tabolacci E, De Pascalis I, Accadia M, Terracciano A, Moscato U, Chiurazzi P, et al. Modest reactivation of the mutant FMR1 gene by valproic acid is accompanied by histone modifications but not DNA demethylation. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(8):738-41.

362. Rout UK. Valproate, thalidomide and ethyl alcohol alter the migration of HTR-8/SVneo cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4(44):1477-7827.

363. Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  and Retinoid X Receptor Signaling Regulate Fatty Acid Uptake by Primary Human Placental Trophoblasts. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005;90(7):4267-75.

364. Schaiff WT, Knapp FF, Jr., Barak Y, Biron-Shental T, Nelson DM, Sadovsky Y. Ligand-Activated Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  Alters Placental Morphology and Placental Fatty Acid Uptake in Mice. *Endocrinology.* 2007;148(8):3625-34.

365. Hale JS, Li M, Sinyuk M, Jahnen-Dechent W, Lathia JD, Silverstein RL. Context dependent role of the CD36--thrombospondin--histidine-rich glycoprotein axis in tumor angiogenesis and growth. *PLoS One.* 2012;7(7):10.

366. Osz K, Ross M, Petrik J. The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2014;12(1):21.

367. Seow KM, Tsai YL, Hwang JL, Hsu WY, Ho LT, Juan CC. Omental adipose tissue overexpression of fatty acid transporter CD36 and decreased expression of hormone-sensitive lipase in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2009;24(8):1982-8.

368. Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, et al. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology*. 2008;134(2):556-67.
369. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*. 2009;2(72).
370. Quenby S, Anin S, Bates M, Chadwick D, Vince G, Neilson J. Phenytoin but not valproate directly affected in vitro trophoblast differentiation. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2008;137:31-6.
371. Lloyd KA. A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*. 2013;6.
372. Gurgen SG, Erdogan D, Coskun ZK, Cansu A. The effect of valproic acid and oxcarbazepine on the distribution of adhesion molecules in embryo implantation. *Toxicology*. 2012;292(2-3):71-7.
373. Bettica P, Petrini S, D'Oria V, D'Amico A, Catteruccia M, Pane M, et al. Histological effects of givinostat in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(10):643-9.
374. Furlan A, Monzani V, Reznikov LL, Leoni F, Fossati G, Modena D, et al. Pharmacokinetics, safety and inducible cytokine responses during a phase 1 trial of the oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 (givinostat). *Mol Med*. 2011;17(5-6):353-62.
375. Zhang L, Fan Z, Han Y, Xu L, Liu W, Bai X, et al. Valproic Acid Promotes Survival of Facial Motor Neurons in Adult Rats After Facial Nerve Transection: a Pilot Study. *J Mol Neurosci*. 2018;64(4):512-22.
376. Zhu S, Zhang Z, Jia LQ, Zhan KX, Wang LJ, Song N, et al. Valproic acid attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via anti-pyroptosis pathways. *Neurochem Int*. 2019;124:141-51.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 3. listopada 1956. godine u Splitu. Nakon završene Klasične gimnazije upisujem MEF u Zagrebu. Na MEF-u Sveučilišta u Rijeci diplomirala sam 1978., a pripravnički staž obavila u KBC Split. Po završetku studija upisujem poslijediplomski studij iz kliničke patofiziologije – nefrološkog smjera kojeg završavam 1981. Nakon rada kao liječnik opće prakse odobrena mi je specijalizacija iz pedijatrije. Tijekom specijalizacije završavam poslijediplomski studij iz zaštite majki i djece, a magistarski rad sam obranila 1987. Specijalistički ispit sam položila 1987. u Zagrebu. Radila sam kao pedijatar u rodilištu u Zaboku, u bolnici u Bejrutu te od 2006. opet u rodilištu i odjelu pedijatrije Opće bolnice Zabok, a od 2018. sam subspecijalist neonatolog. Doktorski studij Biomedicine i zdravstva pri MEF-u u Zagrebu upisujem 2011. u sklopu kojeg sam pristupila izradi doktorskog rada „Utjecaj valproata na postimplantacijski zametak u *ex vivo* modelu razvoja štakora“ pod vodstvom mentora prof. dr. sc. Floriane Bulić-Jakuš i doc. dr. sc. Ane Katušić Bojanac.

Tijekom edukacije objavila sam članke u znanstvenim i stručnim publikacijama te sam sudjelovala u radu kongresa i tečajeva. Suradnik sam Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek.

Udata sam, majka troje djece. Govorim engleski, talijanski i arapski jezik.