

**Podstawowym celem proponowanych badań jest ocena zdolności wybranych inhibitorów deacetylaz histonów (ma lanu sodu i trichostatyny A) do stymulacji endogennej neurogenezy w modelu eksperymentalnym okołoporodowego uszkodzenia mózgu.** Okołoporodowe stany niedotlenieniowo-niedokrwienne, zwane potocznie asfiksją lub zamartwiczeniem, jeżeli nie prowadzą do zgonu noworodka, są przyczyną uszkodzenia mózgu. Trwałe zaburzenia strukturalno-funkcjonalne (takie jak mózgowie porażenia dziecięce, padaczka, zespoły pseudopuszki i pozapiramidowe a także niedowłady kurczowe) zwane encefalopatią poniedokrwinną stwierdza się u 25% dzieci przez wyjątkowe epizody hipoksyjno-ischemiczne. Pomimo znaczącego postępu w rozumieniu patomechanizmu rozwoju uszkodzenia, współczesna medycyna nadal nie jest w stanie poradzić sobie ze skutkami, jakie niesie za sobą niedotlenienie mózgu. Podejmowane próby neuroprotekcji, mające na celu zmniejszenie zaburzeń psychomotorycznych, nie przynoszą oczekiwanych efektów, powodując równocześnie szereg efektów ubocznych, które dodatkowo upośledzają funkcje komórek nerwowych (Gardoni i Di Luca 2006, Zalewska i wsp. 2015). W czasie intensywnych poszukiwań nowych związków neuroprotektoryjnych przedmiotem uwagi badaczy stały się inhibitory deacetylaz histonów (HDACi). W toku prowadzonych badań zaobserwowano, że związki te obok działania neuroprotektoryjnego mają zdolność stymulacji neurogenezy. Podane po eksperymentalnym udarze mózgu prowadzą do wzmożonej proliferacji progenitorów w strefach neurogennych (w warstwie komórek podziarnistych zakrzepu z białego oraz w okolicy komórki bocznej), migracji do uszkodzonych struktur i różnicowania do fenotypu neuronalnego. Notowane zmniejszenie ogniska uszkodzenia i osłabienie deficytów neurologicznych może sugerować regenerację uszkodzonej tkanki nerwowej przez bezpośrednią repopulację (Ren i wsp. 2004, Montgomery i wsp. 2009, Kramer 2009, Kim i wsp. 2009, 2010). Mechanizm działania neurogennej inhibitory deacetylaz histonów nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Wiadomo, że acetylacja/deacetylacja histonu jest kluczową posttranslacyjną modyfikacją białek. Wzrost poziomu acetylacji białek histonowych i czynników transkrypcyjnych może stymulować ekspresję wielu genów, których produkty białkowe biorą udział w neuroprotekcji, plastycie i neuronalnej regeneracji.

Analiza publikowanych w literaturze naukowej danych, odnoszących się do uszkodzenia mózgu dojrzałego osobnika, skłania do sprawdzenia efektów działania inhibitorów deacetylaz histonów w kontekście uszkodzenia mózgu we wczesnym okresie postnatalnym, szczególnie w odniesieniu do asfiksji okołoporodowej, która stanowi poważny problem zarówno społeczny jak i ekonomiczny. Ocena wpływu inhibitorów HDACi na neuroprotekcję/neurogenezę w tym modelu eksperymentalnym nie stała się dotychczas przedmiotem systematycznych badań. Dane opublikowane w kilku zaledwie pracach mają jedynie charakter fragmentaryczny (Kabakus i wsp. 2005). W dodatku badania te były prowadzone według różnych protokołów do wiadczenia i nie pozwalają na wyciągnięcie wniosków (Fleiss i wsp. 2012, George i wsp. 2013).

Przedmiotem planowanych przez nas badań będzie ocena wpływu wybranych inhibitorów deacetylaz histonów na neurogenezę endogenną w okolicy komórki bocznej (SVZ) po hipoksyjno-ischemicznym uszkodzeniu mózgu.

Badania będą prowadzone na ustalonym, szeroko stosowanym na świecie, modelu hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu indukowanego u siedmiodniowych szczurów (wg zaadoptowanego dla młodych zwierząt modelu Levine'a opisanego przez Rice'a i wsp. (1981)). Na podstawie porównania różnych parametrów opisujących i określających stopień rozwoju mózgu przyjmuje się, że siedmiodniowy szczur odpowiada stopniem rozwoju mózgu donoszonemu noworodkowi ludzkiemu. Hipoksja-ischemia powoduje jednostronne uszkodzenie mózgu (półkuli ipsilateralnej), przez zablokowanie dopływu krwi i tlenu i jest odzwierciedleniem encefalopatii rozwijającej się po asfiksji okołoporodowej. Półkula przeciwna (kontralateralna) będzie półkulą kontrolną.

Aby ocenić wpływ badanych związków na proces endogennej neurogenezy we wczesnym okresie postnatalnym, czynniki te zostaną przeprowadzone na zwierzętach naiwnych. Przedmiotem naszej uwagi będzie przede wszystkim efekt dwóch inhibitorów deacetylaz histonów, prezentujących odmienne struktury chemiczne: ma lanu sodu (SB) - pochodnej kwasu tłuszczowego i trichostatyny A (TSA) - pochodnej kwasu hydroksamowego. Realizacja pierwszego etapu zaplanowanych badań obejmie określenie wpływu badanych inhibitorów na stopień uszkodzenia mózgu (ocena morfologiczna) oraz na proces proliferacji komórek macierzystych/progenitorowych w strefie neurogennej komórki bocznej, migrację komórek do miejsca uszkodzenia oraz różnicowanie do fenotypu neuronalnego i glejowego.

Materiał do analizy będzie pobierany w 3, 6, 7, 9, 11, 14, 21, i 28 dniu po indukcji hipoksji-ischemii. Oznaczenia immunohistochemiczne będą wykonane na skrawkach mózgu a otrzymane obrazy analizowane w mikroskopie konfokalnym.

Zdolność komórek do proliferacji zostanie określona stopniem wbudowania BrdU do DNA podczas jego replikacji w fazie S cyklu komórkowego.

Zgodnie z publikowanymi danymi w migracji komórek zaangażowane są aktywne metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej z rodziny MMP. Oznaczymy, zatem ich aktywność i lokalizację. Identyfikacja fenotypu komórek będzie przeprowadzona metodą immunohistochemiczną na podstawie pozytywnych reakcji z przeciwciałami specyficznymi dla danego typu komórek neuronalnych i glejowych.

Kolejny etap badań będzie obejmował analizę potencjalnych kluczowych czynników zaangażowanych w fizjologiczną neurogenezę, aby wyjaśnić ich udział w mechanizmie regulującym oczekiwane procesy regeneracji po asfiksji okołoporodowej. Analizy zostaną objęte wybrane czynniki wzrostu – czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego (BDNF) i czynnik wzrostu neuronów (NGF) oraz ich receptory (TrkA, TrkB i p75), jak również czynnik transkrypcyjny fosfo-CREB. Określimy także ekspresję/aktywność kinazy MAPK/ERK1/2 oraz kinazy PI3K/Akt.

Realizacja proponowanego projektu będzie miała znaczenie poznawcze. Otrzymane wyniki wyjaśnią, czy badane inhibitory deacetylaz histonów stymulują neurogenezę po eksperymentalnym uszkodzeniu mózgu we wczesnym okresie postnatalnym. Otrzymanie pozytywnych wyników może przyczynić się do wypracowania nowych schematów terapeutycznych, które zapewnią zastąpienie neuronów uszkodzonych w wyniku asfiksji okołoporodowej nowymi komórkami nerwowymi.