

dr Małgorzata Nałęcz
Zakład Neurobiologii Naprawczej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN
ul. A. Pawińskiego 5
02-106 Warszawa

Annex I

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko.

Dr Małgorzata Nałęcz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

1998 – Mgr biologii – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi; specjalizacja – biologia molekularna

2007 – Dr nauk medycznych;

Rozprawa doktorska wykonana w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Zalewskiej pt. „Wpływ niedokrwienia i reperfuzji na przekaźnictwo sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego”. Praca nagrodzona wyróżnieniem Rady Naukowej IMDiK PAN.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1999 - 2011- asystent w Zakładzie Neurobiologii IMDiK PAN

2011- obecnie – adiunkt w Zakładzie Neurobiologii IMDiK PAN

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl spójnych tematycznie publikacji „**Regulacja neuro- i gliogenezy w modelach okołoporodowego, hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu**”

składający się z 5 prac naukowych o sumarycznym **IF=21,891; MNiSW=170**.

1. **Ziemka-Nalecz M**, Stanaszek L, Zalewska T. Oxygen-glucose deprivation promotes gliogenesis and microglia activation in organotypic hippocampal slice culture: involvement of metalloproteinases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):130-42. (**IF – 2.244, MNiSW – 15**). Mój wkład w realizację celu tej pracy polegał na prowadzeniu hodowli skrawków organotypowych hipokampa, zaprojektowaniu i wykonaniu większości doświadczeń, opracowaniu wyników i współudziale w pisaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 75%.
2. **Ziemka-Nalecz M**, Jaworska J, Sypecka J, Polowy R, Filipkowski RK, Zalewska T. Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Exhibits Neuroprotective/Neurogenic Effects in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Mol Neurobiol*. 2017, 54(7): 5300-5318 (**IF – 5.076, MNiSW – 40**). Mój wkład w powstanie tej pracy polegał postawieniu hipotezy badawczej i zaprojektowaniu doświadczeń, przygotowaniu materiału do badań (indukcja uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego u zwierząt, izolacja tkanek), wykonaniu oznaczeń immunohistochemicznych i biochemicznych, opracowaniu statystycznym i interpretacji wyników oraz współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 60%.
3. Jaworska J, **Ziemka-Nalecz M**, Sypecka J, Zalewska T. The potential neuroprotective role of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, after neonatal hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation*. 2017, 14(1): 34. (**IF – 5.193, MNiSW – 40**). Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu doświadczeń, przygotowaniu materiału do badań (indukcja uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego u zwierząt, izolacja tkanek), wykonaniu części oznaczeń immunohistochemicznych i większości badań biochemicznych, opracowaniu statystycznym i interpretacji wyników oraz współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 60%.
4. **Ziemka-Nalecz M**, Janowska J, Strojek L, Jaworska J, Zalewska T, Frontczak-Baniewicz M, Sypecka J. Impact of neonatal hypoxia-ischaemia on oligodendrocyte survival, maturation and myelinating potential. *J Cell Mol Med*. 2018 Jan;22(1):207-222. (**IF – 4.302, MNiSW – 35**). Mój wkład w realizacji tej pracy polegał na przygotowaniu materiału do badań (indukcja uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego

u zwierząt, izolacja tkanek), wykonaniu większości oznaczeń immunohistochemicznych oraz wykonaniu zdjęć z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej, a także współdziałale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 40%.

5. Jaworska J, Zalewska T, Sypecka J, **Ziemka-Nalecz M**. Effect of the HDAC Inhibitor, Sodium Butyrate, on Neurogenesis in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia: Potential Mechanism of Action. *Mol Neurobiol.* 2019 Feb 14. doi: 10.1007/s12035-019-1518-1 (**IF – 5.076, MNiSW – 40**). Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na postawieniu hipotezy badawczej i zaprojektowaniu doświadczeń, przygotowaniu materiału do badań (indukcja uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego u zwierząt, izolacja tkanek), interpretacji wyników, wykonaniu rycin oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 50%.

1. Wprowadzenie

Asfiksja okołoporodowa jako problem kliniczny i społeczny

Okołoporodowe stany niedotlenieniowo-niedokrwienne (asfiksja okołoporodowa) są niezwykle istotnym problemem neonatologii. W krajach rozwiniętych asfiksja okołoporodowa dotyczy 2 do 4 na 1000 noworodków urodzonych w terminie (Younkin, 1992). W skali całej populacji światowej problem ten jest jeszcze bardziej istotny. Do różnego rodzaju epizodów niedotlenieniowo-niedokrwienych podczas porodu dochodzi aż u 26 na 1000 żywo urodzonych dzieci (Lawn i wsp. 2005). Przedłużające się niedotlenienie skutkuje rozwojem zespołu encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej (ENN), prowadzącej przede wszystkim do uszkodzenia niezwykle wrażliwego na niedobory tlenu ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W najcięższych przypadkach ENN dochodzi do śmierci mózgowej oraz zgonu noworodka. Szacuje się, że dotyczy to około 20-25 % dzieci dotkniętych asfiksją okołoporodową. U noworodków, które pozostają przy życiu, niedokrwienie/niedotlenienie okołoporodowe może prowadzić do rozwoju przejściowych lub długotrwałych zaburzeń neurologicznych, takich jak dziecięce porażenie mózgowe, padaczka, niedowłady kurczowe, zahamowanie rozwoju intelektualnego. Do trwałego uszkodzenia mózgu dochodzi u 25% dzieci dotkniętych ENN. Lekka postać encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej zwykle nie pozostawia trwałych zmian i nie prowadzi do zaburzeń rozwojowych dziecka (Łosiowski, 1990).

Zwiększone ryzyko rozwoju ENN związane jest z wystąpieniem stanów obniżonej rezerwy tlenowej, które mogą rozwijać się u matki, płodu, albo pochodzić z łożyska. Wśród

przyczyn pochodzących od matki wymienić można zakażenia wewnątrzrodniowe, choroby upośledzające wentylację i dystrybucję tlenu (np. gorączka, astma, niewydolność krążenia, wady serca, niedokrwistość) jak również choroby układowe (nadciśnienie bądź niedociśnienie tętnicze, cukrzyca, toczeń rumieniowaty trzewny). Do przyczyn płodowych ENN zalicza się min. niską masę urodzeniową, wady wrodzone, nieprawidłowości w zapisie KTG. Czynniki łożyskowe związane są przede wszystkim z przodującym łożyskiem lub też jego przedwczesnym oddzieleniem. Niedotlenienie okołoporodowe może wystąpić także w wyniku uciśnięcia naczyń pępowinowych (np. w wyniku owinięcia się pępowiny wokół płodu), wypadnięcia pępowiny, a także przedłużającego się ucisku główki płodu na dno miednicy podczas porodu (Szejniuk i Szymankiewicz, 2008).

Patomechanizm

W wyniku niedokrwienia/niedotlenienia zostaje ograniczony dopływ tlenu do tkanki nerwowej. Uruchamia to całą kaskadę niekorzystnych odpowiedzi takich jak: zaburzenia homeostazy jonowej, ekscytotoksyczność, stres oksydacyjny, apoptoza, rozwój stanu zapalnego. Wszystkie powyższe procesy patologiczne tworzą czasowo-przestrzenną sekwencję zdarzeń i w konsekwencji prowadzą do uszkodzenia neuronów oraz komórek glejowych.

Ograniczone zaopatrzenie mózgu w tlen już w pierwszej minucie prowadzi do wyczerpania zasobów ATP i głębokiego kryzysu energetycznego komórek. Przy braku dopływu tlenu do komórek energia wytwarzana jest w niskowydajnym procesie glikolizy beztlenowej, prowadzącym do zwiększenia liczby jonów H^+ i stężenia mleczanów, co skutkuje rozwojem kwasicy metabolicznej. Konsekwencją zaburzeń energetycznych w komórce jest utrata zdolności do utrzymania prawidłowej homeostazy jonowej oraz neuroprzebieżnikowej. Niższa wydajność energetyczna prowadzi do zakłócenia pracy ATPazy Na^+/K^+ , zwiększa zewnątrzkomórkowe stężenia jonów K^+ oraz akumulację jonów Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- we wnętrzu komórki i w ciągu 3-5 minut doprowadza do całkowitej depolaryzacji błony. Ponadto podwyższone stężenie jonów Na^+ prowadzi do nagromadzenia wody w komórce co skutkuje cytotoksycznym obrzękiem neuronów. W wyniku depolaryzacji błony komórkowej zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} dochodzi do nadmiernego uwolnienia kwasu glutaminowego z zakończeń presynaptycznych neuronów. Wzrost stężenia glutaminianu w przestrzeni synaptycznej powoduje nadmierne pobudzenie receptorów N-metylo-D-asparaginowych (NMDA) oraz 3-amino-5-metylo-4-izoksazolo-propionowych (AMPA), i prowadzi do masowego napływu jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki. Nadmierne nagromadzenie jonów Ca^{2+} w mitochondriach skutkuje obniżeniem błonowego potencjału

elektrycznego ($\Delta\Psi$) i aktywacją kanałów mitochondrialnych MPT (ang. mitochondrial permeability transition pore). Przez otwarte kanały MPT do matrix mitochondrialnego wnikają jony oraz substancje niskocząsteczkowe co prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia struktury mitochondrium, a następnie do śmierci komórki przede wszystkim na drodze nekrozy. Powyższe procesy odpowiedzialne są za wczesną fazę uszkodzenia neuronów (Ferriero 2004, Calvert i Zhang 2005).

Opóźniona faza uszkodzenia komórek nerwowych następuje kilka godzin po przywróceniu krążenia. W tym czasie dochodzi do wtórnego wzrostu stężenia Ca^{2+} w komórce i uruchomienia procesów prowadzących do jej śmierci na drodze apoptozy. Nadmierne stężenie jonów wapnia prowadzi do wypływu cytochromu c z macierzy mitochondrialnej do cytoplazmy. Białko to łączy się z retikulum endoplazmatycznym co skutkuje uwolnieniem depozytu Ca^{2+} przez wapniowo-zależne receptory rianodynowe i dodatkowo potęguje wypływ cytochromu c z mitochondriów. Kończącym etapem tego procesu jest połączenie cytochromu c z cytoplazmatycznym białkiem Apaf-1 (ang. Apoptotic Protease Activating Factor-1), deoxy-ATP oraz prokaspazą 9. Kompleks tych białek tworzy apoptosom, którego główną rolą jest aktywacja kaspaz efektorowych, głównie kaspazy -3 i -7. Proteazy te degradują cały szereg białek strukturalnych oraz enzymatycznych, prowadząc do śmierci komórki. W proces aktywacji apoptozy obok cytochromu c zaangażowanych jest wiele innych białek, między innymi mitochondrialny czynnik AIF (apoptosis inducing factor), oraz endonukleaza G (odpowiedzialne za kondensację chromatyny i fragmentację DNA) czy też białka Smac/DIABLO i HtrA2/Omi (dezaktywujące inhibitory kaspaz) (Thornton i wsp. 2017).

Do uszkodzenia komórek nerwowych przyczyniają się także wolne rodniki, głównie wodorotlenki i nadtlenki, których produkcja nasilona jest przede wszystkim w okresie reperfuzji i przywracania oksigenacji tkanek. Wolne rodniki tlenowe (ROS, ang. reactive oxygen species) w warunkach fizjologicznych są wytwarzane przez mitochondria podczas transportu elektronów w łańcuchu oddechowym, jednak są one neutralizowane przez endogenne enzymy i związki antyoksydacyjne. Nadmierna produkcja ROS podczas niedokrwienia, związana z podwyższonym stężeniem jonów Ca^{2+} i Na^+ , przeważa nad endogennymi mechanizmami antyoksydacyjnymi i prowadzi bezpośrednio do peroksydacji lipidów błon komórkowych, uszkodzeń DNA, inaktywacji enzymów oraz zmian strukturalnych w cząsteczkach białek i węglowodanów (Thornton i wsp. 2015). Szczegółowa charakterystyka produkcji wolnych rodników i tlenku azotu wykraczają poza ramy tego opracowania.

Jednym z kluczowych czynników patogennych okołoporodowego uszkodzenia mózgu jest reakcja zapalna. Indukcja odpowiedzi zapalnej następuje w wyniku aktywacji komórek obecnych w OUN, przede wszystkim mikrogleju i astrocytów, ale także na skutek napływu neutrofilii, monocytów/makrofagów i leukocytów z krwi obwodowej do parenchymy mózgu. Oba typy komórek produkują szereg czynników zapalnych (takich jak cytokiny, chemokiny, reaktywne formy tlenu i azotu), prowadzących do progresji uszkodzenia tkanki nerwowej (Hagberg i wsp. 2015).

Komórkami odgrywającymi główną rolę w rozwoju stanu zapalnego mózgu po asfiksji okołoporodowej jest mikroglej. W warunkach fizjologicznych komórki te charakteryzują się długimi i silnie rozgałęzionymi wypustkami, które kurcząc się i wydłużając stale monitorują ściśle określony obszar mózgu. W sytuacji patologicznej mikroglej przechodzi transformację do formy ameboidalnej umożliwiającą migrację do miejsc uszkodzenia oraz fagocytozę pozostałości po obumarłych komórkach. Należy pamiętać, że komórki odpowiedzi zapalnej mogą uczestniczyć także w procesach naprawczych (Faustino i wsp. 2011). Ta dualistyczna rola mikrogleju/makrofagów wynika z różnych stanów ich aktywacji związanych z określonymi fenotypami. Komórki mikrogleju o fenotypie M1 odpowiedzialne są za produkcję nasilających uszkodzenie mediatorów prozapalnych (cytokiny, ROS, NO, MMPs) (Hu i wsp. 2012, 2015). Natomiast komórki o fenotypie M2, uwalniając czynniki przeciwzapalne i troficzne (IL-10, IGF, TGF β , GDNF), promują procesy naprawcze (Lalancette-Hebert i wsp. 2007).

Kolejnymi komórkami zaangażowanymi w powstawanie stanu zapalnego w patologii hipoksyjno-ischemicznej są astrocyty. We wczesnej fazie uszkodzenia poischemicznego astrocyty są głównymi mediatorami obrzęku cytotoksycznego, a także są źródłem glutaminianu oraz czynników prozapalnych (IL-1 β , NO, S100 β). Ponadto astrocyty wydzielają chemokiny min. CXCL1 i CXCL2, które są chemoatraktantami dla leukocytów. Leukocyty przechodząc przez rozszczieloną barierę krew-mózg przyczyniają się do pogłębienia stanu zapalnego i wtórnego uszkodzenia tkanki. W późniejszym okresie astrocyty stają się hipertroficzne i zaczynają się intensywnie dzielić. Tworzy się blizna glejowa, która częściowo oddziela tkankę uszkodzoną od zdrowej, co przyczynia się do ograniczenia rozprzestrzeniania stanu zapalnego i umożliwia inicjację procesów naprawczych tkanki (Takano i wsp. 2009, Sofroniew 2015).

Histopatologia

Obraz kliniczny oraz histopatologiczny jaki obserwuje się po okołoporodowym niedokrwieniu/ niedotlenieniu nie jest jednorodny. Różnice wynikają z ciężkości

niedotlenienia, czasu jego trwania, a także stopnia dojrzałości mózgu dziecka. U noworodków przedwcześnie urodzonych, w wyniku łagodnego lub umiarkowanego niedotlenienia, uszkodzeniu ulega istota biała. Dopiero przedłużające się, ciężkie niedotlenienie prowadzi do uszkodzenia istoty szarej. U noworodków dojrzałych, w przeciwieństwie do zmian patomorfologicznych występujących u wcześniaków, skutkiem niedotlenienia mózgu w stopniu łagodnym lub umiarkowanym jest uszkodzenie struktury istoty szarej. Dopiero w ciężkiej postaci ENN oprócz rozległego uszkodzenia neuronów dochodzi do wielotorbielowatej martwicy istoty białej (Hnatyszyn 2007).

Najczęściej spotykaną zmianą histopatologiczną obserwowaną w przebiegu ENN u noworodków urodzonych w terminie jest selektywna martwica neuronów, która rozwija się w następstwie ostrego i głębokiego niedotlenienia mózgu. Ten typ uszkodzenia dotyczy głównie struktur, w których najliczniej występują receptory glutaminergiczne oraz rejonów charakteryzujących się największym zapotrzebowaniem energetycznym. Są to przede wszystkim hipokamp, mózdzek, wzgórze, zwoje podstawy oraz głębokie warstwy kory mózgowej. Sелеktywna martwica neuronów występuje w obu półkulach a rozległość zmian zależy od ciężkości i czasu trwania niedotlenienia (Flodmark i wsp. 2002, Hnatyszyn 2007).

Nieco rzadziej obserwowane jest przystrzałkowe uszkodzenie mózgu, które związane jest z łagodnym lub umiarkowanym niedotlenieniem tkanki nerwowej. Ten typ uszkodzenia rozwija się na granicy stref ukrwienia i jest spowodowany hipoperfuzją dużych tętnic mózgu. Uszkodzeniu ulega przede wszystkim kora mózgowa, a w mniejszym stopniu znajdująca się poniżej istota biała. Zmiany zlokalizowane są obustronnie, okołostrzałkowo, zwykle w okolicy ciemieniowo-potylicznej (Triulzi i wsp. 2005).

Najradszą patologią w rozwoju ENN jest stan marmurkowaty, spowodowany utratą neuronów, rozplemem komórek glejowych oraz hipermielinizacją w obrębie wzgórza, jądra ogoniastego, gałki bladej i skorupy. W wyniku resorpcji powstałych zmian może dojść do wielotorbielowatego rozmiękczenia mózgu i powstawania jamistości w ośrodkowym układzie nerwowym. W obrazie klinicznym często obserwuje się upośledzenie umysłowe oraz czterokończynowe porażenie spastyczne (Dąbska 1990).

Strategie terapeutyczne ukierunkowane na neuroprotekcję i stymulację mechanizmów naprawczych tkanki

Terapia noworodków z encefalopatią niedotlenieniowo-niedokrwinną sprowadza się przede wszystkim do stosowania środków przeciwdrgawkowych i stabilizacji parametrów fizjologicznych. W krajach rozwiniętych jedynym zatwierdzonym postępowaniem leczniczym u dzieci po okołoporodowym niedotlenieniu jest hipotermia. Chłodzenie mózgu

odbywa się przy użyciu specjalnego, wielowarstwowego czepka zakładanego na główkę dziecka, przez który stale przepływa płyn o określonej temperaturze. Wykazano, że obniżenie temperatury mózgu noworodka o 3-4°C przez okres 72 godzin wywiera wyraźny i długotrwały efekt neuroprotekcyny na niedotlenioną tkankę nerwową, jednakże tylko w przypadku ENN w stopniu lekkim do umiarkowanego (Gluckman i wsp. 2005). Protekcyjny wpływ hipotermii leczniczej związany jest ze zwolnionym przepływem krwi w czasie reperfuzy, co wiąże się z ograniczeniem powstawania wolnych rodników tlenowych, działających uszkodzająco na strukturę błony komórkowej. Ponadto obniżenie temperatury ciała już o 1°C zmniejsza tempo dynamiki metabolizmu o ok 5%, a więc redukuje zapotrzebowanie na energię, której wytwarzanie w niedotlenionej tkance jest zaburzone (Gluckman i wsp. 2005, Sameshima i Ikenoue 2013).

W ostatnich latach przedmiotem zainteresowania stały się opisywane w literaturze naukowej osiągnięcia medycyny regeneracyjnej. Badania kliniczne z zastosowaniem autologicznych przeszczepów komórek macierzystych pozyskanych z krwi pępowinowej w leczeniu dzieci z encefalopatią niedotlenieniowo-niedokrwienną przeprowadzono min. w USA (Duke University: NCT 01147653, Medical College of Georgia: NCT 01072370). Początkowe wyniki okazały się na tyle obiecujące, że do badania zostali włączeni dodatkowi pacjenci.

Prowadzone do tej pory badania mające na celu opracowanie bezpiecznego leku, ograniczającego skutki niedotlenienia okołoporodowego u dzieci, okazały się nieskuteczne. Podejmowane próby neuroprotekcji obejmujące między innymi podawanie antagonistów aminokwasów pobudzających, czynników wzrostowych, inhibitorów wolnych rodników, kannabinoidów czy też blokowanie czynników prozapalnych i proapoptotycznych nie przyniosły oczekiwanych rezultatów i powodowały często niekorzystne efekty uboczne, które dodatkowo zaburzały funkcje rozwijającego się mózgu (Gardoni i Di Luca, 2006). Liczne związki, pomimo neuroprotekcynnego działania wykazanego w testach na modelach zwierzęcych, nie przeszły pozytywnie badań klinicznych. Wśród przyczyn niepowodzenia w translacji wyników testów na zwierzętach do kliniki wymienia się między innymi niewłaściwe przeprowadzanie badań klinicznych (stosowanie zbyt niskich dawek potencjalnych substancji terapeutycznych oraz zbyt późne wdrożenie leczenia) (Cheng i wsp. 2004). Niepowodzenia te mogą być także związane z faktem, że stosowane modele zwierzęce, bardzo rzadko w pełni odzwierciedlają przypadki kliniczne. Ponadto, pomimo coraz lepszego poznania mechanizmów prowadzących do śmierci komórek nerwowych w wyniku

niedotlenienia, nasza wiedza może być wciąż niewystarczająca do opracowania skutecznej terapii farmakologicznej (Doyle i wsp. 2008).

Odkrycie zjawiska neurogenezy w mózgu dorosłych osobników, spowodowało wzrost zainteresowania badaczy regeneracją nieodwracalnie uszkodzonych komórek nerwowych na drodze naturalnej repopulacji. Zaobserwowano, że w wyniku niedokrwienia mózgu endogenne komórki macierzyste mogą przejść w fazę przyśpieszonych podziałów i tworzyć komórki potomne. Wzmoczoną proliferację neuralnych progenitorów, a następnie ich migrację do miejsc uszkodzenia, gdzie stają się komórkami o dojrzałym fenotypie opisano w eksperymentalnym modelu niedokrwienia mózgu dojrzałego oraz w modelu asfiksji okołoporodowej (Plane i wsp. 2004, Yang i Levison 2007, Kadam i wsp. 2008). Pomimo, że stymulacja procesu neurogenezy po uszkodzeniu niedotlenieniowo-niedokrwieniowym (hipoksyjno-ischemicznym) nie budzi wątpliwości, to ilość nowych komórek różnicujących się do neuronów jest niewystarczająca aby zastąpić neurony uszkodzone, przy czym znaczna liczba nowopowstałych komórek ulegała apoptozie. Zgodnie z opublikowanymi danymi, po 5 tygodniach jedynie około 15% komórek, w stosunku do całej puli neuronów powstałych *de novo*, pozostawało komórkami żywymi (Ong i wsp. 2005). W świetle tych informacji wydaje się, że alternatywną strategią pozostaje poszukiwanie związków farmakologicznych, które umożliwią sterowanie rozwojem endogennych komórek macierzystych/progenitorowych i ich ekspansją *in situ* w stopniu zapewniającym zastąpienie komórek uszkodzonych oraz podjęcie ich funkcji (Covic i wsp. 2010).

2. Badania własne

Badania wykonane w ramach omawianego cyklu prac miały na celu:

- określenie procesów neuro- i gliogenezy w modelach neonatalnej hipoksji-ischemii
- zbadanie wpływu jednego z inhibitorów deacetylaz histonów – maślanu sodu na (a) przeżycie, powstawanie i różnicowanie komórek neuralnych, (b) modulację reakcji zapalnej w modelu asfiksji okołoporodowej 7-dniowych szczurów,
- określenie potencjalnego molekularnego mechanizmu działania maślanu sodu.

Modele neonatalnej hipoksji-ischemii

W toku badań opisanych w cyklu prac wykorzystano dwa modele doświadczalne: (1) model *ex vivo* z wykorzystaniem hodowli organotypowych skrawków hipokampa, które poddawano procedurze symulującej warunki ischemiczne (OGD, ang. oxygen glucose

deprivation), (2) model *in vivo*, w którym hipoksyjno-ischemiczne uszkodzenie mózgu indukowane było u 7-dniowych osesków szczura.

Zastosowany w moich badaniach model hipoksji-ischemii *in vitro* (OGD) na skrawkach organotypowych hipokampa pozyskanych z mózgu 7-dniowych szczurów miał na celu określenie wpływu niedoboru tlenu i glukozy na procesy neurogenezy i oligodendrogeny. Uszkodzenie tkanki wywoływano poprzez wycofanie z pożywki hodowlanej glukozy i zastąpienie jej mannitolem, a następnie umieszczenie skrawków w komorze hipoksyjnej w atmosferze całkowicie pozbawionej tlenu (95% N₂, 5% CO₂) na okres 40 minut. Czasowe ograniczenie dostępu tlenu i glukozy dość dobrze odzwierciedla warunki na jakie narażony jest mózg podczas epizodu niedokrwienia/niedotlenienia, dlatego też pozwala na przeprowadzenie badań wielu procesów komórkowych i molekularnych w niedotlenionej tkance. Zaletą hodowli organotypowych w porównaniu do hodowli komórkowych jest zachowana struktura tkanki, co umożliwia obserwację połączeń synaptycznych oraz interakcji pomiędzy komórkami nerwowymi, astro- i oligodendroglejem. Ponadto hodowla skrawków organotypowych umożliwia utrzymanie identycznych warunków środowiskowych w trakcie trwania całego eksperymentu. Ułatwia to uzyskanie bardziej jednorodnych wyników przy jednoczesnym użyciu niewielkiej liczby zwierząt wykorzystanych do pozyskania materiału. Nie jest to możliwe w przypadku badań *in vivo* na zwierzętach, które pomimo restrykcyjnych warunków hodowlanych wykazują dość dużą zmienność osobniczą. Hodowle organotypowe nie są jednak pozbawione wad. Podczas przygotowania skrawków uszkodzeniu ulega zewnętrzna warstwa komórek, co niewątpliwie wpływa na strukturę i metabolizm hodowanej tkanki. Niemniej jednak skrawki organotypowe hipokampa są powszechnie akceptowane i od wielu lat z powodzeniem wykorzystywane w badaniach neurobiologicznych.

Model neonatalnej hipoksji-ischemii *in vivo*, oparty jest na powszechnie stosowanym modelu Levine (1960), zmodyfikowanym i przystosowanym do badań na oseskach szczurzych przez Rice'a (Rice i wsp. 1981). W moich badaniach okołoporodowe uszkodzenie mózgu indukowane było u 7-dniowych osesków szczura. Wyniki systemowych badań morfologicznych wykazały, że w siódmym dniu życia mózg szczura odpowiada rozwojowi mózgu dziecka będącego na etapie 32-36 tygodnia ciąży (Cuaycong i wsp. 2011), a więc w czasie, kiedy istnieje bardzo duże zagrożenie asfiksją okołoporodową, w przypadku przedwczesnego porodu. Hipoksyjno-ischemiczne uszkodzenie mózgu u szczurzych osesków indukowane było poprzez jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej, a następnie 60 minutową ekspozycję zwierząt na warunki hipoksyjne (7,6 % O₂ w N₂). Zabieg operacyjny

jest prosty, krótkotrwały, a cała procedura łączy się z bardzo niską śmiertelnością zwierząt. Indukcja niedokrwienia/niedotlenienia u osesków szczurzych prowadziła do uszkodzenia rejonu mózgowia unaczynionego przez końcowe odgałęzienia tętnicy szyjnej wspólnej i do ubytku masy tkanki w półkuli hipoksyjno-ischemicznej (ipsilateralnej). Półkula przeciwstawna (kontralateralna) traktowana była jako wewnętrzna kontrola. Dodatkową kontrolę stanowiły mózgi zwierząt poddanych operacji pozorowanej (sham). Szczury z tej grupy były poddane całej procedurze zabiegowej, ale bez podwiązania tętnicy oraz bez ekspozycji na warunki hipoksyjne. Model asfiksji neonatalnej jest dobrze scharakteryzowany pod względem metabolizmu energetycznego, hemodynamiki oraz przemiany białek (Gilland i Hagberg, 1996, Hagberg 1997). Ponadto zapis EEG u zwierząt, u których wykonano wyżej opisany zabieg, jest podobny do zapisu EEG otrzymanym w warunkach klinicznych u noworodków z encefalopatią niedotlenieniowo-niedokrwinną (Hellstrom-Westas i wsp. 1995). Powyższe cechy powodują, że wybrany przez nas model badawczy dość dobrze odzwierciedla uszkodzenie mózgu jakie rozwija się w wyniku niedotlenienia/niedokrwienia u noworodków.

Charakterystyka procesów neuro- i gliogenezy po hipoksji-ischemii

W okresie postnatalnym powstawanie nowych neuronów ograniczone jest do dwóch rejonów w mózgu: strefy okołokomorowej (ang. subventricular zone, SVZ) zlokalizowanej wokół komór bocznych mózgu oraz strefy podziarnistej w zakręcie zębatym hipokampa (ang. subgranular zone, SGZ). Z komórek macierzystych zlokalizowanych w strefie SVZ powstają neuroblasty, które migrują szlakiem RMS (ang. Rostral Migratory Stream) do opuszki węchowej, gdzie różnicują się do interneuronów ziarnistych i okołokłębuszkowych (Gage 2000, Alvarez-Buylla i Garcia-Verdugo 2002, Doetsch 2003). Progenitory neuralne ze strefy podziarnistej migrują wzdłuż włókien astrocytów do pobliskiej warstwy ziarnistej i różnicują w neurony, które wykazują ekspresję neuronu-specyficznego enolazy (NSE, ang. neuronal specific enolase), kalbindyny, czy też jądrowego białka NeuN (Kuhn i wsp. 1996). Nowopowstałe neurony ziarniste w ciągu kilku dni wytwarzają dendryty i aksony, które ukierunkowane są odpowiednio do warstwy brzeżnej (ang. molecular layer) oraz rejonu CA3 hipokampa (vanPraag i wsp. 2002, Kempermann i wsp. 2004). Należy jednak podkreślić, że znaczna liczba neuronów powstałych w rejonach SVZ i SGZ wchodzi na drogę apoptozy przed osiągnięciem fenotypu dojrzałego (Biebl i wsp. 2000, Petreanu i Alvarez-Buylla 2002). Obecność neuralnych komórek macierzystych stwierdzono także w obrębie struktur „nie neurogennych”, takich jak rejon CA1 hipokampa, prążkowie, kora mózgowia. W warunkach

fizjologicznych różnicują się one przede wszystkim w komórki gleju, natomiast w warunkach patologicznych komórki te mogą różnicować się także w neurony (Lie i wsp. 2004, Emsley i wsp. 2005, Arias-Carrion i wsp. 2007).

Wyniki badań eksperymentalnych wskazują na aktywację procesów neurogenezy u zwierząt dorosłych w różnych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego, w tym po ischemii mózgu (Zhang i wsp. 2001, Arvidsson i wsp. 2002, Nakatomi i wsp. 2002, Parent 2003, Yamashita 2006). Po niedokrwieniu/niedotlenieniu mózgu wzrasta proliferacja progenitorów neuralnych w obu strefach neurogennych SVZ i SGZ, ale także w korze mózgowej oraz prążkowi (Johansson i wsp. 1999, Yamamoto i wsp. 2001). Nowopowstałe neurony migrują do miejsc uszkodzenia, gdzie różnicują się do fenotypów dojrzałych i wbudowują do istniejącej sieci połączeń neuronalnych. Jednak nawet wzrost liczby neuronów powstających w uszkodzonym mózgu nie jest wystarczający do pełnej regeneracji tkanki. Znacznie mniej jest wiadomo na temat neurogenezy w mózgu niedojrzałym, narażonym na czasowe niedokrwienie/niedotlenienie. Jednym z pierwszych doniesień wskazujących na stymulację procesu powstawania nowych neuronów w strefie SVZ komórek bocznych była publikacja Plane i wsp. (2004). Autorzy wykazali, że w wyniku indukcji hipoksji-ischemii u 10 dniowych myszy, wzrastała proliferacja neuroblastów DCX(+) w strefie SVZ oraz w prążkowi w pobliżu miejsca uszkodzenia tkanki. Stymulację neurogenezy w modelach asfiksji okołoporodowej opisali również inni badacze (Hayashi i wsp. 2005, Ikeda i wsp. 2005, Yang i Levison, 2006). Prace te wskazują, że mózg zwierząt niedojrzałych również posiada zdolności regeneracyjne, być może nawet większe niż w przypadku osobników dorosłych. Niestety wyniki badań dotyczących powstawania nowych neuronów w strefie SGZ zakrętu zębatego w odpowiedzi na niedokrwienie/niedotlenienie okołoporodowe są niejednoznaczne. Obserwowano zarówno wzmocnienie zdolności proliferacyjnych komórek (Bartley i wsp. 2005) jak i spadek liczby nowopowstałych komórek, które w większości miały fenotyp neuronalny (Chang i wsp. 2006, Kadam i wsp. 2008).

W badaniach prowadzonych w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej, nie odnotowaliśmy wpływu neonatalnej hipoksji-ischemii indukowanej u 7-dniowych szczurów na proliferację komórek w neurogennych strefach SGZ i SVZ oseszków szczura w trakcie trwania eksperymentu (od 3 do 14 dni po HI) (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2017, Jaworska i wsp. 2019; poz. nr 2 i 5**). Do oznaczenia stopnia proliferacji zastosowaliśmy znacznik BrdU, który jest analogiem tymidyny wbudowującym się do DNA dzielących się komórek. BrdU podawany był dootrzewnowo 24 godziny przed perfuzją zwierzęcia, a liczba wyznakowanych komórek odzwierciedlała dynamikę proliferacji w tym czasie. Niewielki wzrost liczby

komórek wyznakowanych znacznikiem BrdU, obserwowany w zakręcie zębatym hipokampa półkuli ipsilateralnej 3, 6 i 9 dni po HI, nie był istotny statystycznie w stosunku do liczby komórek BrdU (+) w półkuli kontralateralnej oraz mózgach zwierząt kontrolnych. Podobne wyniki otrzymaliśmy symulując warunki ischemiczne w skrawkach organotypowych hipokampa, które następnie hodowane były w pożywce z dodatkiem BrdU. Liczba proliferujących komórek w rejonie zakrętu zębatego oraz sektorze CA1 skrawków hipokampa po OGD była taka sama jak w skrawkach kontrolnych (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2013; poz. nr 1**). W kolejnym etapie badań prowadzonych przez nasz Zespół określiliśmy wpływ asfiksji okołoporodowej na kolejne etapy neurogenezy. W celu oznaczenia fenotypu nowopowstałych komórek, znacznik BrdU podawano dwa razy dziennie, przez kolejne 3 dni począwszy od 4 dnia po HI, a fenotypy dzielących się komórek określono na podstawie reakcji ze specyficznymi przeciwciałami znakującymi neurony o różnym stopniu dojrzałości: z doublecortiną (DCX, marker neuroblastów), kalbindyną (Calbindin, marker dojrzałych neuronów ziarnistych) oraz NeuN (Neuronal Nuclei, marker dojrzałych neuronów). Prowadzone przez nas badania wykazały, że okołoporodowe niedokrwienie/niedotlenienie hamuje neurogenezę w strefie SGZ zakrętu zębatego hipokampa w modelu asfiksji neonatalnej (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2017; poz. nr 2**). Obserwowaliśmy około 50% spadek liczby nowopowstałych neuroblastów (BrdU+/DCX+) oraz dojrzałych neuronów ziarnistych (BrdU+/Calbindin+) w strefie SGZ w półkuli uszkodzonej (ipsilateralnej) odpowiednio 2 i 4 tygodnie po indukcji neonatalnej HI. Również badania *ex vivo* prowadzone z wykorzystaniem skrawków organotypowych hipokampa wykazały, że czasowy brak tlenu i glukozy (OGD) hamuje proces neurogenezy (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2013; poz. nr 1**). Inną odpowiedź obserwowaliśmy w rejonie SVZ, gdzie asfiksja okołoporodowa nie miała wpływu na liczbę neuroblastów (BrdU+/DCX+) oraz neuronów o fenotypie dojrzałym (BrdU+/NeuN+) (**Jaworska i wsp. 2019; poz. nr 5**).

W następstwie niedotlenienia/niedokrwienia okołoporodowego dochodzi nie tylko do śmierci komórek nerwowych, ale uszkodzeniu ulegają także komórki glejowe, w tym oligodendrocyty, które są odpowiedzialne za wytwarzanie osłonki mielinowej wokół aksonów. Oligodendrocyty powstają w wyniku wieloetapowego różnicowania komórek progenitorowych tzw. OPCs (ang. oligodendrocyte progenitor cells), które charakteryzują się obecnością powierzchniowego białka siarczanu proteoglikanu (ang. nerve/glial antygen 2, NG2). Niewielka liczba komórek OPC powstających w czasie życia płodowego ulega zróżnicowaniu w dojrzałe, wytwarzające mielinę oligodendrocyty. Większość progenitorów oligodendrocytarnych pozostaje jednak w postaci niezróżnicowanych skąpowypustkowych

komórek, rozproszonych w całej parenchymie mózgu. Dane literaturowe wskazują, że w istocie białej dojrzałego mózgu OPCs stanowią około 8-9%, a w istocie szarej 2-3% wszystkich komórek (Dawson i wsp. 2003, Horner i wsp. 2002). W okresie postnatalnym oligodendrocyty mogą powstawać zarówno z progenitorów obecnych w parenchymie mózgu, ale także z neuralnych komórek macierzystych rezydujących w opisanych powyżej neurogennych strefach SVZ i SGZ (Gonzalez-Perez i Alvarez-Buylla 2011, Nait-Oumesmar i wsp. 1999). Mielinizacja wypustek nerwowych najintensywniej zachodzi w okresie okołoporodowym, dlatego zaburzenie tego procesu w wyniku asfiksji neonatalnej może skutkować rozwojem szeregu zaburzeń neurologicznych. Wydaje się, że jedną z przyczyn procesów neurodegeneracyjnych, będących następstwem okołoporodowego niedotlenienia mózgu może być ubytek progenitorów oligodendrocytarnych, które są niezwykle wrażliwe na niedobór tlenu, a także zaburzony proces dojrzewania komórek OPC (Buser i wsp. 2012). Z drugiej strony wiadomo, że w odpowiedzi na uszkodzenie OUN, któremu towarzyszy demielinizacja neuronów, progenitory oligodendrocytarne mogą proliferować, migrować i różnicować w funkcjonalne oligodendrocyty (Simon i wsp. 2011, Keirstead i wsp. 1998). Dlatego szczegółowa charakterystyka zaburzeń dojrzewania i funkcjonowania oligodendrocytów po okołoporodowym niedotlenieniowo-niedokrwiennym uszkodzeniu mózgu jest konieczna do rozwoju terapii polegającej na ograniczeniu demielinizacji lub/i zwiększeniu potencjału remielinizacyjnego oligodendrocytów.

W prowadzonych w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej badaniach wykazaliśmy, że krótkotrwałe ograniczenie dostępu do tlenu i glukozy (OGD) powodowało spadek liczby progenitorów oligodendrocytów w organotypowych skrawkach hipokampa (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2018; poz. nr 4**). Ponadto wykazaliśmy, że OGD zaburza dojrzewanie oligodendrocytów w hipokampie, o czym świadczy zmniejszenie ilości komórek GalC⁺ (niedojrzałych, niemielinizujących oligodendrocytów) w stosunku do skrawków kontrolnych (Janowska i wsp. 2018). Natomiast wpływ OGD na dojrzałe, wytwarzające mielinę oligodendrocyty nie jest jednoznaczny. Z jednej strony czasowe ograniczenie dostępu tlenu i glukozy skutkowało 50% obniżeniem liczby komórek immunoreaktywnych w stosunku do białka PLP, będącego markerem dojrzałych oligodendrocytów. Z drugiej strony, w tych samych badaniach *ex vivo*, obserwowaliśmy zwiększoną immunofluorescencję w stosunku do zasadowego białka mieliny (MBP), charakterystycznego dla mielinizujących oligodendrocytów (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2018; poz. nr 4**). Wyniki badań immunohistochemicznych na skrawkach hipokampa potwierdzone zostały ilościowo immunoenzymatyczną metodą Elisa. Ilość białka MBP, oznaczonego w homogenatach

skrawków hipokampa istotnie zwiększała się, natomiast ilość białka PLP spadała pod wpływem OGD (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2018; poz. nr 4**). Białko MBP będące składnikiem otoczki mielinowej jest wytwarzane na wcześniejszym etapie dojrzewania komórki niż PLP, które stabilizuje wielowarstwową strukturę mieliny, dlatego też ischemia może mieć odmienny wpływ na oba te białka.

Badania *in vivo* prowadzone na modelu asfiksji okołoporodowej u szczurów, częściowo potwierdziły wyniki uzyskane na skrawkach organotypowych. W hipokampach zwierząt po HI drastycznie spadała liczba nowopowstałych komórek OPC, jednakże nie notowano wpływu niedotlenienia/niedokrwienia na dojrzewanie oligodendrocytów. Liczba nowopowstałych nieielinizujących oligodendrocytów (O4+/BrdU+) w hipokampie półkuli uszkodzonej była podobna jak u zwierząt kontrolnych (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2017; poz. nr 2**). Interesującym jest fakt, że w drugim badanym przez nas rejonie neurogennym – SVZ, a także w obszarze prążkowie, neonatalna hipoksja-ischemia nie wpływała na proces oligodendrogenyzy (**Jaworska i wsp. 2019; poz. nr 5**). Nie obserwowaliśmy także istotnych statystycznie zmian w ilości białek MBP i PLP, charakterystycznych dla dojrzałych oligodendrocytów, w homogenatach półkul mózgowych zwierząt po HI (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2018; poz. nr 4**). Analiza ultrastruktury mózgu zwierząt wykazała jednak, że neonatalna hipoksja-ischemia zmienia strukturę mieliny. W warunkach fizjologicznych mielina charakteryzuje się ściśle upakowaną wielowarstwową budową, natomiast po indukcji niedokrwienia/niedotlenienia otoczka mielinowa aksonów ulegała rozwarstwieniu i rozluźnieniu (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2018; poz. nr 4**).

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że jednym z głównych czynników biorących udział w powstawaniu i dojrzewaniu oligodendrocytów mogą być zewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne - metaloproteinazy (ang. matrix metalloproteinases, MMPs), głównie należące do grupy żelatynaz MMP-2 i MMP-9 (Sypecka i wsp. 2009, Wójcik-Stanaszek i wsp. 2011). Obecność aktywnych metaloproteinaz w oligodendrocytach oraz ich bezpośrednim sąsiedztwie sugeruje udział tych enzymów w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej podczas migracji komórek progenitorowych OPC, a także w procesie wytwarzania przez nie wypustek, które następnie rozgałęziają się i wydłużają w poszukiwaniu aksonów gotowych do mielinizacji. Dlatego też w następnym etapie badań sprawdziliśmy, czy opisane powyżej zmiany w powstawaniu i dojrzewaniu oligodendrocytów po hipoksji-ischemii mogą być związane z aktywnością metaloproteinaz. Wyniki badań opublikowane w pracy **Ziemka-Nałęcz i wsp. 2018 (poz. nr 4)**, wykazały, że neonatalne niedokrwienie/niedotlenienie obniża liczbę progenitorów oligodendrocytarnych, które

wykazują obecność aktywnych żelatynaz w hipokampie półkuli uszkodzonej, natomiast nie ma wpływu na aktywność tych enzymów w komórkach niemielinizujących oligodendrocytów wykazujących obecność markera GalC, a także oligodendrocytów dojrzałych MBP(+) i PLP(+). Wyniki te sugerują, że spadek aktywności MMPs w komórkach OPC może obniżać ich zdolność do migracji oraz dojrzewania, a także że żelatynazy mogą odgrywać bardziej istotną rolę w funkcjonowaniu progenitorów oligodendrocytów niż w komórek o fenotypie bardziej dojrzałym. Hipotezę tę potwierdzają wyniki badań, które wykazały, że liczba komórek oligodendrocytów (za wyjątkiem progenitorów OPC) kolokalizująca z aktywnymi metaloproteinazami jest niewielka (2-3% wszystkich komórek) zarówno w mózgach zwierząt kontrolnych jak i hipoksyjno-ischemicznych (**Ziemka-Nalęcz i wsp. 2018; poz. nr 4**).

Na podstawie powyższych obserwacji można wnioskować, że neonatalna hipoksja-ischemia wpływa przede wszystkim na progenitory oligodendrocytów, obniżając ich liczbę w hipokampie, zmniejszając przy tym aktywność żelatynaz w tych komórkach. W mniejszym stopniu wpływa na dojrzewanie oligodendrocytów, jednakże pomimo iż ilościowo wytwarzanie mieliny po HI nie jest zaburzone, to jednak zmianie ulega struktura otoczki mielinowej aksonów, co niewątpliwie przyczynia się do nieprawidłowego przewodzenia impulsu nerwowego.

Badania dotyczące wpływu inhibitora deacetylaz histonów – maślanu sodu na powstawanie i różnicowanie komórek neuralnych oraz na modulację reakcji zapalnej w modelu neonatalnej hipoksji ischemii u szczurów. Określenie potencjalnego molekularnego mechanizmu działania maślanu sodu.

W toku podejmowanych prób modulacji endogennej neurogenezy zaobserwowano, że tak zwane „małe związki chemiczne” (ang. "small molecules"), do których należą między innymi niektóre inhibitory deacetylaz histonów, mogą stymulować neurogenezę poprzez wpływ na komórkowe szlaki sygnałowe lub modyfikacje epigenetyczne (Covic i wsp. 2010). Jedną z kluczowych potranslacyjnych (epigenetycznych) modyfikacji histonu jest skoordynowany proces jego acetylacji/deacetylacji przy udziale dwóch klas enzymów: acetylotransferaz histonów (HATs) i deacetylaz histonów (HDACs). Efektem acetylacji jest częściowe rozluźnienie struktury chromatyny i stymulacja transkrypcji genów, natomiast deacetylacja ma działanie przeciwne, prowadzi do wyciszenia transkrypcji. O znaczeniu procesu acetylacji/deacetylacji świadczy fakt, że substratami enzymów, obok najczęściej badanych histonów, są także czynniki transkrypcyjne, regulatory transkrypcji, białka biorące udział w transdukcji sygnałów oraz białka cytoszkieletowe, które biorą udział w podstawowych

procesach biologicznych, włączając neurogenezę (Glozak i wsp. 2005). Prowadzone badania naukowe wykazały, że podanie inhibitorów deacetylaz histonów: trichostatyny A (TSA), maślanu sodu (SB) czy vorinostatu (SAHA) w modelach ischemicznego uszkodzenia mózgu u dorosłych osobników ma wyraźne działanie neuroprotekcyjne (Faraco i wsp. 2006, Sinn i wsp. 2007, Kim i wsp. 2007, 2009). Obserwowano zmniejszenie ogniska uszkodzenia, osłabienie deficytów neurologicznych i stymulację neurogenety (Graff i wsp. 2011). Opisane pozytywne efekty inhibitorów deacetylaz histonów, jakkolwiek opisane głównie w uszkodzeniu mózgu dojrzałego osobnika, skłoniły mnie do sprawdzenia czy związki te będą działały neuroprotekcyjnie po okołoporodowym hipoksyjno-ischemicznym uszkodzeniu mózgu szczura. Do badań wybrałam jeden z inhibitorów deacetylaz histonów- maślan sodu (ang. Sodium Butyrate, SB), który wykazuje działanie hamujące w stosunku do licznych HDAC należących do grupy I oraz IIA. Związek ten naturalnie występuje w przyrodzie, min. Jest wytwarzany przez bakterie jelitowe w organizmie człowieka. Zgodnie z publikowanymi danymi zastosowana w naszych badaniach dawka (300mg/kg ciała) jest bezpieczna i nie wywołuje efektów ubocznych, co jest niezwykle istotne w kontekście potencjalnego zastosowania maślanu sodu w klinice (Kim i wsp. 2007).

Wyniki badań dotyczące działania maślanu sodu podanego zwierzętom bezpośrednio po indukcji hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu zostały opisane w trzech publikacjach: „Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Exhibits Neuroprotective/ Neurogenic Effects in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia.” *Molecular Neurobiology* 2017, 54(7): 5300-5318; “The potential neuroprotective role of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, after neonatal hypoxia-ischemia.” *Journal of Neuroinflammation*. 2017, 14(1): 34 oraz „Effect of the HDAC Inhibitor, Sodium Butyrate, on Neurogenesis in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia: Potential Mechanism of Action” *Molecular Neurobiology* 2019, doi.org/10.1007/s12035-019-1518-1.

W pierwszym etapie badań został określony wpływ maślanu sodu na stopień uszkodzenia mózgu po HI. Uzyskane wyniki wykazały, że maślan sodu zmniejszał uszkodzenie półkuli ipsilateralnej. W 14-tym dniu po indukcji HI deficyt masy półkuli uszkodzonej (hipoksyjno-ischemicznej) wynosił średnio 49,81% w odniesieniu do półkuli przeciwstawnej (hipoksyjnej). W grupie zwierząt traktowanych SB ubytek masy w półkuli ipsilateralnej zmniejszył się do 27,05%. Nie stwierdzono także obecności cyst, które licznie występowały w półkuli uszkodzonej u zwierząt nie traktowanych SB (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2017; poz. nr 2**). Otrzymane wyniki potwierdziły, że maślan sodu w modelu badawczym neonatalnej HI ma działanie neuroprotekcyjne.

Następnie zbadaliśmy, czy maślanu sodu stymuluje powstawanie nowych neuronów oraz oligodendrocytów w rejonach neurogennych SGZ oraz SVZ u zwierząt po hipoksji-ischemii. Do oznaczenia proliferacji komórek zastosowano znacznik BrdU (dokładny opis znajduje się w rozdziale powyżej), a fenotypy dzielących się komórek określono na podstawie reakcji ze specyficznymi przeciwciałami znakującymi neurony oraz oligodendrocyty o różnym stopniu dojrzałości. Podanie maślanu sodu zwierzętom po hipoksji-ischemii znacząco zwiększyło liczbę nowych neuroblastów (BrdU+/DCX+) w strefie SGZ półkuli uszkodzonej (ipsilateralnej) po upływie 2 tygodni od indukcji uszkodzenia. Zastosowanie SB przywracało także do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych, obniżoną po HI liczbę progenitorów oligodendrocytów (BrdU+/NG2+) w zakręcie zębatym hipokampa, w półkuli ipsilateralnej. Podwójne barwienia immunohistochemiczne wykonane na skrawkach mózgow uzyskanych ze zwierząt po 4 tygodniach od zabiegu HI, nie wykazały jednak znaczącej różnicy w ilości dojrzałych neuronów ziarnistych (BrdU+/Calbindin+) i oligodendrocytów (BrdU+/O4+) po zastosowaniu inhibitora deacetylaz histonów w rejonie SGZ (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2017; poz. nr 2**). Maślan sodu stymuluje powstawanie neuroblastów, a także ich dojrzewanie w drugim badanym rejonie neurogennym - SVZ w półkuli ipsilateralnej u szczurów po indukcji HI. Zastosowanie tego inhibitora nie miało natomiast istotnego wpływu na liczbę nowopowstałych progenitorów oligodendrocytów oraz niemielinizujących oligodendrocytów w strefie SVZ oraz w obszarze prążkowiec w żadnej z badanych grup eksperymentalnych zwierząt (**Jaworska i wsp. 2019; poz. nr 5**).

Można postulować, że neuroprotekcyny/neurogeny efekt SB u zwierząt po hipoksji-ischemii prawdopodobnie związany był ze wzrostem ekspresji neurotrofiny BDNF oraz aktywacją jego receptora - TrkB. BDNF (ang. Brain-Derived Neurotrophin Factor) jest jednym z najważniejszych czynników wzrostu, uczestniczącym w koordynacji proliferacji, migracji i różnicowaniu progenitorów neuralnych (Barnabé-Heider i Miller 2003, Sairanen 2005). Przeprowadzona w naszych badaniach ilościowa analiza BDNF wykazała znaczący wzrost ekspresji tej neurotrofiny (zarówno jej prekursora pro-BDNF jak i formy dojrzałej) po SB w półkuli ipsilateralnej, w porównaniu do półkuli uszkodzonej zwierząt nie traktowanych inhibitorem. Ponadto zastosowanie maślanu sodu po HI skutkowało wzrostem ekspresji receptora TrkB oraz jego formy ufosforylowanej/aktywnej. Odpowiedź ta była czasowo i przestrzennie skorelowana ze zwiększeniem poziomu BDNF (**Ziemka-Nałęcz i wsp. 2017, Jaworska i wsp. 2019; poz. nr 2 i 5**). Maślan sodu zastosowany u zwierząt po HI zwiększał także acetylację alfa-tubuliny. Wykazano, że w warunkach niedotlenienia mózgu obniża się acetylacja tego białka, co prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu oraz zahamowania

transportu aksonalnego (Fan i wsp. 2005, Northington i wsp. 2001, Yam i wsp. 1998). Przywrócenie właściwego poziomu acetylacji alfa tubuliny stymuluje wewnątrzkomórkowy transport egzosomów zawierających różnego rodzaju białka (min. BDNF), oraz ich wydzielanie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (**Jaworska i wsp. 2019; poz. nr 5**).

Badania prowadzone na zwierzęcym modelu niedokrwienia mózgu osobników dorosłych wykazały, że neuroprotekcyny efekt inhibitorów deacetylaz histonów może być związany z zahamowaniem apoptotycznej śmierci komórek nerwowych (Kim et al. 2007). Dlatego też w dalszym toku naszych badań określiliśmy wpływ maślanu sodu na aktywność oraz poziomy białek związanych z procesem apoptozy. Analiza białek pro-życiowych: HSP70 i Bcl2 oraz czynników proapoptotycznych: Bax, p53 i kaspazy-3 w mózgach zwierząt po HI nie wykazała jednak znaczących zmian w poziomach lub aktywności tych białek po zastosowaniu inhibitora HDAC. Na podstawie uzyskanych wyników możemy wnioskować, że w badanym przez nas modelu neonatalnej hipoksji-ischemii, neurogeny/neuroprotekcyny efekt SB nie ma związku z inhibicją apoptozy, w przeciwieństwie do efektu opisanego u zwierząt dorosłych (**Jaworska i wsp. 2017; poz. nr 3**).

Istnieje wiele doniesień wskazujących na przeciwzapalne działanie inhibitorów deacetylaz histonów (Aung i wsp. 2006, Kim i wsp. 2007, Ji i wsp. 2013, Fang i wsp. 2014, Steckert i wsp. 2015, Wang i wsp. 2015). Za indukcję odpowiedzi zapalnej w mózgu odpowiadają aktywowane komórki mikrogleju i makrofagi oraz uwalniane przez oba typy komórek prozapalne mediatory (cytokiny, chemokiny, NO, wolne rodniki). Aktywowany mikroglej pełni jednocześnie ważną funkcję uczestnicząc w procesach naprawczych. Podwójna rola komórek mikrogleju związana jest ze zmianą fenotypu (Hu i wsp. 2012, 1015, Hagberg i wsp. 2015). Dlatego w następnym etapie badań określiliśmy wpływ SB na stan zapalny, będący jednym z głównych czynników patologicznych po niedokrwieniu/ niedotlenieniu mózgu. W tym celu wykonaliśmy podwójne barwienia immunohistochemiczne z przeciwciałami znakującymi komórki dzielące się (BrdU+) oraz aktywowany mikroglej (ED1+). Badania przeprowadzone zostały w dwóch punktach czasowych: w 6-tym oraz 14-tym dniu po indukcji hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu. Neonatalna hipoksja-ischemia prowadziła do zwiększenia populacji komórek mikrogleju (ED1+) w półkuli hipoksyjno-ischemicznej (ipsilateralnej), głównie w korze mózgu oraz prążkowie w obu badanych punktach czasowych. Widoczny w obrazie mikroskopowym ameboidalny kształt komórek mikrogleju posiadających nieliczne wypustki, wskazuje na ich aktywację. W półkuli hipoksyjnej (kontralateralnej) oraz w mózgach zwierząt kontrolnych widoczne były tylko pojedyncze komórki aktywowanego mikrogleju, co potwierdza, że rozwój stanu zapalnego

ograniczony jest wyłącznie do półkuli uszkodzonej (**Jaworska i wsp. 2017, 2019; poz. nr 3 i 5**).

Zastosowanie SB zwiększało o 30% liczbę komórek wyznakowanych markerem ED1 po 6 dniach od indukcji uszkodzenia (**Jaworska i wsp. 2017; poz. nr 3**). Wyniki otrzymane w drugim badanym punkcie czasowym wykazały natomiast, że maślan sodu obniżał kilkukrotnie liczbę komórek ED1(+) w półkuli ipsilateralnej zwierząt 14 dni po HI (**Jaworska i wsp. 2019; poz. nr 5**). Prawdopodobnie we wczesnym czasie po HI maślan sodu stymuluje aktywację mikrogleju, co na tym etapie może być efektem korzystnym. Mobilizacja mikrogleju po SB może przyczyniać się do szybkiego i sprawnego usuwania pozostałości umierających komórek w tkance. Z kolei obserwowane w późniejszym okresie obniżenie liczby komórek ED1(+) po zastosowaniu SB, wiąże się z dezaktywacją mikrogleju oraz wyciszeniem stanu zapalnego.

Ponadto określiliśmy fenotypową polaryzację komórek mikrogleju. W tym celu korzystaliśmy z markerów ED1/IL-1beta znakujących komórki o fenotypie pozapalnym M1, oraz ED1/arginaza1 dla wyznakowania komórek o fenotypie M2, które wydzielają cytokiny przeciwzapalne i biorą udział w procesach naprawczych tkanki. W obecności SB dochodziło do zmiany polaryzacji mikrogleju w mózgach wszystkich badanych zwierząt, bez względu na czas jaki upłynął od indukcji HI. W półkuli ipsilateralnej szczurów po HI większość komórek mikrogleju prezentowało pro-zapalny fenotyp M1. Natomiast w mózgach zwierząt po HI, u których zastosowano maślan sodu notowaliśmy przewagę komórek o fenotypie M2 (**Jaworska i wsp. 2017, 2019; poz. nr 3 i 5**).

Przeciwzapalny efekt maślanu sodu potwierdziliśmy także określając poziomy wybranych białek związanych z rozwojem stanu zapalnego. Po uszkodzeniu HI obserwuje się wzrost poziomu pozapalnych cytokin (IL-1alfa, IL-1beta, TNFalfa oraz chemokiny CXCL10 (IP-10)), białka COX-2 i czynnika transkrypcyjnego NFkappaB w półkuli hipoksyjno-ischemicznej. Maślan sodu obniżał znacząco poziom prozapalnej cytokiny IL-1beta i chemokiny CXCL10 oraz białek COX-2 i NFkappa B w półkuli uszkodzonej (**Jaworska i wsp. 2017; poz. nr 3**).

Ponieważ maślan sodu okazał się związkiem o właściwościach neuroprotekcyjnych, neurogennych i przeciwzapalnych zasadne wydawało się wykonanie badań określających wpływ SB na zachowanie zwierząt po HI. Dlatego też w ostatnim etapie badań przeprowadzono wybrane testy behawioralne (Open Field, Rotarod, Grip test, Basen Wodny Morrisa oraz Wokalizacje Ultradźwiękowe) dla oceny procesów poznawczych, pamięci oraz koordynacji sensomotorycznej. Jedynie w teście z wykorzystaniem Basenu Wodnego Morrisa

oraz w testach badających Wokalizacje Ultradźwiękowe, zwierzęta po HI wykazywały znaczące zaburzenia w zachowaniu, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. W pozostałych testach nie zaobserwowano istotnego pogorszenia funkcjonalnego, co może świadczyć o wysokim stopniu adaptacji tych zwierząt. Zastosowanie maślanu sodu nie poprawiło istotnie zachowania zwierząt po hipoksji-ischemii, w żadnym z badanych testów. Jedynym zauważalnym efektem po podaniu SB była tendencja do poprawy pamięci i uczenia się u szczurów testowanych w Basenie wodnym Morrisa. Otrzymane wyniki sugerują, że zastosowanie maślanu sodu, pomimo obserwowanego efektu neuroprotekcijnego i neurogenego, nie prowadzi jednak do całkowitej kompensacji i odbudowy sieci neuronalnej w uszkodzonym mózgu (Ziemka-Nałęcz i wsp. 2017; poz. nr 2).

Podsumowanie

Przedstawione powyżej wyniki wykazały, że w następstwie niedokrwienia/niedotlenienia zostaje zahamowany proces powstawania oraz dojrzewania neuronów w strefie SGZ hipokampa u zwierząt niedojrzałych. Neonatalna hipoksja-ischemia wpływała również na proces oligodendrogenyzy. Szczególnie wrażliwe na HI były progenitory oligodendrocytów, których liczba drastycznie spada w hipokampie półkuli ipsilateralnej (uszkodzonej). Dojrzewanie oligodendrocytów wydaje się być zaburzone w mniejszym stopniu, na co wskazuje niezmienną ilość wytwarzanej po HI mieliny. Badania ultrastrukturalne wykazały jednak, że struktura wytworzonej osłonki mielinowej była nieprawidłowa, co niewątpliwie przyczynia się do zaburzonego funkcjonowania OUN.

Zastosowanie inhibitora deacetylaz histonu- maślanu sodu (SB) u szczurów po neonatalnej HI miało efekt neuroprotekcyny/neurogeny. Neuroprotekcyjne działanie SB wyrażone było zmniejszeniem uszkodzenia półkuli ipsilateralnej u zwierząt eksperymentalnych. Działanie neurogenne tego inhibitora związane było ze zwiększeniem liczby neuroblastów w obu badanych strefach neurogennych oraz progenitorów oligodendrocytów w strefie SGZ hipokampa półkuli uszkodzonej. Niestety zastosowanie maślanu sodu nie zwiększało liczby nowopowstałych, dojrzałych komórek ziarnistych w strefie podziarnistej hipokampa w półkuli ipsilateralnej po HI, co może wskazywać, że SB w badanym przez nas modelu nie prowadzi do całkowitej repopulacji uszkodzonych komórek nerwowych. Maślan sodu stymulował powstawanie neuronów o fenotypie dojrzałym wyłącznie w rejonie SVZ półkuli ipsilateralnej. Pobudzenie procesu neurogenezy po zastosowaniu SB u zwierząt po hipoksji-ischemii prawdopodobnie związane było ze zwiększoną ekspresją czynnika wzrostu - BDNF oraz aktywacją jego receptora - TrkB.

Otrzymane wyniki badań wykazały także aktywację komórek mikrogleju w półkuli ipsilateralnej zwierząt po hipoksji-ischemii. Zastosowanie maślanu sodu w zależności od czasu jaki upłynął od indukcji niedokrwienia/niedotlenienia powodowało wzrost (6 dni po HI) lub też znaczne zmniejszenie (14 dni po HI) liczby komórek aktywnego mikrogleju. U wszystkich badanych zwierząt, niezależnie od punktu czasowego po HI, podanie SB stymulowało polaryzację mikrogleju w kierunku fenotypu M2, który związany jest z wyciszeniem reakcji zapalnej i procesami naprawczymi tkanki. Po zastosowaniu SB obniżeniu ulegały także poziomy prozapalnej IL-1 β i chemokiny CXCL10 oraz COX-2, jak również czynnika transkrypcyjnego NF κ B, odpowiedzialnego za ekspresję wielu interleukin prozapalnych. Można więc przypuszczać, że neuroprotektoryjne działanie SB jest związane z redukcją odpowiedzi zapalnej, poprzez obniżenie ekspresji markerów specyficznych dla fenotypu M1 i zwiększenie liczebności komórek o fenotypie M2.

Chciałam podkreślić, że publikacje zawierające przedstawione przeze mnie wyniki zostały wyróżnione Nagrodami Dyrektora IMDiK (poz. 2 i 3), a także zaowocowały uzyskaniem Zespołowej Nagrody Wydziału V Polskiej Akademii Nauk w roku 2018 (poz. 2, 3, 4).

Literatura

1. Alvarez-Buylla A and Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2002;22, 629–634.
2. Arias-Carrión O, Freundlieb N, Oertel WH, Höglinger GU Adult neurogenesis and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2007 Oct;6(5):326-35.
3. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 2002; 8, 963–970.
4. Aung H.T., Schroder K., Himes S.R., Brion K., van Zuylen W., Trieu A., Suzuki H., Hayashizaki Y., Hume D.A., Sweet M.J., et al. LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. *FASEB J.* 2006;20:1315–1327. doi: 10.1096/fj.05-5360com.
5. Barnabé-Heider F, Miller FD Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci.* 2003;23:5149–5160.
6. Bartley J, Soltan T, Wimborne H, Kim S, Martin-Studdard A, Hess D, Hill W, Waller J, Carroll J. BrdU-positive cells in the neonatal mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury. *BMC Neurosci.* 2005;6, 15.
7. Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 2000 Sep 8;291(1):17-20.
8. Buser JR, Maire J, Riddle A, Gong X, Nguyen T, Nelson K, Luo NL, Ren J, Struve J, Sherman LS, Miller SP, Chau V, Hendson G, Ballabh P, Grafte MR, Back SA. Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. *Ann Neurol.* 2012 Jan;71(1):93-109. doi: 10.1002/ana.22627.
9. Calvert JW, Zhang JH. Pathophysiology of an hypoxic-ischemic insult during the perinatal period. *Neurol Res.* 2005; 27(3):246–60.

10. Chang, YC, Tzeng SF, Yu L, Huang AM, Lee HT, Huang CC, Ho CJ. Early-life fluoxetine exposure reduced functional deficits after hypoxic-ischemia brain injury in rat pups. *Neurobiol. Dis.* 2006;24, 101–113.
11. Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx.* 2004 Jan;1(1):36-45.
12. Covic M, Karaca E, Lie DC. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Heredity (Edinb).* 2010 Jul;105(1):122-34. doi: 10.1038/hdy.2010.27.
13. Cuaycong M, Engel M, Weinstein SL, Salmon E, Perlman JM, Sunderam S, Vannucci SJ. A novel approach to the study of hypoxia-ischemia-induced clinical and subclinical seizures in the neonatal rat. *Dev Neurosci.* 2011, 33: 241-50.
14. Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(2):476-88.
15. Dąbska M. Uszkodzenia przed i okołoporodowe układu nerwowego. *Neuropatologia kliniczna. Red. J. Dymecki i J. Kulczycki, Instytut Psychiatrii i Neurologii. Warszawa, 1990 pp.49-51.*
16. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003;13, 543–550.
17. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology.* 2008 Sep;55(3):310-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.
18. Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol.* 2005 Apr;75(5):321-41.
19. Fan L-W, Pang Y, Lin S, Tien LT, Ma T, Rhodes PG, Cai Z. Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *J Neurosci Res.* 2005;82:71–82. doi.org/10.1002/jnr.20623.
20. Fang J., Lian Y., Xie K., Cai S., Wen P. Epigenetic modulation of neuronal apoptosis and cognitive functions in sepsis-associated encephalopathy. *Neurol. Sci.* 2014;35:283–288. doi: 10.1007/s10072-013-1508-4.
21. Faraco G, Pancani T, Formentini L, et al. Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol Pharmacol.* 2006;70:1876–1884. doi: 10.1124/mol.106.027912.
22. Faustino JV, Wang X, Johnson CE, Klibanov A, Derugin N, Wendland MF, et al. Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2011; 31(36):12992–3001.
23. Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med.* 2004; 351(19):1985–95.
24. Flodmark O, Barcovich AJ. Imaging of the infant brain. In: *The newborn brain. Red. Lagercranz H., Hanson M., Evrard P., Rodeck C. Cambridge University Press, 2002, 289–316.*
25. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287, 1433–1438.
26. Gilland E, Hagberg H. NMDA Receptor-dependent increase of cerebral glucose utilization after hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Sep;16(5):1005-13.
27. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* 2005; 363:15-23.
28. Gluckman P, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, Polin, RA, Robertson CM, Thorese M, Whitelaw A, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* 2005;365, 663–670.
29. Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev.* 2011 Jun 24;67(1-2):147-56. doi: 10.1016/j.brainresrev.2011.01.001.
30. Gräff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai L-H. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev.* 2011;91:603–649. doi: 10.1152/physrev.00012.2010.
31. Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl.* 1997 Jul;422:85-8.

32. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, Gressens P. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11(4):192-208.
33. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11(4):192-208.
34. Hayashi T, Iwai M, Ikeda T, et al. Neural precursor cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury. *Brain Res*. 2005;1038:41-49. doi: 10.1016/j.brainres.2004.12.048.
35. Hellström-Westas L, Rosén I, Svenningsen NW. Predictive value of early continuous amplitude integrated EEG recordings on outcome after severe birth asphyxia in full term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1995 Jan;72(1):F34-8.
36. Hnatyszyn G. Przydatność tomografi i rezonansu magnetycznego głowy w diagnostyce zmian niedotlenieniowo-niedokrwiennych u noworodków. *Neurologia Dziecięca* 2007; 31(16), 7-12.
37. Horner PJ, Thallmair M, Gage FH. Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS. *J Neurocytol*. 2002 Jul-Aug;31(6-7):469-80.
38. Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11(1):56-64.
39. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2012; 43(11):3063-70.
40. Ikeda T, Iwai M, Hayashi T, Nagano I, Shogi M, Ikenoue T, Abe K. Limited differentiation to neurons and astroglia from neural stem cells in the cortex and striatum after ischemia/hypoxia in the neonatal rat brain. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2005;193, 849-856.
41. Janowska J, Ziemka-Nalecz M, Sypecka J. The Differentiation of Rat Oligodendroglial Cells Is Highly Influenced by the Oxygen Tension: In Vitro Model Mimicking Physiologically Normoxic Conditions. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 24;19(2). pii: E331. doi: 10.3390/ijms19020331.
42. Ji M.-H., Li G.-M., Jia M., Zhu S.-H., Gao D.-P., Fan Y.-X., Wu J., Yang J.-J. Valproic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Inflammation*. 2013;36:1453-1459. doi: 10.1007/s10753-013-9686-z.
43. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999;96(1):25-34.
44. Kadam SD, Mulholland JD, McDonald JW, Comi AM. Neurogenesis and neuronal commitment following ischemia in a new mouse model for neonatal stroke. *Brain Res*. 2008;1208:35-45. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.037.
45. Keirstead HS, Levine JM, Blakemore WF. Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia*. 1998 Feb;22(2):161-70.
46. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*. 2004;27, 447-452.
47. Kim HJ, Leeds P, Chuang DM. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *J Neurochem*. 2009;110(4):1226-40.
48. Kim HJ, Rowe M, Ren M, Hong J-S, Chen P-S, Chuang D-M. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2007; 321:892-901.
49. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 1996;16, 2027-2033.
50. Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*. 2007; 27(10):2596-605.
51. Lapin IP, Oxenkrug GF. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet*. 1969 Jan 18;1(7586):132-6.
52. Lawn, J. E., Cousens, S., Zupan, J., and Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet*; 2005 365, 891-900.
53. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol*. 1960;36:1-17.

54. Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:399-421.
55. Łosiowski Z. Uszkodzenia układu nerwowego związane z patologią okresu płodowego i okołoporodowego. *Neurologia dziecięca. Red. Czochrańska J. PZWL* 1990, pp. 326-332.
56. Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Baron-Van Evercooren A. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci.* 1999 Dec;11(12):4357-66.
57. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110, 429–441.
58. Northington FJ, Ferriero DM, Martin LJ Neurodegeneration in the thalamus following neonatal hypoxiaischemia is programmed cell death. *Dev Neurosci.* 2001;23:186–191. doi.org/10.1159/000046141.
59. Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. *Pediatr Res.* 2005;58:600–606. doi: 10.1203/01.PDR.0000179381.86809.02.
60. Parent JM, Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 2003; 9, 261–272.
61. Petreanu L, Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci.* 2002 Jul 15;22(14):6106-13.
62. Plane JM, Liu R, Wang T-W, et al. Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse. *Neurobiol Dis.* 2004;16:585–595. doi: 10.1016/j.nbd.2004.04.003
63. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1981;9:131–141. doi: 10.1002/ana.410090206.
64. Sairanen M Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 2005;25:1089–1094. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3741-04.2005.
65. Sameshima H, Ikenoue T. Hypoxic-ischemic neonatal encephalopathy: animal experiments for neuroprotective therapies. *Stroke Res Treat.* 2013;2013:659374. doi: 10.1155/2013/659374.
66. Simon C, Götz M, Dimou L. Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia.* 2011 Jun;59(6):869-81. doi: 10.1002/glia.21156.
67. Sinn D-I, Kim S-J, Chu K, et al. Valproic acid-mediated neuroprotection in intracerebral hemorrhage via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation. *Neurobiol Dis.* 2007;26:464–472. doi: 10.1016/j.nbd.2007.02.006.
68. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16(5):249–63.
69. Steckert A.V., Comim C.M., Igna D.M.D., Domingui D., Mendonça B.P., Ornell F., Colpo G.D., Gubert C., Kapczinski F., Barichello T., et al. Effects of sodium butyrate on aversive memory in rats submitted to sepsis. *Neurosci. Lett.* 2015;595:134–138. doi: 10.1016/j.neulet.2015.04.019.
70. Sypecka J, Dragun-Szymczak P, Zalewska T, Domańska-Janik K. Laminin promotes oligogliogenesis and increases MMPs activity in human neural stem cells of HUCB-NSC line. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2009;69(1):37-45.
71. Szejniuk W, Szymankiewicz M. Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienne u noworodków. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia,* 2008; 1(2), 85-93.
72. Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke.* 2009; 40(3 Suppl):S8-12.
73. Thornton C, Leaw B, Mallard C, Nair S, Jinnai M, Hagberg H. Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Front Cell Neurosci.* 2017; 11:248. doi: 10.3389/fncel.2017.00248. eCollection 2017.

74. Thornton C, Rousset CI, Kichev A, Miyakuni Y, Vontell R, Baburamani AA, Fleiss B, Gressens P, Hagberg H. Molecular mechanisms of neonatal brain injury. *Neurol Res Int.* 2012; 2012:506320. doi: 10.1155/2012/506320.
75. Triulzi F, Baldoli C, Righhini A. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. In: *Pediatric Neuroradiology.* Brain. Red. Tortori-Donati P., Rossi A., Biancheri R., Springer, Berlin-Heidelberg 2005, 234–255.
76. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature.* 2002 Feb 28;415(6875):1030-4.
77. Wang G, Shi Y, Jiang X, Leak RK, Hu X, Wu Y, Pu H, Li WW, Tang B, Wang Y, Gao Y, Zheng P, Bennett MV, Chen J. HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3 β /PTEN/Akt axis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(9):2853-8.
78. Wójcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, Ziemka-Nalecz M, Khrestchatsky M, Rivera S, Zalewska T. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS One.* 2011;6(7):e22465. doi: 10.1371/journal.pone.0022465.
79. Yam PS, Dewar D, McCulloch J Axonal injury caused by focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurotrauma* 1998;15:441–450.doi.org/10.1089/neu.1998.15.441.
80. Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 2001;21(24):9814-9823.
81. Yamashita T, Ninomiya M, Acosta PH, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi, M., Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, et al. Subventricular Zone-Derived Neuroblasts Migrate and Differentiate into Mature Neurons in the Post-Stroke Adult Striatum. *J. Neurosci.* 2006; 26, 6627–6636.
82. Yang Z, Levison SW. Perinatal hypoxic/ischemic brain injury induces persistent production of striatal neurons from subventricular zone progenitors. *Dev. Neurosci.* 2007;29, 331–340.
83. Yang Z, Levison SW. Hypoxia/ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone. *Neuroscience.* 2006;139:555–564. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.059.
84. Younkin DP. Hypoxic-ischemic brain injury of the newborn--statement of the problem and overview. *Brain Pathol.* 1992;2(3):209-10.
85. Zhang RL, Zhang ZG, Zhang, L, Chopp M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2001;105, 33–41.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Po ukończeniu studiów na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, rozpoczęłam pracę w Pracowni Neuropatologii Molekularnej Zakładu Neurochemii w IMDiK PAN na stanowisku asystenta. W roku 2002 Pracownia ta została przekształcona w Zakład Neurobiologii Naprawczej. Na początku mojej pracy naukowej zostałam włączona w nurt badań nad rolą kinazy białkowej C (PKC) w śmierci komórek nerwowych w hipokampie po krótkotrwałym, całkowitym niedokrwieniu przodomózgowia u chomika mongolskiego. Przeanalizowałam zmiany różnych izoform PKC w dwóch fragmentach hipokampa: wrażliwej na niedokrwienie części grzbietowej zawierającej rejon CA1, oraz odpornym na niedokrwienie fragmencie brzuszynym, w którym znajduje się zakręt

zębaty. Niedokrwienie skutkowało spadkiem poziomu izoform alfa, beta, gamma i delta kinazy PKC wyłącznie w części grzbietowej hipokampa. Obniżeniu poziomu PKC towarzyszyła przejściowa aktywacja wapniowo zależnych enzymów proteolitycznych - kalpain, a także degradacja białek takich jak fodryna i MAP-2, które są klasycznymi substratami kalpain (Ziemka-Nałęcz i wsp. 2003).

W dalszym etapie mojej pracy w IMDiK wiodącym zagadnieniem była regulacja procesu przekazywania sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM), w modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu. Wyniki badań *in vitro*, prowadzone wcześniej przez innych badaczy jednoznacznie wskazywały, że do przeżycia komórki niezbędna jest jej integracja z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Zaburzenie prawidłowych interakcji na linii komórka-macierz skutkuje śmiercią komórki na drodze apoptozy, w tym przypadku określanej mianem *anoikis*. Skłoniło nas to do zweryfikowania hipotezy, że w rejonie mózgu, w którym występuje opóźniona poischemiczna śmierć neuronów, dochodzi do utraty kontaktu komórki z macierzą zewnątrzkomórkową i w konsekwencji do modulacji przekazywanego do komórki sygnału z ECM. W początkowym etapie badań nad tym zagadnieniem określiłam wpływ 5-minutowego, przejściowego niedokrwienia przedomózgowia myszokoczka mongolskiego na lokalizację i aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych – metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9). Metaloproteinaza 2 jest enzymem produkowanym przez komórkę konstytutywnie, natomiast synteza i aktywacja metaloproteinazy 9 następuje w odpowiedzi na czynniki stresogenne. MMP-2 i MMP-9 należą do głównych enzymów zewnątrzkomórkowych proteolizujących komponenty ECM oraz liczne molekuly obecne na powierzchni komórek. Uczestniczą one w wielu procesach fizjologicznych min. w procesie angiogenezy, neurogenezy czy też apoptozie, ale także zaangażowane w patogenezę wielu schorzeń. Znaczącą aktywację metaloproteinaz w tkance nerwowej obserwowano między innymi w patologii niedokrwiennej mózgu i rdzenia, w przewlekłych chorobach zwyrodnieniowych – w chorobie Alzheimera i w stwardnieniu rozsianym (SM), arteriosklerozie oraz w chorobach nowotworowych. Otrzymane przez nas wyniki wykazały, że wzrost aktywności MMP-9 w hipokampie po niedokrwieniu korelował czasowo i przestrzennie z degradacją białka macierzy zewnątrzkomórkowej - lamininy oraz ze śmiercią neuronów piramidowych w rejonie CA1 (Ziemka-Nałęcz i wsp. 2002). Na podstawie powyższych obserwacji założyłam, że aktywacja MMP-9 oraz degradacja lamininy może powodować zaburzenie interakcji komórek z macierzą zewnątrzkomórkową, co może prowadzić do zmiany przekaźnictwa komórkowego w kierunku zahamowania szlaków sygnałowych promujących przeżycie komórki lub

aktywacji ścieżek sygnałowych prowadzących do śmierci komórek nerwowych. Dlatego też w dalszym etapie badań określiłam poziom oraz aktywność białek sygnałowych związanych z integrynowym szlakiem sygnałowym. Wiązaniu ligandów macierzy do zewnątrzkomórkowych domen integryn towarzyszy aktywacja niereceptorowych tyrozynowych kinaz białkowych, m.in kinazy FAK (ang. Focal adhesion kinase) oraz PYK-2 (ang. proline-rich tyrosine kinase). Reakcją o kluczowym znaczeniu jest autofosforylacja reszt tyrozynowych obu kinaz: tyrozyny 397 kinazy FAK oraz tyrozyny 402 kinazy PYK-2, co prowadzi do ich aktywacji. Sygnały z macierzy zewnątrzkomórkowej są następnie przekazywane na dalsze etapy w kaskadzie fosforylacji określonych substratów (białek adaptorowych i cytoszkieletowych), co w konsekwencji prowadzi do aktywacji szlaku kinaz MAP, w tym pro-życiowej kinazy ERK, a także ścieżki sygnałowej PI3K/Akt. W toku prowadzonych badań wykazałam, że w wyniku niedokrwienia przedomózgowia myszoscoczka dochodzi do zahamowania aktywności/fosforylacji wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej – FAK już na etapie autofosforylacji po upływie 24 godzin po przywróceniu krążenia. Konsekwencją tego procesu jest równoległe obniżenie asocjacji kinazy FAK z kinazą Src, reakcji koniecznej dla maksymalnej aktywności kinazy FAK. Obserwowałam także jednoczesne obniżenie ekspresji białek FAK i Src, co sugeruje, że obok procesu fosforylacji proteoliza wydaje się odgrywać znaczącą rolę w regulacji aktywności kinaz tyrozynowych po niedokrwieniu. Ischemia nie wpływała natomiast na wiązanie kinazy FAK z białkiem adaptorowym p130Cas, co wskazuje na to, że kompleks FAK/p130Cas nie odgrywa istotnej roli w ewolucji zmian poniedokrwiennych. Interesującą i oryginalną obserwacją jest fakt, że profil czasowy obniżenia aktywności kinazy FAK koreluje z aktywacją metaloproteinaz. Na tej podstawie można postulować, że proteoliza białek ECM osłabia interakcję komórek z macierzą i zaburza przekazywanie sygnału za pośrednictwem kinazy FAK, co może prowadzić do opóźnionej, poischemicznej śmierci neuronów w rejonie CA1 hipokampa (Zalewska i wsp. 2003, Ziemka-Nałęcz i wsp. 2007). Wykonanie tych badań było możliwe dzięki otrzymaniu przeze mnie grantu promotorskiego finansowanego przez Komitet Badań Naukowych, a uzyskane wyniki były podstawą mojej rozprawy doktorskiej pt. ”Wpływ niedokrwienia i reperfuzji na przekaźnictwo sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej w hipokampie mózgu myszoscoczka mongolskiego”, która została wyróżniona przez Radę Naukową IMDiK.

W trakcie badań nad aktywacją metaloproteinaz po niedokrwieniu mózgu dwukrotnie byłam na stypendium w Centre Nationale la Recherche Scientifique (CNRS), Faculte de Medicine Nord, Université de la Méditerranée w Marsylii (Francja), gdzie poznałam technikę

zymografii *in situ* umożliwiającą ocenę aktywności MMP-9 i MMP-2 w tkance, a także opracowałam protokoły podwójnych barwień immunohistochemicznych na skrawkach mózgu myszokoczka mongolskiego. Wyjazd ten zaowocował dłuższą współpracą pomiędzy dr Santiago Riverą z CNSR w Marsylii oraz Zakładem Neurobiologii Naprawczej.

Pozostałe kierunki badań, w które byłam zaangażowana przed uzyskaniem stopnia doktora dotyczyły analizy aktywności kinaz FAK, jej homologa - kinazy PYK-2 oraz Src w gęstościach postsynaptycznych błony komórkowej neuronów izolowanych z hipokampa mózgu myszokoczka mongolskiego po krótkotrwałym (5-minutowym) i długotrwałym (30 minutowym) niedokrwieniu. Wyniki wykazały wzmożoną interakcję podjednostki NR2B receptora NMDA z badanymi kinazami oraz białkiem PSD-95, a także wzrost fosforylacji tego receptora. Wczesna rekrutacja kinaz do receptora NMDA w przypadku niedokrwienia krótkotrwałego jest zgodna z przemodelowaniem gęstości postsynaptycznych i może uczestniczyć w indukcji ścieżki sygnałowej związanej z kinazami FAK, PYK-2 i Src w hipokampie. W przypadku ischemii długotrwałej obserwowaliśmy zupełnie inny schemat odpowiedzi. W tym przypadku następowało obniżenie zarówno poziomu białka jak i stopnia fosforylacji NMDA. Notowaliśmy także osłabienie interakcji tego receptora z badanymi kinazami oraz białkiem PSD-95. Konsekwencją tych zmian było zahamowanie przekaźnictwa sygnału zależnego od kinazy FAK/PYK2 w hipokampie (Zalewska i wsp. 2005b). Ponadto brałam udział w badaniach dotyczących szlaku sygnałowego kinazy FAK w modelu asfiksji okołoporodowej u szczurów. Uzyskane wyniki wskazują na zahamowanie tej ścieżki przekaźnictwa po niedokrwieniu/niedotlenieniu w niedojrzałym mózgu, co manifestowało się obniżeniem aktywności/fosforylacji kinazy FAK, a także spadkiem interakcji tego białka z kinazą Src oraz białkiem p130Cas (Zalewska i wsp. 2005a).

Uczestniczyłam także w badaniach nad rolą 1-metyl-nikotynamidu (MNA) w modulacji aktywności metaloproteinaz w uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym indukowanym u 7-dniowych osesków szczurzych. Uzyskane wyniki sugerują prawdopodobne działanie terapeutyczne tego związku. Można przypuszczać, że z odpowiedzią neuroprotekcijną nikotynamidu jest związana aktywacja metaloproteinazy 2 (Dragun i wsp. 2008). Praca, w której zostały opublikowane wyniki badań, została wyróżniona Nagrodą Dyrektora IMDiK PAN.

Po obronie doktoratu oraz przerwie w pracy naukowej spowodowanej urlopem wychowawczym, kontynuowałam badania nad aktywnością metaloproteinaz po ischemicznym uszkodzeniu mózgu. W tym czasie podjęłam współpracę z Zakładem Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej (aktualnie jest to Pracownia Neuroplastyczności)

w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN. W ramach tej współpracy prowadziłam badania, które miały na celu porównanie aktywności żelatynaz (MMP-2 i MMP-9) w mózgu myszy młodych i starych po niedokrwieniu ogniskowym. Ischemię ogniskową fotochemiczną wywołano wiązką światła o średnicy 1,5 mm i dł. fali 560nm, po iniekcji do żyły ogonowej fotoczułego barwnika, a aktywność metaloproteinaz oznaczano w trzech obszarach kory mózgowej: rdzeniu udaru, w strefie okołordzeniowej (penumbrze) i tzw. obszarze dalekim. Kontrolę stanowiły podobne części tkanki pobrane z półkuli kontralateralnej. Wzrost aktywności żelatynaz obserwowaliśmy wyłącznie w tkance pobranej z półkuli uszkodzonej. W obszarze rdzenia udaru aktywność MMP-9 rosła najszybciej (4 godziny po wywołaniu niedokrwienia), natomiast w strefie okołordzeniowej wzrost aktywności tego enzymu następował później, po 24 godzinach. W obszarze kory mózgu oddalonym od ogniska uszkodzenia nie dochodziło do aktywacji MMP-9. Nie notowaliśmy także żadnych różnic w aktywności metaloproteinaz pomiędzy zwierzętami młodymi i starymi. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że poischemiczna degradacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej, za którą odpowiedzialna jest głównie MMP-9 nie jest bezpośrednio związana z cięższym przebiegiem choroby jaki obserwuje się u osobników starszych (Liguz-Lęczar i wsp. 2012). Ponadto, w ramach współpracy z Instytutem Biologii Doświadczalnej PAN, brałam udział w badaniach dotyczących zaangażowania metaloproteinaz w procesy plastyczności synaptycznej. W toku badań wykazaliśmy, że wzrost aktywności MMP-9 w korze mózgowej zlokalizowanej w pobliżu rdzenia udaru koreluje czasowo i przestrzennie z obniżeniem neuroplastyczności. Dożylna iniekcja inhibitora metaloproteinaz - FN-439, bezpośrednio przez wywołaniem ischemii ogniskowej, skutkowałą zachowaniem zdolności do tworzenia nowych połączeń synaptycznych w tkance (Cybulska-Klosowicz i wsp. 2011).

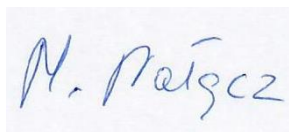
Równocześnie zainteresowałam się tematyką neurogenezy. W IMDiK PAN zostałam włączona w prowadzenie badań dotyczących roli sygnału zewnątrzkomórkowego w procesie neurogenezy w hipokampie w modelu przejściowego niedokrwienia przedomózgowia myszokoczka mongolskiego. Otrzymane wyniki wykazały różnice w dynamice proliferacji neuralnych komórek macierzystych w dwóch badanych strukturach hipokampa: w zakręcie zębatym (DG) oraz strefie CA1. W niewrażliwym na krótkotrwałe niedokrwienie, neurogennym DG, obserwowaliśmy znaczącą stymulację proliferacji komórek progenitorowych oraz ich różnicowanie w kierunku neuronów. We wrażliwej na ischemię strefie CA1 również obserwowaliśmy zwiększoną ilość neuroblastów, jednak komórki te nie przechodziły na dalsze etapy rozwoju. Otrzymane w tej części badań wyniki wskazują na brak

możliwości zastąpienia uszkodzonych neuronów w strefie CA1 na drodze endogennej repopulacji komórek nerwowych. Ponadto wykazaliśmy, że zwiększona aktywność metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9), korelowała czasowo i przestrzennie ze stymulacją procesów proliferacji i różnicowania komórek w DG, podczas gdy w rejonie CA1 aktywność badanych enzymów nie różniła się od poziomu kontrolnego. Wyniki te wskazują na zaangażowanie metaloproteinaz w proces neurogenezy (Wójcik-Stanaszek i wsp. 2011), a publikacja opisująca nasze nowatorskie badania została wyróżniona Nagrodą Dyrektora IMDiK PAN.

Uczestniczyłam także, w ramach realizacji grantu MNSW, w badaniach prowadzonych we współpracy z Zakładem Biochemii Mózgu z Instytutu Farmakologii PAN, nad wpływem związku antydepresyjnego- imipraminy na szlak sygnałowy związany z kinazą FAK oraz jej homologiem kinazą PYK-2. Imipramina należy do grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, które nioselektywnie hamują wychwyty zwrotne noradrenaliny i serotoniny, a dodatkowo wpływają na kanały sodowe i liczne receptory. Wykazano, że podczas depresji zaburzeniu ulega proces synaptogenezy. Zastosowanie antydepresantów w leczeniu depresji stymuluje powstawanie nowych połączeń synaptycznych w mózgu. W latach 60 ubiegłego wieku dowiedziono, że leczenie imipraminą prowadzi do zwiększenia poziomu receptorów 5-HT, należących do grupy receptorów związanych z białkami G (ang. G-protein-coupled receptors, GPCR). (Lapin i Oxenkrug, 1969). Jednakże, nie można wykluczyć także udziału innych ścieżek sygnałowych, w tym szlaku związanego z kinazą FAK/PYK-2, w antydepresyjnym mechanizmie działania imipraminy. W toku prowadzonych badań wykazaliśmy, że badane kinazy charakteryzują się różną odpowiedzią na zastosowaną imipraminę. Obserwowaliśmy spadek poziomu oraz fosforylacji/aktywności kinazy FAK, przy równoczesnym wzroście aktywności kinazy PYK-2. Badania asocjacji kinaz z białkami Src i p130Cas, które są elementami sygnałowymi na dalszych etapach tego szlaku, wykazały wzmocnienie przekaźnictwa poprzez ścieżkę związaną ze kinazą PYK-2, oraz osłabienie sygnału poprzez kinazę FAK. Wyniki tych nowatorskich badań wykazały, że stymulacja szlaku sygnałowego kinazy PYK-2 może być jednym z nieznanych dotąd mechanizmów działania imipraminy (Zalewska i wsp. 2016). Jednocześnie w IMDiK prowadziłam badania dotyczące zmian aktywności/fofosorylacji poszczególnych kinaz związanych transdukcją sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w skrawkach hipokampa poddanych procedurze czasowego ograniczenia dostępu tlenu i glukozy (OGD). Uzyskane przeze mnie wyniki jednoznacznie wskazują, że OGD obniża aktywność/fosorylację kinaz FAK i PYK-2 zarówno w części grzbietowej jak i brzusznej hipokampa. Co więcej obserwowałam także spadek

stopnia ufosforylowania kinazy Src, która jest aktywatorem kinazy FAK. Wyniki te potwierdzają, że niedotlenienie skrawków organotypowych pozyskanych z niedojrzałego mózgu powoduje osłabienie interakcji komórki z białkami ECM, co skutkuje zaburzeniem przekazywania sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej (Ziemka-Nałęcz i wsp. 2015).

W trakcie pracy w IMDiK PAN uzyskałam dwa granty na prowadzone badania, w których byłam kierownikiem. W pięciu kolejnych projektach byłam głównym wykonawcą. Efektem mojej pracy naukowej jest 26 publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym IF = 82,534 oraz 53 doniesienia zjazdowe, prezentowane na krajowych i międzynarodowych zjazdach i sympozjach naukowych. Szczegółowe informacje o dorobku naukowym, dydaktycznym, współpracy z instytucjami i towarzystwami naukowymi zawarte są w Załączniku nr 3.

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature appears to be 'M. Nałęcz'.