

mgr inż. Karolina Ziąbska-Pacześ

Wpływ inhibitora deacetylaz histonów – maślanu sodu – na aktywność układu dopełniacza w modelu okołoporodowego hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu u szczura

Rozprawa na stopień naukowy doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. Małgorzata Nałęcz



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2025

Finansowanie badań

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie były współfinansowane w ramach następujących projektów:

1. Grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2017/27/B/NZ3/00582 (OPUS14, NCN);
2. Grantu statutowego nr 6 (IMDiK PAN);
3. Projektu nr POWR.03.02.00-00-I028/17-00 realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków ESF.

Publikacje

Część wyników niniejszej rozprawy została opublikowana w postaci pracy oryginalnej w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

1. **Ziabska, K.**, Gewartowska, M., Frontczak-Baniewicz, M., Sypecka, J., & Ziemka-Nalecz, M. (2025). The Impact of the Histone Deacetylase Inhibitor-Sodium Butyrate on Complement-Mediated Synapse Loss in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Molecular Neurobiology*, 1-18. 10.1007/s12035-024-04591-w.

Spis treści

Wykaz skrótów	9
Streszczenie	17
Summary	21
Innowacyjność rozprawy	25
1. Wstęp.....	27
1.1. Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna	27
1.1.1. Definicja i skutki encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennnej	27
1.1.2. Przyczyny encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennnej	28
1.1.3. Mechanizm molekularny encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennnej	29
1.2. Rozwój reakcji zapalnej w encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennnej	32
1.2.1. Komórki glejowe	32
1.2.1.1. Mikroglej	32
1.2.1.1.1. Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe zaangażowane w aktywację mikrogleju ..	35
1.2.2. Układ dopełniacza	36
1.2.2.1. Rola układu dopełniacza w asfiksji okołoporodowej.....	38
1.3. Metody leczenia encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennnej.....	41
1.4. Modyfikacje epigenetyczne	44
1.4.1. Organizacja chromatyny w jądrze komórkowym.....	44
1.4.2. Deacetylazy histonów.....	45
1.4.3. Inhibitory deacetylaz histonów.....	46
1.4.3.1. Działanie neuroprotektoryjne inhibitorów deacetylaz histonów	47
2. Założenia i cele pracy.....	53
3. Materiały i metody	55
3.1. Modele badawcze	55
3.1.1. Model okołoporodowego niedotlenieniowo-niedokrwiennego uszkodzenia mózgu <i>in vivo</i>	55
3.1.1.1. Stymulacja farmakologiczna	56
3.1.1.2. Przygotowanie tkanki mózgu do dalszych analiz.....	57
3.1.2. Izolacja i współhodowla pierwotnych komórek mikrogleju i pierwotnych neuronów korowych – model <i>in vitro</i>	58
3.1.2.1. Procedura kontrolowanego deficytu tlenowo-glukozowego (OGD).....	59
3.1.3. Hodowla komórek mikrogleju linii BV2 – model <i>in vitro</i>	61
3.2. Barwienia immunohistochemiczne	62
3.3. Barwienia immunocytochemiczne	64
3.4. Wizualizacja mikroskopowa	66

3.5.	Analiza Sholla	66
3.6.	Oznaczanie poziomu mRNA genów metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym	67
3.7.	Analiza biochemiczna poziomu ekspresji białek metodą Western Blot.	71
3.8.	Analiza biochemiczna poziomu ekspresji białek za pomocą płytkowego testu immunoenzymatycznego – ELISA	74
3.9.	Cytometria przepływowa	75
3.10.	Transmisyjna mikroskopia elektronowa	76
3.11.	Badania behawioralne	77
3.12.	Analiza statystyczna	80
4.	Wyniki	81
4.1.	Model <i>in vivo</i>	81
4.1.1.	Ekspresja mRNA białek układu dopełniacza w mózgu po hipoksji-ischemii	81
4.1.2.	Ekspresja mRNA receptorów dla białek układu dopełniacza w mózgu po hipoksji-ischemii	83
4.1.3.	Aktywacja układu dopełniacza w uszkodzeniu mózgu wywołanym neonatalną HI	84
4.1.4.	Lokalizacja składników układu dopełniacza w mózgu po hipoksji-ischemii	86
4.1.5.	Degradacja białek synaptycznych wywołana neonatalną hipoksją-ischemią	89
4.1.6.	Architektura tkanki mózgu po neonatalnej hipoksji-ischemii	91
4.1.7.	Wpływ maślanu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze u zwierząt po HI	93
4.2.	Model <i>in vitro</i> – współhodowle neuronów i mikrogleju	94
4.2.1.	Ustalenie warunków hodowli pierwotnych neuronów korowych	94
4.2.2.	Wpływ maślanu sodu na aktywację mikrogleju, lokalizację białek dopełniacza oraz morfologię neuronów po procedurze OGD	97
4.2.3.	Wpływ maślanu sodu na morfologię neuronów po procedurze OGD – analiza Sholla	99
4.3.	Model <i>in vitro</i> - linia BV2 mikrogleju	108
4.3.1.	Wpływ maślanu sodu na ekspresję wybranych genów mikrogleju po procedurze OGD	108
4.3.2.	Wpływ maślanu sodu na polaryzację mikrogleju po procedurze OGD	110
4.3.3.	Wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe po procedurze OGD – analizy Western Blot	118
4.3.4.	Wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe po procedurze OGD – testy ELISA	120
5.	Dyskusja	123
5.1.	Wpływ maślanu sodu na aktywację układu dopełniacza w szczurzym modelu neonatalnej hipoksji-ischemii	123

5.2.	Wpływ maślanu sodu na utratę synaps w szczurzym modelu neonatalnej hipoksji-ischemii.....	128
5.3.	Wpływ maślanu sodu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze po neonatalnej hipoksji-ischemii.....	130
5.4.	Wpływ maślanu sodu na aktywację układu dopełniacza w szczurzym modelu <i>in vitro</i> neonatalnej hipoksji-ischemii.....	131
5.5.	Wpływ maślanu sodu na ochronę neuronów w szczurzym modelu <i>in vitro</i> neonatalnej hipoksji-ischemii	132
5.6.	Wpływ maślanu sodu na stan zapalny i polaryzację mikrogleju w modelu <i>in vitro</i> neonatalnej hipoksji-ischemii.....	133
5.7.	Wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe aktywowane w mikrogleju w modelu <i>in vitro</i> neonatalnej hipoksji-ischemii	138
6.	Podsumowanie i wnioski	143
	Bibliografia.....	147

Wykaz skrótów

AAS	roztwór antybiotyku (z ang. <i>antibiotic antimycotic solution</i>)
<i>act</i>	gen kodujący β -aktynę, gen referencyjny
AIF	czynnik indukujący apoptozę (z ang. <i>apoptosis inducing factor</i>)
AKT	kinaza białkowa B, kinaza serynowo-treoninowa
AMPA	receptor 3-amino-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
ANOVA	analiza wariancji (z ang. <i>analysis of variance</i>)
APAF	czynnik indukujący apoptozę (z ang. <i>apoptotic protease activating factor</i>)
<i>arg</i>	gen kodujący arginazę (marker mikrogleju o fenotypie przeciwzapalnym M2)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (z ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
CCL2	ligand chemokinowy 2 z motywem C-C
CCL20	ligand chemokinowy 20 z motywem C-C
CD68	antygen różnicowania komórkowego 68 (z ang. <i>cluster of differentiation 68</i>) – jest białkiem silnie wyrażanym m.in. przez komórki aktywnego mikrogleju
CD86	antygen różnicowania komórkowego 86 (z ang. <i>cluster of differentiation 86</i>) – marker mikrogleju o prozapalnym fenotypie M1
CD200	antygen różnicowania komórkowego 200 (z ang. <i>cluster of differentiation 200</i>) – marker mikrogleju o przeciwzapalnym fenotypie M2
CD206	antygen różnicowania komórkowego 206 (z ang. <i>cluster of differentiation 206</i>) – marker mikrogleju o przeciwzapalnym fenotypie M2
cDNA	komplementarny DNA (z ang. <i>complementary DNA</i>)
CREB	białko wiążące element odpowiedzi c-AMP (z ang. <i>cyclic AMP response element-binding protein</i>)
CRP	białko C-reaktywne (ang. <i>C-reactive protein</i>)

CSF	płyn mózgowo rdzeniowy (z ang. <i>cerebrospinal fluid</i>)
CSF-1R	receptor czynnika stymulującego tworzenie kolonii 1 (z ang. <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>)
CHOP	nazwa czynnika transkrypcyjnego (z ang. <i>C/EBP homologous protein</i>)
COX-2	cyklooksygenaza 2
CVF	czynnik jadu kobry (z ang. <i>cobra venom factor</i>) – inhibitor dopełniacza
CX3CR1	receptor chemokinowy 1 z motywem C-X3-C
CXCL9	ligand chemokinowy 9 z motywem C-X-C
CXCL10	ligand chemokinowy 10 z motywem C-X-C
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (z ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DAMPs	endogenne struktury molekularne związane z uszkodzeniem tkanki (z ang. <i>endogenous damage-associated molecular patterns</i>)
DG	zakręt zębaty hipokampa (z ang. <i>dentate gyrus</i>)
DIV	dzień prowadzenia hodowli <i>in vitro</i> (z ang. <i>day in vitro</i>)
DMEM	pożywka do hodowli komórek (z ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
dNTPs	deoksynukleotydy
DS	suwrowica ośła (z ang. <i>donkey serum</i>)
EAE	model eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia
ED1	glikoproteina CD68 (patrz wyżej)
ELISA	immunoenzymatyczny test fazy stałej (z ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Elk-1	czynnik transkrypcyjny ETS podobny 1 (z ang. <i>ETS like-1</i>)
ENN	encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna
ERK	kinaza regulowana sygnałem pozakomórkowym (z ang. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ETS	rodzina czynników transkrypcyjnych specyficznych dla transformacji erytroblastów (z ang. <i>erythroblast transformation specific</i>)

FBS	płodowa surowica bydlęca (z ang. <i>fetal bovine serum</i>)
FGF	czynnik wzrostu fibroblastów (z ang. <i>fibroblast growth factor</i>)
FOXO	podklasa O czynnika transkrypcyjnego forkhead (z ang. <i>forkhead box O</i>)
FSC	rozproszenie światła na przednim detektorze optycznym (z ang. <i>forward scatter</i>)
FSC-A	obszar pików rozproszenia światła na przednim detektorze optycznym (z ang. <i>forward scatter-area</i>)
FSC-H	wysokość pików rozproszenia światła na przednim detektorze optycznym (z ang. <i>forward scatter-height</i>)
GDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia glejowego (z ang. <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>)
GFAP	białko filamentów pośrednich, marker astrocytów (z ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GSK3 β	kinaza syntazy glikogenu-3 β (z ang. <i>glycogen synthase kinase-3 β</i>)
HATs	acetylotransferazy histonów (z ang. <i>histone acetyltransferases</i>)
HBSS	zbalansowany roztwór soli Hank'a (z ang. <i>Hanks' balanced salt solution</i>)
HDACs	deacetylazy histonów (z ang. <i>histone deacetylases</i>)
HDACis	inhibitory deacetylaz histonów (z ang. <i>histone deacetylases inhibitors</i>)
HI	hipoksja-ischemia
HIE	encefalopatia hipoksyjno-ischemiczna (z ang. <i>hypoxic-ischemic encephalopathy</i>)
HIF-1 α	czynnik indukowany hipoksją (z ang. <i>hypoxia-inducible factor-1α</i>)
HSP60	nazwa białka szoku cieplnego (z ang. <i>heat shock protein 60 kilodalton</i>)
HSP70	nazwa białka szoku cieplnego (z ang. <i>heat shock protein 70 kilodalton</i>)
HSP90	nazwa białka szoku cieplnego (z ang. <i>heat shock protein 90 kilodalton</i>)

Iba1	marker mikrogleju/makrofagów (cząsteczka pośrednicząca w wiązaniu zjonizowanego wapnia-1, z ang. <i>ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i>)
IGF	insulinopodobny czynnik wzrostu (z ang. <i>insulin-like growth factor</i>)
IL-1 β	interleukina 1 β , prozapalna
IL-1 α	interleukina 1 α , prozapalna
IL-2	interleukina 2, prozapalna
IL-4	interleukina 4, przeciwzapalna
IL-6	interleukina 6, prozapalna
IL-10	interleukina 10, przeciwzapalna
IL-12	interleukina 12, prozapalna
IL-13	interleukina 13, przeciwzapalna
IL-18	interleukina 18, prozapalna
IL-23	interleukina 23, prozapalna
IL-1Ra	antagonista receptora interleukiny 1
IFN- β	interferon β , cytokina
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu (z ang. <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
JNK	N-końcowe kinazy c-Jun (z ang. <i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
Jun	nazwa czynnika transkrypcyjnego
LPS	lipopolisacharyd, składnik zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych
LTA	kwasy lipotejchojowe (z ang. <i>lipoteichoic acid</i>)
MAC	kompleks atakujący błonę (z ang. <i>membrane attack complex</i>)
MAP2	białko związane z mikrotubulami 2 (z ang. <i>microtubule-associated protein 2</i>)
MAPK	kinaza aktywowana mitogenami (z ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MASP	proteazy serynowe związane z MBL (ang. <i>MBL-associated serine protease</i>)
MBL	lektyna wiążąca mannozę (z ang. <i>mannose-binding lectin</i>)

MCAO	model ogniskowego niedokrwienia mózgu/okluzji tętnicy środkowej mózgu (z ang. <i>middle cerebral artery occlusion</i>)
MEK	kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (z ang. <i>mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)</i>)
MIP-2	białko zapalne makrofagów (z ang. <i>macrophage inflammatory protein-2</i>)
MMPs	metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (z ang. <i>matrix metalloproteinases</i>)
mNSS	zmodyfikowana skala nasilenia neurologicznego (ang. <i>modified neurological severity scores</i>)
MRI	rezonans magnetyczny (z ang. <i>magnetic resonance imaging</i>)
mRNA	informacyjny RNA (z ang. <i>messenger RNA</i>)
mTOR	kinaza ssaczego celu rapamycyny (z ang. <i>mammalian target of rapamycin kinase</i>)
NAD	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (z ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NMDAR	receptor N-metylo-D-asparaginowy
NF-κB	nazwa czynnika jądrowego (z ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NGF	czynnik wzrostu nerwów (z ang. <i>nerve growth factor</i>)
NGS	normalna surowica kozia (z ang. <i>normal goat serum</i>)
NO	tlenek azotu (z ang. <i>nitric oxide</i>)
NOS	syntaza tlenu azotu (z ang. <i>nitric oxide synthase</i>)
NRF2	nazwa czynnika transkrypcyjnego (z ang. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
OGD	deficyt tlenowo-glukozowy (z ang. <i>oxygen glucose deprivation</i>)
OD	gęstość optyczna (z ang. <i>optical density</i>)
OPCs	progenitory oligodendrocytów (z ang. <i>oligodendrocytes progenitor cells</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
P	określenie liczby dni po urodzeniu (z ang. <i>postnatal day</i>)
p38	klasa kinaz MAPK

p53	nazwa czynnika transkrypcyjnego o własnościach supresora nowotworowego
PAMPs	struktury molekularne, będące komponentami patogennych mikroorganizmów (z ang. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (z ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (z ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDL	roztwór poli-D-lizyny
PFA	paraformaldehyd
PI3K	kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (z ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PIP ₂	fosfatydyloinozytol-4,5-bisfosforan (z ang. <i>phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate</i>)
PIP ₃	fosfatydyloinozytol-3,4,5-trisfosforan (z ang. <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>)
PLL	roztwór poli-L-lizyny
pMCAO	model trwałej okluzji tętnicy środkowej mózgu (z ang. <i>permanent middle cerebral artery occlusion</i>)
PMR	płyn mózgowo rdzeniowy
PND	okołooperacyjne zaburzenia poznawcze (z ang. <i>perioperative neurocognitive disorders</i>)
PSD-95	białko gęstości postsynaptycznej 95 (z ang. <i>postsynaptic density protein 95</i>)
PTEN	homolog fosfatazy i tensyny; fosfataza lipidowa, która defosforyluje PIP ₃ do PIP ₂ (z ang. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy, łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (z ang. <i>quantitative PCR, real-time PCR</i>)
RI	stopień rozgałęzienia (z ang. <i>ramification index</i>)
RNA	kwasy rybonukleinowe (z ang. <i>ribonucleic acid</i>)

ROS	reaktywne formy tlenu (z ang. <i>reactive oxygen species</i>)
RNS	reaktywne formy azotu (z ang. <i>reactive nitrogen species</i>)
RT-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (z ang. <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
S100 β	cytotoksyczne, glejowo-specyficzne białko, produkowane przez dojrzałe astrocyty
SAHA	kwask suberanilohydroksamowy (z ang. <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>)
SB	maślan sodu (z ang. <i>sodium butyrate</i>)
SBC	metoda wprowadzania w stan hipotermii oparta na selektywnym chłodzeniu mózgu (z ang. <i>selective brain cooling</i>)
SCFAs	krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (z ang. <i>short chain fatty acids</i>)
SCI	model urazu rdzenia kręgowego (z ang. <i>spinal cord injury</i>)
SD	odchylenie standardowe (z ang. <i>standard deviation</i>)
SGZ	strefa podziarnista hipokampa (z ang. <i>subgranular zone</i>)
SSC	rozproszenie światła na bocznym detektorze optycznym (z ang. <i>side scatter</i>)
STAT1	nazwa czynnika transkrypcyjnego (z ang. <i>signal transducer and activator of transcription-1</i>)
STAT3	nazwa czynnika transkrypcyjnego (z ang. <i>signal transducer and activator of transcription-3</i>)
SVZ	strefa podkomorowa komory bocznej (z ang. <i>subventricular zone</i>)
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa (z ang. <i>transmission electron microscopy</i>)
TLR	receptor rozpoznający wzorce molekularne (z ang. <i>toll-like receptor</i>)
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu β (z ang. <i>transforming growth factor-β</i>)
tMCAO	model przejściowej okluzji tętnicy środkowej mózgu (z ang. <i>transient middle cerebral artery occlusion</i>)

TNF α	czynnik martwicy nowotworów α (z ang. <i>tumor necrosis factor α</i>), cytokina prozapalna
TREM2	receptor wyzwalający wyrażany na komórkach mieloidalnych 2 (z ang. <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>)
TrkB	receptor kinazy tyrozynowej typu B (z ang. <i>receptor tyrosine kinases B</i>)
TSA	trichostatyna A (z ang. <i>trichostatin A</i>)
v/v	stosunek objętości (z ang. <i>volume to volume ratio</i>)
VPA	kwas walproinowy (z ang. <i>valproic acid</i>)
WBC	metoda chłodzenia oparta na wprowadzaniu w hipotermię ogólną (z ang. <i>whole body cooling</i>)
WT	typ dziki (z ang. <i>wild type</i>)

Streszczenie

Okoloporodowe niedotlenieniowo-niedokrwienne uszkodzenia mózgu, znane potocznie jako asfiksja okołoporodowa, stanowią istotną przyczynę trwałych uszkodzeń mózgu, które mogą prowadzić do długotrwałych zaburzeń neurologicznych, takich jak mózgowie porażenie dziecięce, padaczka, niedowłady spastyczne, a w skrajnych przypadkach – do zgonu noworodka. Proces ten rozwija się stopniowo – od kilku godzin do kilku dni – co otwiera możliwość wdrożenia leczenia o charakterze neuroprotektynym.

Mimo postępującej wiedzy na temat patomechanizmów uszkodzenia mózgu po epizodach asfiksji, nadal nie udało się opracować skutecznej terapii, która pozwalałaby na ograniczenie skutków niedotlenienia. Najnowsze badania wykazały, że podawanie dorosłym zwierzętom inhibitorów deacetylaz histonów, takich jak trichostatyna A, maślan sodu czy worinostat (kwas suberanilohydroksamowy, SAHA, z ang. *suberoylanilide hydroxamic acid*), zarówno przed jak i po wywołaniu niedokrwienia, może działać ochronnie na układ nerwowy – zmniejszając zakres uszkodzeń i obniżając ekspresję prozapalnych mediatorów.

W poprzednich badaniach naszego Zespołu z wykorzystaniem szczurzego modelu asfiksji okołoporodowej zaobserwowano, że podanie maślanu sodu miało działanie neuroprotektynne i neurogenne, co – podobnie jak u dorosłych – może być związane z jego właściwościami przeciwzapalnymi. Dodatkowo zaobserwowano, że maślan sodu wspiera przejście mikrogleju z formy prozapalnej (M1) do przeciwzapalnej (M2) oraz zmniejsza ekspresję prozapalnej interleukiny 1 β .

Układ dopełniacza, będący częścią wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, pełni istotną funkcję jako mediator stanu zapalnego. Chroni on na ogół przed infekcjami, przyczynia się do przebudowy synaps neuronalnych oraz promuje regenerację i naprawę tkanek, ale może również powodować uszkodzenie, gdy jest rozregulowany lub nadmiernie aktywowany. W ostrej fazie niedokrwienia, obserwowanej w badaniach na modelach zwierzęcych, dochodzi do szybkiej śmierci komórek nerwowych, a aktywacja układu dopełniacza powoduje eliminację połączeń synaptycznych przez prozapalny mikroglej. Chociaż istnieje wiele publikacji dotyczących roli układu dopełniacza w niedokrwieniu u dorosłych, to zagadnienie to jest nadal słabo poznane w kontekście niedotlenienia i niedokrwienia u młodych organizmów.

Z tego powodu podjęliśmy się zbadania czasowej i przestrzennej aktywacji układu dopełniacza i mikrogleju oraz zmian w strukturze synaps w szczurzym modelu asfiksji

okołoporodowej, a także wpływu maślanu sodu na te procesy. Dodatkowo zbadaliśmy wpływ maślanu sodu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze u zwierząt po urazie niedotlenieniowo-niedokrwiennym. Określiliśmy również aktywację układu dopełniacza po hipoksji-ischemii *in vitro* (model OGD, z ang. *oxygen-glucose deprivation*) we współhodowlach pierwotnych neuronów korowych z mikroglejem oraz wpływu maślanu sodu na ten proces. W dalszej części badań określiliśmy wpływ wspomnianego inhibitora deacetylaz histonów na stopień rozgałęzienia wypustek neuronów w modelu OGD. Ponieważ w procesy eliminacji synaps zaangażowany jest mikroglej, w następnym etapie doświadczeń zbadaliśmy wpływ maślanu sodu na profil aktywacji komórek mikrogleju linii BV2. W końcowym etapie badań określiliśmy wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe, które zaangażowane są w aktywację komórek mikrogleju, przy użyciu utrwalonej linii komórkowej BV2.

Badania zostały wykonane na trzech różnych modelach neonatalnej hipoksji-ischemii. U szczurzych osesków stada Wistar indukowano uszkodzenie niedotlenieniowo-niedokrwiennie poprzez trwałe, jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej, a następnie 60-minutowe niedotlenienie (7,6% O₂). Procedura ta prowadziła do uszkodzenia półkuli mózgu unaczynionej przez końcowe odgałęzienia podwiązanej tętnicy. Maślan sodu (300 mg/kg m.c.) podawano raz dziennie przez 5 kolejnych dni, poprzez podskórną iniekcję, przy czym pierwsze wstrzyknięcie podano natychmiast po wywołaniu urazu niedotlenieniowo-niedokrwiennego. W modelu *in vitro* pierwotne neurony korowe izolowano z mózgow 2-dniowych szczurzych osesków stada Wistar. Pierwotny mikroglej wyizolowano z pierwotnej mieszanej hodowli glejowej uzyskanej z mózgow 2-dniowych szczurzych osesków i dosiewano do hodowli neuronów pierwotnych. Następnie hodowle poddano warunkom hipoksyjno-ischemicznym, poprzez usunięcie glukozy i tlenu z pożywki hodowlanej, przez 40 minut. Po tej procedurze komórki hodowano w świeżej pożywce z dodatkiem 1 mM maślanu sodu. W celu uzyskania większej ilości materiału biologicznego, część eksperymentów *in vitro* zdecydowano się przeprowadzić z użyciem komercyjnej linii BV2 mikrogleju. Procedura deficytu glukozy i tlenu oraz stymulacja maślanem sodu były takie same jak opisano powyżej dla współhodowli. Zebrany materiał biologiczny uzyskany z wyżej wymienionych modeli był następnie poddawany dalszym analizom, takim jak: barwienia immunohistologiczne i immunocytochemiczne, analizy qPCR, Western Blot, analiza transmisyjną mikroskopią elektronową, analiza Sholla, analiza metodą cytometrii przepływowej, immunoenzymatycznymi testami płytkowymi ELISA. Wykonane zostały również testy behawioralne na zwierzętach po urazie niedotlenieniowo-

niedokrwiennym, traktowanych i nietraktowanych maślanem sodu, jak i na zwierzętach kontrolnych.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazaliśmy, że białka dopełniacza (C3 i C5) kolokalizowały z białkiem postsynaptycznym PSD-95 (białko gęstości postsynaptycznej 95, z ang. *postsynaptic density protein 95*) w tkance mózgu po niedotlenieniu-niedokrwieniu. Sugeruje to, że białka dopełniacza mogą być zaangażowane w degradację synaps po niedotlenieniu-niedokrwieniu u niedojrzałych zwierząt. Niedotlenienie-niedokrwienie osesków szczura indukowało ekspresję genów białek dopełniacza C1q, C3, C5, C9 oraz ich receptorów C3aR i C5aR. Podawanie maślanu sodu obniżało poziom mRNA większości badanych białek dopełniacza. W zależności od czasu po indukcji niedotlenienia-niedokrwienia, efekt maślanu sodu na ekspresję receptorów był różny. W pierwszej fazie po uszkodzeniu (24 i 72 godziny) odnotowaliśmy wzrost ekspresji mRNA obu receptorów, a w późnej fazie uszkodzenia (5 i 14 dni po HI) zauważyliśmy spadek ekspresji. Wykazaliśmy wzrost poziomu białka C3 w półkulach mózgow zwierząt 5 dni po uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym. Podanie maślanu sodu spowodowało obniżenie poziomu tego białka. Ponadto odnotowaliśmy wzrost poziomu białka C5 w półkulach mózgow zwierząt 24 godziny po uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym. Podanie maślanu sodu spowodowało obniżenie poziomu białka C5. Ponadto, zaobserwowaliśmy obniżone poziomy białek presynaptycznych: synapsyny I i synaptofizyny, a także białka postsynaptycznego PSD-95 w uszkodzonej półkuli, co sugeruje utratę białek synaptycznych po neonatalnej hipoksji-ischemii. W transmisyjnej mikroskopii elektronowej zaobserwowaliśmy uszkodzenie struktur synaptycznych w korze mózgowej po urazie niedotlenieniowo-niedokrwiennym. Zastosowanie maślanu sodu powoduje wzrost poziomu białek synaptycznych, poprawę ultrastruktury i zmniejszenie degradacji synaps u zwierząt po hipoksji-ischemii. Nie zaobserwowaliśmy różnic w funkcjach lokomotorycznych i poznawczych pomiędzy analizowanymi grupami eksperymentalnymi. Tym samym, nie możemy stwierdzać, czy uszkodzenie niedotlenieniowo-niedokrwienne oraz podawanie maślanu sodu ma wpływ na behavior niedojrzałych zwierząt. Wykazaliśmy również neuroprotektoryjne działanie maślanu sodu w modelu *in vitro*. Odnotowaliśmy zwiększoną liczbę wypustek i większy stopień ich rozgałęzienia po OGD po zastosowaniu inhibitora deacetylaz histonów. Ponadto, w modelu *in vitro* z wykorzystaniem linii BV2 mikrogleju zaobserwowaliśmy zwiększoną ekspresję mRNA wszystkich markerów prozapalnych 24 h po procedurze deficytu glukozy-tlenowego, w porównaniu do hodowli kontrolnych. Podanie maślanu sodu znacząco obniżyło poziom czynników prozapalnych w komórkach

po OGD. Procedura deficytu glukozowo-tlenowego nie miała wpływu na ekspresję markerów przeciwzapalnych w komórkach BV2 24 godziny po OGD w porównaniu do hodowli kontrolnej. Podanie maślanu sodu znacznie zwiększyło ekspresję analizowanych markerów przeciwzapalnych w tym punkcie czasowym. Przy użyciu metody cytometrii przepływowej wykazaliśmy spadek liczebności przeciwzapalnej populacji mikrogleju M2 (komórki CD11b+CD206+) w komórkach BV2 72 godziny po OGD. Zastosowanie maślanu sodu spowodowało wzrost liczebności tej populacji. W modelu *in vitro* odnotowaliśmy spadek ufosforylowanej formy AKT (kinaza białkowa B, kinaza serynowo-treoninowa) po 24 h w grupie poddanej deficytowi glukozy i tlenu, natomiast po podaniu maślanu sodu poziom ufosforylowania/aktywacji tej kinazy wzrastał. Poziom ufosforylowanej formy ERK (kinaza regulowana sygnałem pozakomórkowym, z ang. *extracellular signal-regulated kinase*) był podobny we wszystkich badanych grupach w obu rozpatrywanych czasach.

Podsumowując, odkrycia te sugerują przeciwzapalne działanie maślanu sodu poprzez hamowanie aktywacji komponentów układu dopełniacza po asfiksji okołoporodowej. Układ dopełniacza jako kluczowy element odpowiedzi zapalnej, odgrywa istotną rolę w mechanizmach uszkodzenia mózgu po neonatalnej hipoksji-ischemii. Przeciwzapalne działanie inhibitora udało się także potwierdzić, poprzez obniżenie ekspresji markerów prozapalnych oraz wzrost ekspresji markerów przeciwzapalnych w komórkach mikrogleju BV2 w modelu niedotlenienia-niedokrwienia *in vitro*. Jednym z mechanizmów molekularnych działania maślanu sodu jest aktywacja pro-życiowej ścieżki PI3K/AKT. Ponadto wykazaliśmy neuroprotekcyjne działanie maślanu poprzez zmniejszenie eliminacji białek synaptycznych w modelu niedotlenienia-niedokrwienia *in vivo*, jak również poprawę stopnia rozgałęzienia wypustek neuronów w modelu *in vitro*. Uzyskane wyniki wskazują, że maślan sodu jest substancją, która mogłaby w przyszłości przyczynić się do opracowania nowej strategii leczniczej w celu zmniejszenia uszkodzeń mózgu spowodowanych asfiksją okołoporodową.

Summary

Perinatal hypoxic-ischemic brain damage, commonly known as perinatal asphyxia, is a significant cause of permanent brain injury, which can lead to long-term neurological disorders such as cerebral palsy, epilepsy, spastic paresis, and, in extreme cases, newborn death. This process develops gradually – over several hours to days – providing an opportunity for neuroprotective treatment.

Despite advances in knowledge of the pathomechanisms of brain injury after episodes of asphyxia, an effective therapy to limit the effects of hypoxia has not yet been developed. Recent studies have shown that administering histone deacetylase inhibitors, such as trichostatin A, sodium butyrate, or vorinostat, to adult animals, both before and after ischemia, can protect the nervous system by reducing the extent of damage and decreasing the expression of pro-inflammatory mediators.

In previous studies by our team using a rat model of perinatal asphyxia, we observed that sodium butyrate had neuroprotective and neurogenic effects. This, as in adults, may be related to its anti-inflammatory properties. Furthermore, it was noted that sodium butyrate promotes the transition of microglia from the pro-inflammatory (M1) to the anti-inflammatory (M2) phenotype and reduces the expression of the pro-inflammatory interleukin 1 β .

The complement system, a part of the innate immune response, plays a crucial role as a mediator of inflammation. It typically protects against infections, contributes to synaptic remodeling, and promotes tissue regeneration and repair. However, it can also cause damage when dysregulated or overly activated. In the acute phase of ischemia, observed in animal models, rapid neuronal cell death occurs, and activation of the complement system results in the elimination of synaptic connections by pro-inflammatory microglia. Although numerous publications have explored the role of the complement system in ischemia in adults, this problem is still poorly understood in the context of hypoxia and ischemia in immature organisms.

For this reason, we investigated the temporal and spatial activation of the complement system and microglia, as well as changes in synaptic structure in a rat model of perinatal asphyxia, and the influence of sodium butyrate on these processes. Furthermore, we examined the effects of sodium butyrate on locomotor and cognitive functions in animals after hypoxic-

ischemic injury. We also assessed complement system activation after *in vitro* hypoxia-ischemia (OGD model, oxygen-glucose deprivation) in co-cultures of primary cortical neurons and microglia, as well as the effect of sodium butyrate on this process. Furthermore, we evaluated the impact of the histone deacetylase inhibitor on the degree of dendritic branching in the OGD model. Since microglia are involved in synapse elimination processes, the next step was to examine the impact of sodium butyrate on the activation profile of BV2 microglia cells. In the final stage of the study, we determined the effects of sodium butyrate on specific signaling pathways involved in microglia cell activation using the BV2 cell line.

The experiments were conducted on three different models of neonatal hypoxia-ischemia. In Wistar rat pups, hypoxic-ischemic injury was induced by permanent unilateral ligation of the common carotid artery followed by 60-minute hypoxia (7.6% O₂). This procedure led to damage in the brain hemisphere supplied by the terminal branches of the ligated carotid artery. Sodium butyrate (300 mg/kg body weight) was administered once a day, for 5 consecutive days by subcutaneous injection, with the first injection administered immediately after inducing hypoxic-ischemic injury. In the *in vitro* model, primary cortical neurons were isolated from the brains of 2-day-old Wistar rat pups. Primary microglia were isolated from primary mixed glial cultures obtained from the brains of 2-day-old rat pups and added to neuronal cultures. The cultures were then subjected to hypoxia-ischemia by deprivation of glucose and oxygen from the culture medium for 40 minutes. After this procedure, fresh medium with 1 mM sodium butyrate was added. To obtain more biological material, some *in vitro* experiments were performed using the commercial BV2 microglia cell line. The glucose and oxygen deprivation procedure, as well as sodium butyrate stimulation, were the same as those described for co-cultures. The collected biological material from the models mentioned above was subsequently analyzed using techniques such as immunohistochemical and immunocytochemical staining, qPCR, Western Blot, transmission electron microscopy, Sholl analysis, flow cytometry, and ELISA assays. Behavioral tests were also performed on animals after hypoxic-ischemic injury, treated and untreated with sodium butyrate, as well as on control animals.

Based on the obtained results, we showed that complement proteins (C3 and C5) colocalized with the postsynaptic protein PSD-95 in brain tissue after hypoxia-ischemia. This suggests that complement proteins may be involved in synaptic degradation following hypoxia-ischemia in immature animals. Hypoxia-ischemia in rat pups induced the expression

of complement protein genes C1q, C3, C5, C9, and their receptors C3aR and C5aR. Sodium butyrate treatment decreased the expression of mRNA for most of the complement proteins. Depending on the time after hypoxia-ischemia induction, the effect of sodium butyrate on the expression of receptors was different. In the early phase after injury (24 and 72 hours), we recorded an increase in mRNA expression of both receptors, while in the later phase (5 and 14 days after HI), we observed a decrease in their expression. We demonstrated an increase in C3 protein levels in the animals' cerebral hemispheres 5 days after hypoxic-ischemic injury. Administration of sodium butyrate resulted in a decrease in the levels of this protein. Additionally, we observed an increase in C5 protein levels in the animals' cerebral hemispheres at 24 hours after hypoxic-ischemic injury. Administration of sodium butyrate resulted in a decrease in C5 protein levels. Furthermore, we observed lower levels of presynaptic proteins: synapsin I and synaptophysin, as well as the postsynaptic protein PSD-95, in the damaged hemisphere, suggesting loss of synaptic proteins after neonatal hypoxia-ischemia. Transmission electron microscopy revealed damage to synaptic structures in the cerebral cortex after hypoxic-ischemic injury. Sodium butyrate treatment increased synaptic protein levels, improved the ultrastructure of the tissue, and reduced synapse degradation in animals after hypoxia-ischemia. No differences were observed in locomotor and cognitive functions between the experimental groups. Therefore, we cannot conclude whether hypoxic-ischemic injury and sodium butyrate administration affect the behavior of immature animals. We also demonstrated the neuroprotective effect of sodium butyrate in the *in vitro* model. We noted increased dendritic branching after OGD treatment with a histone deacetylase inhibitor. Moreover, in the *in vitro* model using the BV2 microglia cell line, we observed increased mRNA expression of all pro-inflammatory markers 24 hours after glucose-oxygen deprivation compared to control cultures. Sodium butyrate significantly reduced the levels of pro-inflammatory factors in cells after OGD. The glucose-oxygen deprivation procedure did not affect the expression of anti-inflammatory markers in BV2 cells 24 hours after OGD, compared to the control culture; however, sodium butyrate treatment significantly increased the expression of anti-inflammatory markers at this time point. We demonstrated a decrease in the number of anti-inflammatory M2 microglia (CD11b+CD206+ cells) in BV2 cells 72 hours after OGD by using flow cytometry. The administration of sodium butyrate increased the number of this population. In the *in vitro* model, we observed a decrease in the phosphorylated form of AKT (protein kinase B, a serine-threonine kinase) 24 hours after the glucose-oxygen deprivation procedure, while after sodium butyrate treatment, the level of phosphorylation/activation of this kinase increased. The level

of the phosphorylated form of ERK (extracellular signal-regulated kinase) was similar in all studied groups at both time points.

In summary, our findings suggest the anti-inflammatory action of sodium butyrate through inhibition of complement system activation after perinatal asphyxia. The complement system, as a key element of the inflammatory response, plays a significant role in the mechanisms of brain damage after hypoxia-ischemia in newborns. The anti-inflammatory effect of the inhibitor was also confirmed by reducing the expression of pro-inflammatory markers and increasing the expression of anti-inflammatory markers in BV2 microglia cells in the *in vitro* model of hypoxia-ischemia. One of the molecular mechanisms of sodium butyrate action is the activation of the PI3K/AKT pathway. Moreover, we demonstrated the neuroprotective effect of sodium butyrate by reducing synaptic protein degradation in the *in vivo* hypoxia-ischemia model, as well as improving dendritic branching in the *in vitro* model. It seems reasonable that sodium butyrate may offer new therapeutic approaches to reduce brain damage in cases of perinatal asphyxia.

Innowacyjność rozprawy

1. Wykazanie zmian ekspresji mRNA głównych składników układu dopełniacza po okołoporodowym uszkodzeniu niedotlenieniowo-niedokrwiennym mózgu.
2. Wykazanie przeciwzapalnego działania maślanu sodu po okołoporodowym uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym mózgu, poprzez zmniejszenie ekspresji składników układu dopełniacza.
3. Wykazanie przeciwzapalnego działania maślanu sodu, poprzez zmniejszenie ekspresji mRNA czynników prozapalnych i zwiększenie ekspresji mRNA czynników przeciwzapalnych w komórkach mikrogleju BV2 w modelu hipoksji-ischemii *in vitro*.
4. Wykazanie zaangażowania ścieżki sygnałowej PI3K/AKT w aktywację komórek mikrogleju po hipoksji-ischemii *in vitro* oraz modulacji tej ścieżki przez maślan sodu poprzez zwiększenie poziomu ufosforylowanej formy AKT.
5. Wykazanie neuroprotekcijnego działania maślanu sodu po neonatalnej hipoksji-ischemii poprzez zmniejszenie utraty białek synaptycznych i uszkodzeń neuronów oraz poprawę morfologii neuronów (poprzez zwiększenie stopnia rozgałęzień dendrytów).

1. Wstęp

1.1. Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna

1.1.1. Definicja i skutki encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej

Układ nerwowy noworodka w okresie okołourodzeniowym jest szczególnie wrażliwy na uszkodzenia spowodowane urazami mechanicznymi, niedotlenieniem lub infekcjami. Do najczęstszych przyczyn zachorowalności i śmiertelności wśród noworodków zaliczają się stany niedotlenienia i niedokrwienia, znane również jako asfiksja (stan niedoboru tlenu w organizmie) okołoporodowa lub zamartwica [1]. Z danych literaturowych wynika, że dotyczy to około 0,2-0,4% żywych noworodków [2]. W krajach rozwiniętych niedotlenienie okołoporodowe dotyka 1,5 na 1000 noworodków urodzonych terminowo i do 26 na 1000 żywych urodzeń w krajach o niskich zasobach [3]. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia jest to druga najczęstsza przyczyna zgonów noworodków [4]. Przewlekłe niedotlenienie, inaczej hipoksja (zbyt niski poziom tlenu we krwi tętniczej) oraz niedokrwienie, inaczej ischemia (ograniczenie lub brak dopływu krwi) może dotyczyć wielu narządów, takich jak serce, wątroba czy nerki. W przypadku wymienionych narządów zmiany wynikające z tego stanu są jednak często odwracalne [5], [6]. Szczególnie wrażliwy na uraz hipoksyjno-ischemiczny (HI) jest ośrodkowy układ nerwowy (OUN), co prowadzi do rozwoju encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej (ENN, HIE, z ang. *hypoxic-ischemic encephalopathy*), która jest główną przyczyną uszkodzeń mózgu w okresie okołoporodowym. Termin ten stosuje się do określenia zaburzeń neurorozwojowych u dzieci, które przeszły asfiksję (lub występują tylko podejrzenia asfiksji), wykrywa się u nich charakterystyczne zmiany podczas diagnostyki opartej na obrazowaniu z zastosowaniem rezonansu magnetycznego MRI (z ang. *magnetic resonance imaging*) [7]. Warto podkreślić, że mogą występować różnice w uzyskanym obrazowaniu u dzieci urodzonych przed i w terminie. Podczas przedwczesnego porodu, najczęściej pojawiają się rozproszone uszkodzenia w istocie szarej i białej [8]. U noworodków urodzonych przedwcześnie odnotowuje się poważniejszy przebieg ENN. Dzieje się tak między innymi dlatego, że w rejonie wzgórza i jądra ogoniastego występuje u nich tzw. macierz zarodkowa. Płód do 32-34 tygodnia ciąży posiada pod wyściółką układu komórek mózgu warstwę komórek macierzystych, zawierającą niedojrzałe naczynia krwionośne, które są bardziej podatne na uszkodzenia i mogą prowadzić do krwawień [9]. Natomiast kiedy dochodzi do epizodu niedotlenieniowo-niedokrwiennego u dzieci urodzonych w terminie zmiany najczęściej pojawiają się w obszarze jąder podstawy i wzgórza mózgu [10]. Encefalopatia

niedotlenieniowo-niedokrwienna prowadzi często do zaburzeń neurorozwojowych, takich jak deficyty poznawcze czy ruchowe u dzieci [11], [12]. ENN może ponadto powodować śmierć komórek nerwowych oraz prowadzić do przejściowych lub ciężkich, długotrwałych konsekwencji zdrowotnych. Do ciężkich powikłań możemy zaliczyć między innymi dziecięce porażenie mózgowie [13], padaczkę [14], niedowład spastyczny lub zahamowanie rozwoju intelektualnego [15], [16]. W najcięższych przypadkach ENN może skończyć się śmiercią dziecka. Niedawne badania wskazują również, że epizod niedotlenieniowo-niedokrwienny może przyczyniać się do zwiększonego występowania zaburzeń ze spektrum autyzmu [17]. Dzieci, które przeszły łagodną formę asfiksji rozwijają się najczęściej prawidłowo [18].

1.1.2. Przyczyny encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej

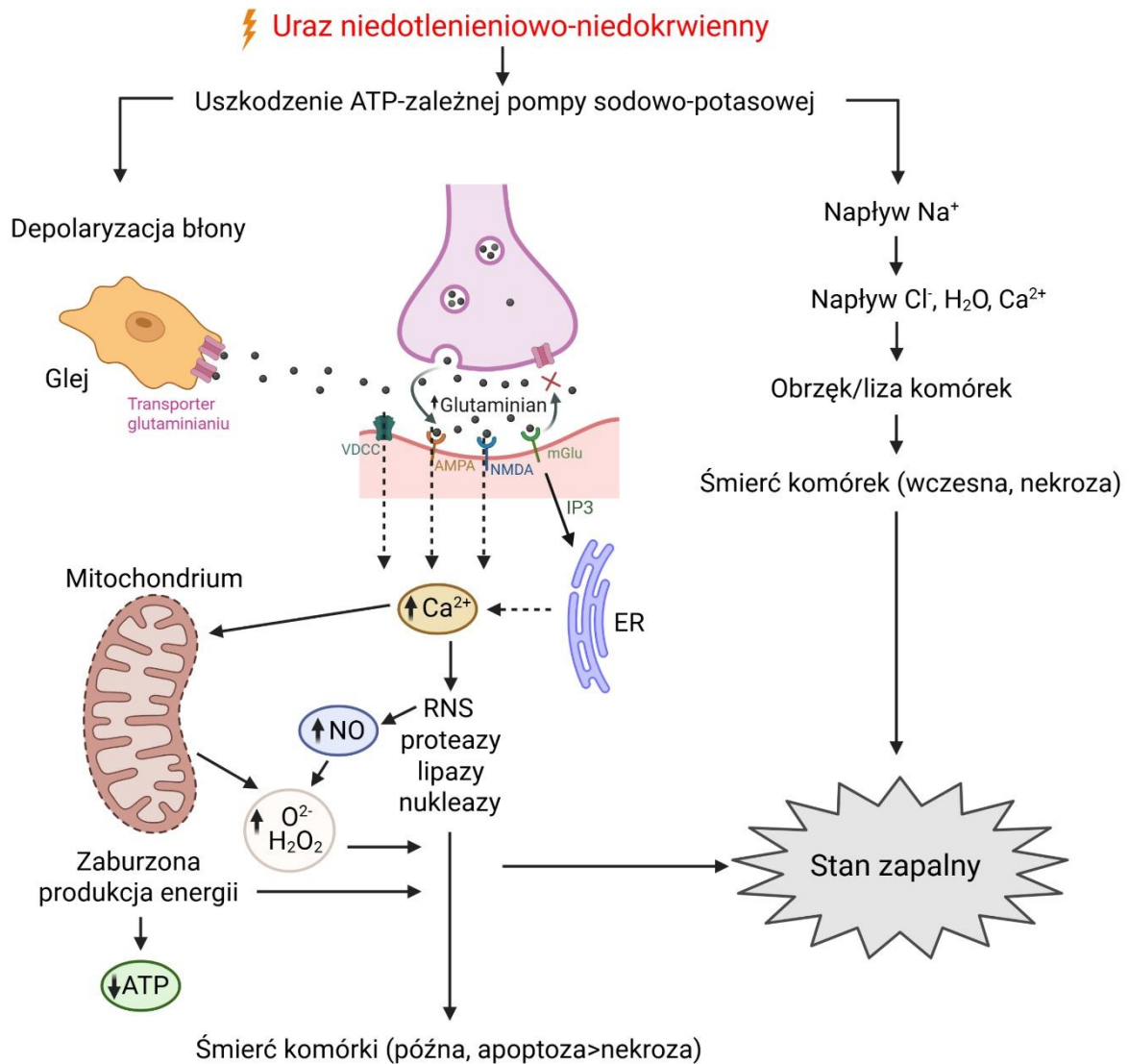
Główny czynnik zwiększający ryzyko encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej u noworodków to zmniejszona rezerwa tlenowa, wynikająca z różnych przyczyn, takich jak problemy matczyne, łożyskowe, płodowe czy naczyniowe lub ich kombinacje [19]. Wśród czynników matczynych wymienia się zakażenia wewnątrzowodniowe [20], stany i choroby takie jak gorączka, astma, niewydolność krążenia, które obniżają wentylację minutową matki (objętość powietrza wymieniana w ciągu jednej minuty), wady serca, arytmie, niedokrwistość, które zmniejszają przepływ krwi i dystrybucję tlenu, a także choroby układowe, takie jak cukrzyca, niekontrolowane nadciśnienie tętnicze i niedociśnienie [19]. Czynniki płodowymi są między innymi: długotrwały ucisk główki płodu na dno miednicy podczas porodu, prowadzący do zaburzeń krążenia, małą masę urodzeniową, wady wrodzone, niewykształcony układ oddechowy w przypadku noworodków urodzonych przedwcześnie, wewnątrzmaciczne zakażenia, stany wstrząsowe i chorobę hemolityczną [19], [21], [22]. Czynniki łożyskowe obejmują zawały łożyskowe upośledzające dyfuzję tlenu przez łożysko, zmniejszenie powierzchni czynnej łożyska, upośledzenie drożności naczyń doprowadzających, nieprawidłowe położenie łożyska lub jego przedwczesne odklejenie, co może prowadzić do konieczności wykonania cesarskiego cięcia, które z kolei samo w sobie zwiększa ryzyko wystąpienia encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej [21], [22], [23]. Do przyczyn naczyniowych niedotlenienia należą: owinięcie pępowiny wokół płodu, ucisk naczyń pępowinowych podczas porodu w położeniu miednicowym, krótka pępowina (poniżej 40 cm), nieprawidłowa budowa pępowiny (np. dwu- lub jednonaczyniowa), niedrożność pępowiny utrudniająca przepływ krwi oraz wypadnięcie pępowiny [22], [24]. Niektóre z wymienionych czynników są tzw. czynnikami przedporodowymi, występującymi jeszcze przed rozpoczęciem

porodu. Mogą one wywoływać poród przedwczesny, skutkujący zwiększonym ryzykiem komplikacji [25].

1.1.3. Mechanizm molekularny encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej

Wskutek spadku ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi (hipoksemia) dochodzi do niedoboru tlenu w mózgu, który jest szczególnie wrażliwy na brak tego gazu. Zaledwie po kilku minutach niedotlenienie może doprowadzić do śmierci komórek nerwowych. Molekularny mechanizm jaki temu towarzyszy jest już dobrze zbadany i opisany [26]. Możemy go podzielić na dwie zasadnicze fazy. W fazie pierwszej ograniczenie dopływu tlenu do mózgu szybko wyczerpuje zapasy ATP (adenozynotrifosforan, z ang. *adenosine triphosphate*) w neuronach, co prowadzi do poważnego kryzysu energetycznego w komórkach. Niedobór energii uruchamia szereg wtórnych procesów, w tym zaburzenia w metabolizmie glukozy i dominację glikolizy beztlenowej. To z kolei prowadzi do wzrostu stężenia mleczanów i protonów. Dochodzi do zakłócenia transportu jonów przez pompę sodowo-potasową, co jest procesem wymagającym dużej ilości energii. W wyniku tego procesu jony K^+ wypływają z komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co prowadzi do zaburzenia homeostazy jonowej i w konsekwencji do wewnątrzkomórkowego gromadzenia się jonów Na^+ , Ca^{2+} i Cl^- . Zwiększenie stężenia jonów Na^+ powoduje napływ wody do wnętrza komórek, co prowadzi do cytotoksycznego obrzęku neuronów, tworzenia się wakuoli cytoplazmatycznych, kondensacji mitochondriów, pęknięcia lizosomów i uszkodzenia błony komórkowej. Uszkodzenie błony komórkowej powoduje wyciek zawartości cytoplazmy do otaczającej tkanki śródmiąższowej, co skutkuje wysłaniem sygnałów chemotaktycznych w celu rekrutacji komórek zapalnych do obszaru martwicy tkankowej, a komórka ulega śmierci w wyniku nekrozy [27]. Na skutek zaburzenia homeostazy jonowej zostaje utracony potencjał błonowy, dochodzi do uwalniania neuroprzekaźników pobudzających, w tym głównie kwasu glutaminowego. To z kolei prowadzi do nadmiernej aktywacji receptorów N-metylo-D-asparaginowych – NMDAR i α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-5-propionowych – AMPAR. Jeśli początkowe uszkodzenie jest długotrwałe lub poważne, może to spowodować wtórną opóźnioną niewydolność energetyczną w ciągu kilku godzin, w wyniku której większość komórek umiera w wyniku apoptozy [28]. Stan, w którym dochodzi do nadmiernego i długotrwałego pobudzenia komórek, nosi nazwę ekscytotoksyczności. Receptory NMDA, które są wysoce przepuszczalne dla jonów wapnia, w wyniku nadmiernej stymulacji umożliwiają napływ Ca^{2+} do wnętrza komórki [28], [29]. Zbyt wysokie stężenie jonów wapnia

aktywuje szereg procesów wewnątrzkomórkowych, w tym aktywację lipaz, proteaz i endonukleaz, które prowadzą do uszkodzenia mitochondriów, wywołują stres oksydacyjny. W wyniku tych procesów dochodzi wzrostu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, fosfolipidów i utworzenia wolnych rodników tlenowych. Zwiększona koncentracja jonów wapnia wywołuje uwolnienie cytochromu c z mitochondriów, który łączy się z białkiem APAF-1 (z ang. *apoptotic protease activating factor-1*), deoksy-ATP i prokaspazą 9, tworząc kompleks zwany apoptosomem. Apoptosom aktywuje kaspazy efektorowe, głównie kaspazy - 3 i -7, które degradują białka strukturalne i enzymatyczne komórki, prowadząc do jej śmierci na drodze apoptozy [30], [31], [32]. Dodatkowo, w odpowiedzi na sygnały pochodzące z uszkodzonych tkanek, pojawia się ostra reakcja zapalna, która pogłębia uszkodzenie [29], [33]. Dochodzi do aktywacji mikrogleju, który zaczyna wydzielać czynniki prozapalne, takie jak TNF α (czynnik martwicy nowotworów α ; z ang. *tumor necrosis factor α*), IL-1 β (interleukina 1 β), czy IL-6 (interleukina 6). Po kilku dniach rozpoczyna się etap przebudowy uszkodzonej tkanki nerwowej, której towarzyszy przewlekły stan zapalny [28] (Ryc. 1).



Rycina 1. Schemat patofizjologii hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu. Wskutek urazu niedotlenieniowo-niedokrwiennego dochodzi do zaburzenia pracy ATP-zależnej pompy sodowo-potasowej. Następuje wewnątrzkomórkowe gromadzenie jonów Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ i wody co skutkuje cytotosycznym obrzękiem neuronów i ich nekrotyczną śmiercią. Na skutek zaburzenia homeostazy jonowej zostaje utracony potencjał błonowy, dochodzi do uwalniania neuroprzekaźników do przestrzeni synaptycznej, głównie glutaminianu, co prowadzi do nadmiernego pobudzenia receptorów NDMA i AMPA i w konsekwencji do wtórnego napływu jonów Ca²⁺. Zbyt wysokie stężenie jonów wapnia aktywuje szereg procesów wewnątrzkomórkowych, które prowadzą do uszkodzenia mitochondriów, tworzenia apoptosomu i wywołują stres oksydacyjny, co skutkuje opóźnioną śmiercią komórki na drodze apoptozy. Sygnały, które docierają z umierających komórek, powodują rozwój reakcji zapalnej. Rycina utworzona przy pomocy programu BioRender.com.

1.2. Rozwój reakcji zapalnej w encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej

1.2.1. Komórki glejowe

Mikroglej i astrocyty są wysoce wrażliwymi komórkami glejowymi, które diametralnie zmieniają swoje cechy w odpowiedzi na udar. Profilowanie transkryptomyczne wykazało, że zarówno mikroglej, jak i astrocyty były wzbogacone w geny związane ze szlakiem pochłaniania synaps, w tym receptory fagocytarne, cząsteczki wewnątrzkomórkowe i opsoniny [34]. Jednakże w niniejszym podrozdziale skupiono się wyłącznie na mikrogleju, ponieważ badania wchodzące w skład dysertacji prowadzone były wyłącznie na tych komórkach glejowych.

1.2.1.1. Mikroglej

Komórki mikrogleju są pierwszymi, które reagują na hipoksję ischemiczną i odgrywają kluczową rolę w rozwoju stanu zapalnego. W przeciwieństwie do komórek makrogleju i neuronów, mikroglej pochodzi z mezodermy. U gryzoni, w około 9. dniu rozwoju zarodkowego (a u ludzi w czwartym tygodniu), w mezodermie pęcherzyka żółtkowego tworzą się wyspy krwiotwórcze, które produkują elementy morfotyczne krwi. W tych wyspach powstają prymitywne makrofagi, które następnie migrują do neuroepitelium i osiedlają się w mózgu. Po utworzeniu bariery krew-mózg, w normalnych warunkach, monocyty (makrofagi, które jeszcze nie zasiedliły tkanki) nie mają dostępu do mózgu. Populacja mikrogleju w mózgu szacunkowo stanowi 8-15% wszystkich komórek tego narządu, w zależności od jego obszaru. Mikroglej jest najmniej liczny w istocie białej, a najliczniejszy w korze mózgowej [35], [36], [37].

W warunkach fizjologicznych każda komórka mikrogleju zajmuje określony obszar w mózgu. W stanie spoczynku komórki mikrogleju mają liczne, cienkie, rozgałęzione wypustki, a ich ciało komórkowe jest małe. Wypustki te dynamicznie zmieniają swoją długość w poszukiwaniu patogenów. W przypadku patologii, komórki mikrogleju przechodzą transformację w formę ameboidalną. Aktywowany mikroglej jest zdolny do migracji, proliferacji i fagocytozy [38], [39].

Na powierzchni komórek mikrogleju znajdują się różnorodne receptory, które mają kluczowe znaczenie w ich aktywacji. Dochodzi do niej przez receptory TLR (z ang. *toll-like receptor*), które rozpoznają tzw. „wzorce molekularne”. Są to specyficzne struktury

molekularne, które mogą pochodzić z patogennych mikroorganizmów (PAMPs, z ang. *pathogen-associated molecular patterns*), jak np. LPS (lipopolisacharyd, składnik zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych), wirusowe i bakteryjne RNA (kwas rybonukleinowy, z ang. *ribonucleid acid*). Receptory TLR mogą również rozpoznawać endogenne cząsteczki związane z uszkodzeniem tkanek (DAMPs, z ang. *endogenous damage-associated molecular patterns*), takie jak np. kwasy nukleinowe, białka szoku cieplnego (HSP60, z ang. *heat shock protein 60 kilodalton*, HSP70, z ang. *heat shock protein 70 kilodalton*), oraz ATP [40], [41], [42]. W odpowiedzi na aktywację receptorów TLR, mikroglej wytwarza i uwalnia różnorodne cytokiny prozapalne, w tym IL-1 α , IL-1 β oraz IL-18, które prowadzą do trwałego uszkodzenia neuronów [43], [44]. Interleukina 6, klasyfikowana jako cytokina prozapalna, może również wykazywać działanie przeciwzapalne. Choć jej rola w hipoksji-ischemii okołoporodowej nie jest do końca jasna, blokowanie IL-6 wykazało działanie ochronne na mózg, sugerując jej prozapalny charakter w kontekście tego urazu [45]. Aktywny mikroglej wydziela również TNF α , który indukuje apoptozę komórek, szczególnie oligodendrocytów, co skutkuje opóźnioną mielinizacją neuronów [46], [47]. Mikroglej może również produkować metaloproteinazę 9 (MMP-9, z ang. *matrix metalloproteinase-9*), która degradowuje białka tworzące barierę krew-mózg, prowadząc do jej rozszczelnienia oraz syntezę tlenku azotu (NOS, z ang. *nitric oxide synthase*), co skutkuje nadmierną produkcją tlenku azotu i może prowadzić do bezpośredniego uszkodzenia składników komórek [48], [49]. W warunkach hipoksyjno-ischemicznych mikroglej może zostać aktywowany przez ATP. Stężenie zewnątrzkomórkowego ATP wzrasta w ciągu kilku minut po hipoksji-ischemii na skutek depolaryzacji błony komórkowej neuronów. Podwyższone stężenie ATP aktywuje receptory purinergiczne na powierzchni komórek mikrogleju, co prowadzi do uwolnienia mediatorów prozapalnych, takich jak IL-1 α , IL-1 β , IL-6 i TNF α [41], [50]. Ponadto mikroglej może zostać aktywowany w wyniku utraty kontaktu z neuronami. W warunkach fizjologicznych mikroglej i neurony utrzymują stały kontakt dzięki interakcji receptora CX3CR1 (receptor chemokinowy 1 z motywem C-X3-C) zlokalizowanego na mikrogleju z fraktalkiną – chemokiną zakotwiczoną w błonie neuronu, a także dzięki receptorowi CD200R, który łączy się z glikoproteiną CD200 (antygen różnicowania komórkowego 200) na powierzchni neuronów. Interakcje te utrzymują mikroglej w stanie spoczynku, a ich zaburzenie prowadzi do jego aktywacji. Aktywowany mikroglej wytwarza również szereg innych białek prozapalnych. Należą do nich między innymi białko zapalne makrofagów MIP-2 (z ang. *macrophage inflammatory protein-2*) i chemokina CCL2 (ligand chemokinowy 2 z motywem C-C), które działają jako chemoatraktanty dla makrofagów, oraz COX-2 (cyklooksygenaza 2),

odpowiedzialna za syntezę prostaglandyn. Co ciekawe, w płynie mózgowo-rdzeniowym dzieci po okołoporodowej hipoksji-ischemii, zostało wykryte wysokie stężenie prostaglandyn. Badania wykazały, że choć prostaglandyny mogą wywoływać zarówno korzystne, jak i szkodliwe efekty po hipoksji-ischemii, to ich farmakologiczne hamowanie wykazuje działanie neuroochronne w przypadku uszkodzeń mózgu i rdzenia kręgowego u dorosłych [51].

Należy podkreślić, że komórki mikrogleju mogą uczestniczyć także w procesach naprawczych [52]. Ta dualistyczna rola wynika z różnych stanów aktywacji komórek. Mikroglej posiada zdolność do polaryzacji, czyli zmiany swojego fenotypu pod wpływem czynników zewnętrznych, takich jak cytokiny czy LPS. W wyniku tej zmiany, produkcja białek w komórce mikrogleju ulega przekształceniu, a na jej powierzchni pojawiają się specyficzne markery. W warunkach *in vitro*, w zależności od zastosowanej substancji, mikroglej może przyjąć fenotyp M1, który wiąże się z wydzielaniem cytokin i innych substancji prozapalnych, prowadząc do uszkodzenia tkanek. Z drugiej strony, mikroglej może również przyjąć fenotyp M2, który wytwarza czynniki wzrostu i cytokiny przeciwzapalne, redukując stan zapalny i wspomagając procesy naprawcze w uszkodzonej tkance [53]. Kluczowe jest to, że mikroglej może przejść z fenotypu M1 (prozapalnego) do M2 (naprawczego) w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe. Mikroglej o fenotypie M1 wydziela cytokiny prozapalne, takie jak interleukiny: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23; TNF α , CCL2, CCL20 (ligand chemokinowy 20 z motywem C-C), CXCL9 (ligand chemokinowy 9 z motywem C-X-C), CXCL10 (ligand chemokinowy 10 z motywem C-X-C), COX-2, metaloproteinazy, ROS (reaktywne formy tlenu, z ang. *reactive oxygen species*), RNS (reaktywne formy azotu, z ang. *reactive nitrogen species*) oraz iNOS (indukowalną syntazę tlenu azotu, z ang. *inducible nitric oxide synthase*), które prowadzą do uszkodzenia bariery krew-mózg [54], [55], [56], [57], [58], [59], [60]. Skutkiem tego jest infiltracja tkanki przez leukocyty, które również uwalniają cytokiny prozapalne, a także reaktywne formy tlenu i azotu, co prowadzi do dalszych uszkodzeń neuronów. Natomiast mikroglej w stanie M2 wydziela czynniki troficzne: transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β , z ang. *transforming growth factor- β*), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1, z ang. *insulin-like growth factor-1*), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, z ang. *fibroblast growth factor*), czynnik wzrostu nerwów (NGF, z ang. *nerve growth factor*), neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF, z ang. *brain-derived neurotrophic factor*) i czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (GDNF, z ang. *glial cell-derived neurotrophic factor*) oraz cytokiny przeciwzapalne, takie jak interleukina 4 (IL-4) i interleukina 10 (IL-10), które zmniejszają liczbę makrofagów

w uszkodzonej tkance mózgowej, a także wspomagają aktywację procesów naprawczych [61], [62]. Mikroglej o fenotypie M2 prezentuje charakterystyczne markery takie jak arginaza 1, CD206 (antygen różnicowania komórkowego 206) [59], [60]. W pierwszych godzinach i dniach po niedokrwieniu zwykle dochodzi do aktywacji mikrogleju o fenotypie M1, co nasila stan zapalny i pogłębia uszkodzenie. Z upływem czasu, mikroglej przechodzi w fenotyp M2, który sprzyja regeneracji. Badania wskazują, że całkowite zablokowanie aktywacji mikrogleju po niedokrwieniu nie jest korzystne, ponieważ może prowadzić do większych uszkodzeń mózgu. Obecnie badania koncentrują się na modulowaniu aktywności mikrogleju, aby dominował fenotyp M2, co miałoby efekt ochronny dla mózgu [55], [63], [64].

1.2.1.1.1. Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe zaangażowane w aktywację mikrogleju

Kinaza serynowo-treoninowa AKT odgrywa istotną rolę w regulacji fizjologii i aktywacji mikrogleju. AKT jest kluczowym enzymem w szlaku sygnalizacyjnym kinaz fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K)-AKT, który jest aktywowany w mikrogleju w następstwie aktywacji receptorów takich jak CSF-1R (receptor czynnika stymulującego tworzenie kolonii 1, z ang. *colony stimulating factor 1 receptor*), TREM2 (receptor wyzwalający wyrażany na komórkach mieloidalnych 2 z ang. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), CX3CR1 oraz receptorów toll-podobnych (TLR) [65], [66]. Po związaniu liganda, PI3K katalizuje przemianę fosfatydyloinozytolu-4,5-bisfosforanu (PIP₂) w fosfatydyloinozytol-3,4,5-trisfosforan (PIP₃), co prowadzi do rekrutacji kinazy AKT do błony, fosforylacji reszty seryny 473 oraz treoniny 308, co skutkuje pełną aktywacją enzymu. Aktywowany AKT fosforyluje następnie szerokie spektrum substratów, w tym GSK3β (kinaza syntazy glikogenu-3 β, z ang. *glycogen synthase kinase-3 β*), mTOR (kinaza ssaczego celu rapamycyny, z ang. *mammalian target of rapamycin kinase*), czynniki transkrypcyjne FOXO (podklasa O czynnika transkrypcyjnego forkhead, z ang. *forkhead box O*) oraz NF-κB (z ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), koordynując różnorodne procesy komórkowe, takie jak przeżycie, metabolizm, ruchliwość, a także moduluje układ odpornościowy [67].

Istnieje wiele doniesień wskazujących, że w mikrogleju aktywność AKT jest ściśle powiązana z polaryzacją fenotypową. Wzmocnienie sygnalizacji AKT sprzyja neuroprotekcynemu, przeciwzapalnemu fenotypowi M2, charakteryzującemu się zwiększoną ekspresją interleukiny 10, antagonisty receptora IL-1 (IL-1Ra) oraz interferonu β (IFN-β).

Natomiast zahamowanie sygnalizacji AKT przesuwają mikroglej w kierunku prozapalnego fenotypu M1, prowadząc do zwiększonej produkcji tlenu azotu, TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz innych mediatorów zapalnych [68], [69], [70].

Szlak kinazy ERK jest końcowym i zarazem kluczowym elementem szlaku sygnalizacji MAPK (kinazy białkowej aktywowanej mitogenami, z ang. *mitogen-activated protein kinase*). Kaskada MAPK jest uruchamiana przez różnorodne bodźce zewnętrzne, takie jak czynniki wzrostu, hormony czy stres komórkowy, co prowadzi do aktywacji procesów komórkowych, w tym głównie proliferacji i różnicowania, ale także w pewnych warunkach może wywołać odpowiedź na stres lub apoptozę [71], [72]. Wiadomo, że ERK1/2 jest nieprawidłowo ekspresjonowany w różnych modelach niedokrwienia mózgu. Jednak efekty sygnalizacji ERK1/2 i mechanizmy działania różnią się w zależności od modelu niedokrwienia [73], [74], [75]. Aktywowany (fosforylowany) ERK1/2 przechodzi do jądra komórkowego, gdzie aktywuje liczne czynniki transkrypcyjne, reguluje ekspresję genów oraz wpływa na wiele funkcji komórkowych, ostatecznie indukując procesy naprawcze lub śmierć komórki [76]. Aktywacja ERK w mikrogleju moduluje sygnalizację zapalną, aktywność fagocytarną i ekspresję cytokin. W modelu przejściowej okluzji tętnicy środkowej mózgu (tMCAO, z ang. *transient middle cerebral artery occlusion*) aktywacja kanałów potasowych BK (z ang. *big potassium*) zwiększa ekspresję p-ERK1/2 w mikrogleju i sprzyja usuwaniu szczątków neuronów [77]. Ponadto, aktywacja ERK może hamować translokację NF- κ B do jądra w komórce mikrogleju, tym samym hamując prozapalną polaryzację M1 [78].

1.2.2. Układ dopełniacza

Reakcja zapalna po asfiksji okołoporodowej jest jednym z kluczowych czynników odpowiedzialnych za uszkodzenie OUN. Charakteryzuje się aktywacją mikrogleju, migracją makrofagów obwodowych, uwalnianiem cytotoksycznych i prozapalnych cytokin i chemokin oraz fagocytozą uszkodzonych i nieuszkodzonych neuronów [45], [79], [80]. Rosnąca liczba badań wskazuje, że układ dopełniacza jest również ważnym składnikiem odpowiedzi zapalnej oraz odgrywa kluczową rolę w promowaniu neurodegeneracji po niedotlenieniu-niedokrwieniu [81]. Układ dopełniacza składa się z ponad 50 różnych białek związanych z osoczem i błoną komórkową, działających synergistycznie. Aktywacja dopełniacza obejmuje kaskadę reakcji enzymatycznych i nieenzymatycznych. Istnieją trzy ścieżki aktywacji – klasyczna, alternatywna i lektynowa – wszystkie prowadzą do powstania dwóch kluczowych enzymów, konwertazy 3 (C3) i konwertazy 5 (C5), a w końcowym etapie do utworzenia kompleksu

atakującego błonę (MAC, z ang. *membrane attack complex*), co prowadzi do przerwania ciągłości błony komórkowej, a w konsekwencji do śmierci komórki [82], [83], [84] (Ryc. 2).

Szlak klasyczny aktywowany jest poprzez wiązanie kompleksów przeciwciało-antygen, komórek apoptotycznych, białka C-reaktywnego (CRP, z ang. *C-reactive protein*) lub pęcherzyków neuronalnych z białkiem C1q. Szlak lektynowy inicjowany jest poprzez wiązanie lektyny wiążącej mannozę (MBL) z resztami mannozowymi obecnymi na powierzchni patogenu. Szlak alternatywny może być aktywowany spontaniczną hydrolizą składnika C3, pełni jednak również rolę pętli amplifikacyjnej dla pozostałych szlaków. Wszystkie trzy drogi aktywacji zbieżnie prowadzą do enzymatycznego rozszczepienia białka C3 – centralnej cząsteczki układu dopełniacza, która warunkuje jego funkcje. Białko dopełniacza C3 jest rozszczepiane przez konwertazę C3 na dwa fragmenty: C3a, który aktywuje komórki tuczne i makrofagi oraz sprzyja rozwojowi stanu zapalnego, oraz C3b, który pełni funkcję opsoniny dla drobnoustrojów. W kolejnym etapie kaskady aktywacyjnej dochodzi do rozszczepienia składnika C5 na C5a – będącego mediatorem odpowiedzi zapalnej – oraz C5b, który wiąże się z C6, C7, C8 i C9, tworząc kompleks atakujący błonę (MAC, C5b-9). Podstawową funkcją układu dopełniacza jest opsonizacja – „znakowanie” patogenów i uszkodzonych komórek przez białka dopełniacza, co prowadzi do ich eliminacji przez krążące makrofagi, które posiadają na swojej powierzchni receptory dla białek dopełniacza. MAC może również stymulować komórki do uwalniania cząsteczek zapalnych. Co więcej, białka C3 i C5 mogą rekrutować leukocyty do miejsc uszkodzenia. Po niedokrwieniu, białka dopełniacza przechodzą przez uszkodzoną barierę krew-mózg do mózgu, chociaż mogą być również wytwarzane lokalnie w OUN, głównie przez komórki glijowe – mikroglej i astrocyty, ale także przez neurony [85], [86], [87]. Na powierzchni komórek mikrogleju występują licznie receptory dla białek C1q i C3, które odgrywają kluczową rolę w fagocytozie połączeń nerwowych [88], [89], [90]. Astrocyty są głównym źródłem białka C3 [91] i dodatkowo wyrażają białka C4 i C9 [92]. Co więcej, neuronalna ekspresja białek dopełniacza, takich jak C1q, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 i C9, a także receptorów C5a i C3a została potwierdzona zarówno w badaniach *in vivo*, jak i *in vitro* [93], [94], [95]. Ostatnie doniesienia wskazują na udział białek układu dopełniacza w neurogenezie i eliminacji synaps [96], [97]. Wykazano, że białka C1q i C3 opsonizują słabsze synapsy, przeznaczone do eliminacji przez fagocytozę, poprzez interakcję ze specyficznym receptorem obecnym na mikrogleju. Ze względu na tę rolę, mikroglej jest obecnie uważany za czwarty składnik „synapsy czterocłonowej”, oprócz astrocytów oraz zakończeń pre- i postsynaptycznych [98]. Eliminacja zbędnych synaps jest niezwykle ważnym

krokiem w rozwoju OUN, determinującym tworzenie precyzyjnych połączeń synaptycznych. Z drugiej strony, nadmierna aktywacja układu dopełniacza może być odpowiedzialna za patofizjologię szeregu schorzeń. Dane opublikowane przez zespół Michailidou (2018) w mysim modelu eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE) wskazują, że oś C1q-C3 odgrywa kluczową rolę w utracie synaps [99]. Silna akumulacja obu składników dopełniacza w synapsach i ich kolokalizacja z receptorem dla białka C3 pośredniczą w przekazywaniu sygnałów, które mogą zwiększać dostępność synaps do fagocytozy przez mikroglej [100]. Aktywacja dopełniacza po niedokrwieniu u dorosłych gryzoni promuje stres neuronów poprzez oznaczanie nie tylko uszkodzonych, ale także zdrowych neuronów do eliminacji przez mikroglej, co przyczynia się do ich eliminacji i nadmiernego uszkodzenia sieci synaptycznych [101]. U myszy, u których wywołano udar zatorowy, aktywacja dopełniacza i opsonizacja synaps hipokampa przez składnik dopełniacza C3b spowodowała ciągłą, zależną od mikrogleju fagocytozę tych synaps, prowadzącą do utraty gęstości synaptycznej [102]. Przedstawione powyżej wyniki badań na dorosłych modelach zwierzęcych wykazały, że w ostrej fazie po urazie niedokrwinnym indukowana jest śmierć neuronów, a aktywacja układu dopełniacza przyczynia się do niszczenia połączeń synaptycznych przez mikroglej. Natomiast w późnej fazie układ dopełniacza bierze udział w przebudowie sieci neuronalnej i jest zaangażowany w neurogenezę oraz przyczynia się do regeneracji uszkodzonej tkanki [81], [103].

1.2.2.1. Rola układu dopełniacza w asfiksji okołoporodowej

Rola układu dopełniacza w uszkodzeniu mózgu noworodka w następstwie niedotlenienia-niedokrwienia nie jest do końca poznana. Aktywację dopełniacza w OUN wykazano w modelach HIE u gryzoni [104]. Ponadto, nieliczne dostępne badania kliniczne przeprowadzone u noworodków dotkniętych encefalopatią niedotlenieniowo-niedokrwinną wskazały na aktywację układu dopełniacza w mózgu i/lub w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF, z ang. *cerebrospinal fluid*) [105], [106]. Wyniki badań dotyczących hamowania aktywności układu dopełniacza w zwierzęcych modelach asfiksji okołoporodowej są niejednoznaczne. Wykazano, że podawanie inhibitora dla układu dopełniacza – czynnika jadu kobry (CVF, z ang. *cobra venom factor*) zmniejszało rozmiar uszkodzenia mózgu oraz atrofii u noworodków szczurzych w modelu neonatalnej HI, a także obniżało ekspresję składnika C3 [104]. Natomiast późniejsze badania prowadzone przez grupę Figueroa nie potwierdziły korzystnego efektu podawania CVF [107]. Opisano również korzystny efekt zahamowania klasycznej, zależnej od C1q, ścieżki aktywacji po niedotlenieniu-niedokrwieniu u myszy [108].

Wyciszenie genu C1q zapewniało istotną i długotrwałą neuroprotekcję, przejawiającą się zmniejszeniem obszaru uszkodzenia oraz poprawą funkcji poznawczych w porównaniu z myszami typu dzikiego. Ta sama grupa badawcza udowodniła ponadto, że neurony myszy C1q(-/-) wykazują większą odporność na niedotlenienie-niedokrwienie, co związane jest z zachowaną funkcją mitochondrialnego oddychania w komórkach oraz ze zmniejszoną produkcją reaktywnych form tlenu. Wyniki te podkreślają znaczenie klasycznej, ścieżki aktywacji układu dopełniacza po asfiksji okołoporodowej.

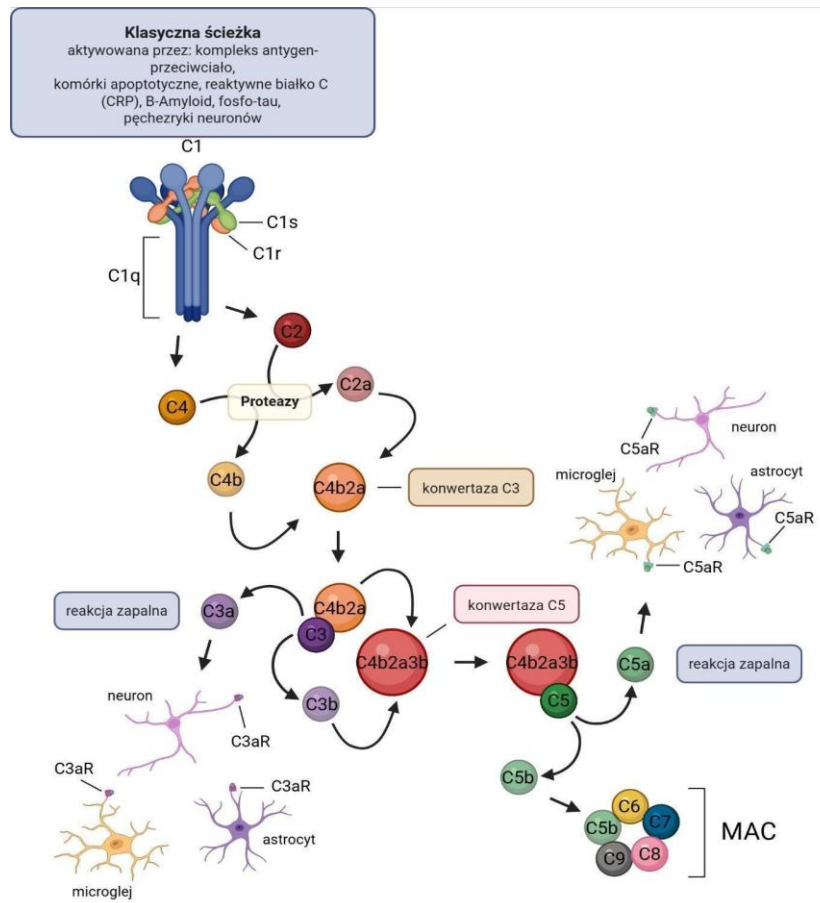
Z drugiej strony, wyniki badań Järlestedt i wsp. (2013) sugerują, że peptyd C3a działa neuroprotekcynie w przypadku uszkodzeń mózgu wywołanych neonatalną hipoksją-ischemią [109]. Korzystny wpływ C3a został również potwierdzony przez wyniki opublikowane przez Morán i wsp. (2017) oraz Pozo-Rodrigálvarez i wsp. (2021) [110], [111]. Wykazano, że podanie C3a drogą donosową zmniejszyło neurodegenerację oraz reaktywną glejozę w hipokampie i łagodziło upośledzenie funkcji poznawczych wywołane przez HI.

Kolejnym etapem aktywacji klasycznej ścieżki dopełniacza jest konwersja C5, co prowadzi do powstania rozpuszczalnego białka C5a oraz C5b, które wiąże się z błoną komórkową. Prozapalne C5a, działając poprzez receptor C5aR znajdujący się przede wszystkim w mikrogleju, uczestniczy w rekrutacji i aktywacji leukocytów oraz przyspiesza uszkodzenie mózgu po niedokrwieniu. Wzrost poziomu białek C5a i C5aR obserwowano po neonatalnej HI u myszy, natomiast, terapeutyczna hipotermia obniżała ekspresję obu białekco w konsekwencji miało efekt neuroprotekcyny [112].

Ostatnim składnikiem powstającym w wyniku aktywacji klasycznej ścieżki dopełniacza jest C9. Składnik dopełniacza C9 jest głównym białkiem cytolitycznym, które łączy się z kompleksem MAC i prowadzi do niszczenia błon komórkowych. Badania przeprowadzone przez Schultza i wsp. (2005) *post mortem* (z łac. pośmiertnie) na mózgach noworodków po HIE, wykazały złogi C9 w neuronach hipokampa [105]. Inne badania wykazały, że u noworodków myszy z wyciszonym genem C9 zmniejszyło się poischemiczne uszkodzenie mózgu, podczas gdy odwrotne działanie zauważono po podaniu C9 [113]. Zgodnie z naszą wiedzą, brak jest informacji dotyczących roli układu dopełniacza w procesie eliminacji synaps po neonatalnej HI.

Przedstawione badania wskazują, że hamowanie reakcji zapalnej, w tym kaskady układu dopełniacza, spowodowanej okołoporodowym niedotlenieniem-niedokrwieniem, może mieć działanie neuroprotekcyjne. Należy jednak podkreślić, że osłabienie aktywności układu

dopełniacza w niedojrzałym mózgu może mieć również niekorzystne konsekwencje, ponieważ jest on zaangażowany w procesy rozwojowe i regeneracyjne [81]. Dlatego istnieje potrzeba opracowania strategii terapeutycznej, która może modulować aktywność układu dopełniacza po HI bez całkowitego blokowania jego korzystnych funkcji w rozwijającym się mózgu.

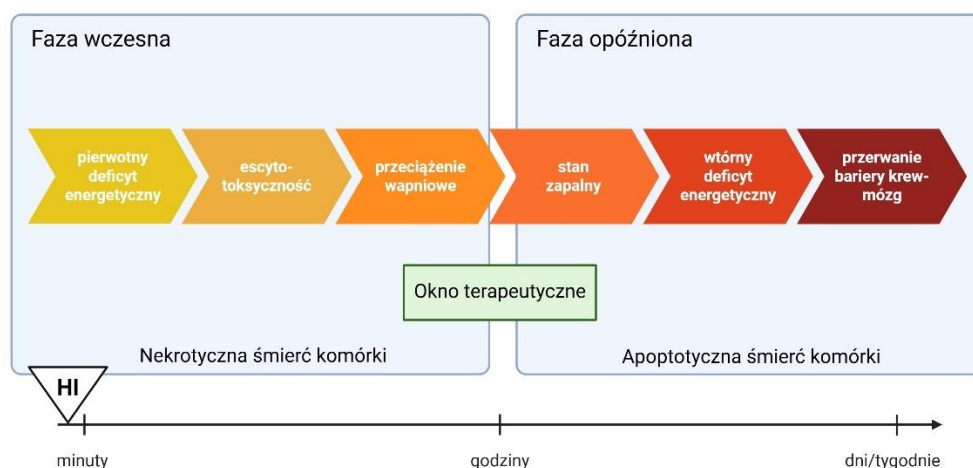


Rycina 2. Schemat aktywacji układu dopełniacza w warunkach niedotlenienia-niedokrwienia. Klasyczny szlak jest uruchamiany przez wiązanie kompleksów przeciwciało-antygen, komórek apoptotycznych, CRP, β -amyloidu, fosfo-tau lub pęcherzyków neuronalnych do C1q. C1 składa się z C1q, C1r i C1s, a wiązanie C1q z wymienionymi składnikami zmienia konformację C1 i aktywuje proteazę C1s. Aktywna C1s rozszczepia C4 do C4a i C4b oraz C2 do C2a i C2b, a także tworzy konwertazę C3 (C4b2a), która rozszczepia C3 na dwa fragmenty, C3b, który może opsonizować patogeny mikrobiologiczne, oraz C3a, który aktywuje komórki tuczne i makrofagi oraz promuje stan zapalny. C3b może wiązać się z C4b2a, tworząc konwertazę C5 (C4b2a3b). C5 jest rozszczepiany, tworząc C5a, który promuje stan zapalny i C5b, który wiąże się z C6, C7, C8 i C9 i tworzy kompleks atakujący błonę (MAC), który umożliwia lizę komórek. Zmodyfikowano na podstawie pracy Ziaska i wsp. (2025) [114]. Rycina utworzona przy pomocy programu BioRender.com.

1.3. Metody leczenia encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej

Liczba zgonów noworodków na świecie w ciągu ostatnich blisko 30 lat zmniejszyła się ponad dwukrotnie – z 5 milionów w 1990 roku do 2,3 miliona w 2022 roku [4]. Główna przyczyna tego spadku to znaczna poprawa opieki okołoporodowej. Jednak w 2022 r. prawie połowa (47%) wszystkich zgonów dzieci w wieku poniżej 5 lat miała miejsce w okresie noworodkowym (do 28 dnia życia) [4]. Dlatego też poszukiwanie skutecznych metod leczenia oraz prowadzenie badań klinicznych dotyczących nowoczesnych terapii schorzeń noworodków stanowi poważne wyzwanie zarówno dla badaczy, jak i dla przemysłu farmaceutycznego. W okresie noworodkowym, z uwagi na szybkie zmiany rozwojowe, istnieje wysokie ryzyko wystąpienia poważnych skutków ubocznych stosowania nowych leków [115]. Dlatego nieustannie istnieje potrzeba prowadzenia badań, które pozwolą lepiej zrozumieć mechanizmy zaburzeń szczególnie dotyczących tą niezwykle wrażliwą grupę pacjentów.

W patogenezie hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu wyróżnia się dwie fazy: fazę wczesną i fazę opóźnioną. W fazie wczesnej pierwotne uszkodzenie neuronów rozpoczyna się już w ciągu kilku minut po zatrzymaniu dopływu krwi do mózgu. Do fazy opóźnionej dochodzi po ok. 6 godzinach po niedokrwieniu-niedotlenieniu. W czasie tych pierwszych 6 godzin występuje tzw. „okno terapeutyczne”, w którym można próbować zatrzymać lub zniwelować dalsze uszkodzenia mózgu między innymi poprzez hamowanie odpowiedzi zapalnej [33] (Ryc. 3).



Rycina 3. Schemat chronologii procesów zachodzących w mózgu po urazie niedotlenieniowo-niedokrwiennym. W fazie wczesnej uszkodzenia mózgu po urazie niedotlenieniowo-niedokrwiennym dochodzi do głębokiego kryzysu energetycznego w neuronach, nadmiernego pobudzenia receptorów NMDA (ekscytotoksyczności) i napływu jonów wapnia do wnętrza komórek. Prowadzi to do uruchomienia procesów skutkujących nekrotyczną śmiercią neuronów. W fazie opóźnionej, sygnały pochodzące z umierającej tkanki aktywują komórki stanu zapalnego. Dochodzi do wtórnego kryzysu energetycznego. Czynniki wydzielane przez komórki stanu zapalnego powodują rozszczelnienie bariery krew-mózg. Wskutek tego dochodzi do powiększenia obszaru uszkodzenia. Obecnie badania skupiają się na zahamowaniu rozwoju stanu zapalnego w uszkodzonym mózgu. Rycina utworzona przy pomocy programu BioRender.com.

Pomimo coraz szerszej wiedzy o mechanizmach patologicznych, które towarzyszą encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej, prowadzących do śmierci komórek nerwowych, dotychczas nie opracowano skutecznego postępowania, które mogłoby zapobiec uszkodzeniu mózgu noworodka lub choćby ograniczyć jego konsekwencje.

Terapia u dzieci, u których wystąpiło niedotlenienie-niedokrwienie okołoporodowe, skupia się głównie na leczeniu objawowym. U takich pacjentów monitoruje się poziom glukozy, ciśnienie tętnicze oraz farmakologicznie kontroluje drgawki [116]. Zgodnie z europejskimi wytycznymi resuscytacji od 2010 roku, u noworodków z encefalopatią niedotlenieniowo-niedokrwienną jako metodę neuroprotekcji ośrodkowego układu nerwowego stosuje się hipotermię (obniżenie temperatury wewnętrznej organizmów stałocieplnych poniżej normalnego zakresu jej zmian). Pomaga to zapobiegać zapaści energetycznej i w konsekwencji śmierci neuronów, a także zmniejsza nasilenie drgawek i ogranicza reakcje zapalne [117]. Wyróżnia się dwie techniki chłodzenia: pierwsza to selektywne chłodzenie mózgu (SBC, z ang. *selective brain cooling*) [118], a druga to wprowadzenie dziecka w hipotermię ogólną (WBC,

z ang. *whole body cooling*) [119]. Stosowanie hipotermii terapeutycznej polega na obniżeniu temperatury ciała noworodka do 33,5-34°C w ciągu pierwszych 6 godzin życia i utrzymaniu jej przez następne 72 godziny. Pierwsze badania pilotażowe dotyczące leczenia encefalopatii hipoksyjno-ischemicznej tą metodą rozpoczęły się na początku XXI wieku, a ich podstawą były obiecujące wyniki doświadczeń na modelach zwierzęcych [120], [121], [122], [123], [124]. Metoda ta szybko została wprowadzona do badań klinicznych, które porównywały efekty obniżania temperatury całego ciała i głowy. Jednakże efektywność stosowania hipotermii zależy od wielu czynników, takich jak czas rozpoczęcia terapii, etiologia i zakres uszkodzenia. Optymalne efekty terapeutyczne są widoczne głównie w przypadku umiarkowanej i lekkiej ENN [125]. Stosowanie hipotermii skutkuje zmniejszeniem liczby poważnych powikłań, takich jak padaczka czy porażenie mózgowie [126]. Istnieją jednak przeciwwskazania do stosowania tej terapii, takie jak niska masa urodzeniowa noworodków (<1500 g) czy przedwczesny poród, ponieważ obniżenie temperatury ciała może w takich przypadkach prowadzić do zwiększonej śmiertelności [127]. Pomimo obiecujących wyników hipotermii, dzieci w wieku szkolnym, u których zastosowano tą terapię w okresie noworodkowym, borykały się problemami neurorozwojowymi, w tym zaburzeniami istoty białej [128].

Zrozumienie mechanizmu śmierci komórek nerwowych wywołanej urazem niedotlenieniowo-niedokrwiennym pozwoliło na opracowanie różnych strategii terapeutycznych. Na platformie ClinicalTrials.gov, prowadzonej przez amerykański Narodowy Instytut Zdrowia, zarejestrowano od 1999 roku 226 różnych badań klinicznych dotyczących leczenia encefalopatii hipoksyjno-ischemicznej [129]. Niemal jedna trzecia z tych badań dotyczy hipotermii terapeutycznej. Aktualnie rozważane są alternatywne metody leczenia, takie jak zastosowanie mannitolu czy erytropoetyny, jednak również one wiążą się z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych, m.in. zaburzeń funkcji nerek [130]. W ramach badań klinicznych, oprócz mannitolu i erytropoetyny, analizowane są również inne związki, takie jak: melatonina, allopurynol, siarczan magnezu, topiramid [131], [132], [133], [134]. Z kolei badania przedkliniczne skupiają się na zastosowaniu przeciwutleniaczy (np. resweratrolu), substancji przeciwzapalnych (np. azytromycyny) oraz związków zmniejszających ekscytotoksyczność, jak agoniści receptorów kannabinoidowych [134]. Wśród nowych strategii terapeutycznych rosnącą popularnością cieszą się leki biologiczne, takie jak allogeniczne preparaty komórkowe czy autologiczne komórki macierzyste z krwi pępowinowej. W ostatnich latach na znaczeniu zyskują również komórki macierzyste obecne w kobiecym mleku [135]. Badania przedkliniczne wskazują, że komórki macierzyste mogą

działać poprzez modulowanie reakcji zapalnej lub wspomaganie neurogenezy [136], [137], [138].

W leczeniu niedotlenienia-niedokrwienia okołoporodowego, w trakcie badań znajduje się zastosowanie tzw. małych cząsteczek, w tym inhibitorów deacetylaz histonów (HDACis, z ang. *histone deacetylases inhibitors*). Substancje te wykazują właściwości neuroprotektcyjne oraz mogą stymulować neurogenezę w uszkodzonej tkance mózgowej [139], [140], [141]. Zmiany strukturalne chromatyny, które wpływają na regulację ekspresji wielu genów, odgrywają kluczową rolę w procesach epigenetycznych. Modyfikacje histonów, takie jak acetylacja i deacetylacja, mają charakter odwracalny, co czyni je potencjalnym celem terapeutycznym. Dzięki nim możliwe jest przywrócenie prawidłowej ekspresji genów, które zostały zaburzone wskutek uszkodzenia mózgu [142], [143], [144].

1.4. Modyfikacje epigenetyczne

Istnieje coraz więcej dowodów na to, że modyfikacje epigenetyczne są związane z patogenezą wielu schorzeń, w tym niedokrwienia mózgu. Ponieważ zmiany epigenetyczne są odwracalne, mogą one pomóc w opracowaniu nowych podejść terapeutycznych do leczenia urazów niedokrwiennych.

1.4.1. Organizacja chromatyny w jądrze komórkowym

Podstawową jednostką organizacyjną DNA (kwas deoksyrybonukleinowy, z ang. *deoxyribonucleic acid*) eukariotycznego jest nukleosom, który składa się z histonów – zasadowych białek. Rdzeń nukleosomu tworzy oktamer histonowy, złożony z czterech histonów (H3-H4) oraz dwóch par dimerów histonów (H2A-H2B), na który nawinięte jest DNA o długości około 200 par zasad. Stabilność nukleosomu zapewnia histon łącznikowy H1. Domeny N-końcowe histonów, które wystają poza rdzeń, podlegają różnorodnym modyfikacjom, takim jak acetylacja, metylacja, fosforylacja czy ubikwitynacja. Procesy acetylacji i deacetylacji histonów, przeprowadzane przez enzymy jądrowe – acetylotransferazy (HATs, z ang. *histone acetyltransferases*) i deacetylazy (HDACs, z ang. *histone deacetylases*), mają istotny wpływ na regulację replikacji i transkrypcji. Acetylacja/deacetylacja reszt lizynowych w histonach jest kluczową potranslacyjną modyfikacją białek, odpowiedzialną za regulację krytycznych szlaków wewnątrzkomórkowych. Te modyfikacje zmieniają dostępność chromatyny dla enzymów biorących udział w replikacji (takich jak polimeraza DNA, helikaza, topoizomeraza) oraz dla enzymów i czynników transkrypcyjnych, które uczestniczą

w transkrypcji DNA. HATs katalizują acetylację reszt lizyny histonów, rozluźniają chromatynę i odsłaniają miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, będąc w ten sposób koaktywatorami transkrypcji, podczas gdy HDACs, deacetylują reszty lizyny, co może powodować kompresję kompleksu DNA/histon, przyczyniać się do kondensacji chromatyny i utrudniać przyłączanie się do niej czynnikom transkrypcyjnym, są więc korepresorami transkrypcji [145], [146]. Co więcej, HDACs i HATs modyfikują dużą liczbę białek niehistonowych, które mogą wpływać na różne procesy wewnątrzkomórkowe.

1.4.2. Deacetylazy histonów

Deacetylazy histonów to kompleksy białkowe złożone z wielu podjednostek. Działając poprzez zmniejszenie acetylacji reszt lizynowych w histonach, prowadzą do większej kondensacji chromatyny i hamowania transkrypcji wybranych genów [147], [148]. Wyodrębniono wśród nich dwie rodziny i cztery klasy, opierając się na lokalizacji ich występowania, aktywności enzymatycznej i podobieństwach strukturalnych (Tabela 1). Dotychczas zidentyfikowano 18 enzymów HDAC, które przypisano do odpowiednich klas [149]. Enzymy z pierwszej i drugiej klasy odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. Badania wykazały, że HDAC1 wspomaga różnicowanie progenitorów neuralnych w kierunku komórek glejowych, podczas gdy HDAC2 sprzyja różnicowaniu progenitorów w neurony, hamując ekspresję genów glejowych. Deacetylazy z klasy III, tzw. sirtuiny, wymagają obecności utlenionego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺, z ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*) do pełnej aktywacji [150]. Z kolei HDAC11, ze względu na swoją odmienną strukturę, należy do oddzielnej, czwartej klasy.

Tabela 1. Klasyfikacja deacetylaz histonów

Klasa HDACs	Podklasa HDACs	Przedstawiciele	Lokalizacja w komórce
I	Ia	HDAC1	Jądro komórkowe
		HDAC2	
	Ib	HDAC3	
	Ic	HDAC8	
II	IIa	HDAC4	Jądro komórkowe i cytoplazma, dodatkowo HDACs podklasy IIa mają zdolność translokacji między tymi kompartmentami komórkowymi
		HDAC7	
		HDAC5	
		HDAC9	
	IIb	HDAC6	
		HDAC10	
III		SIRT1,2,3,4,5,6,7	Jądro komórkowe
IV		HDAC11	Jądro komórkowe/cytoplazma

Również białka niehistonowe mogą stanowić substraty dla deacetylaz. Należą do nich czynniki transkrypcyjne, jądrowe receptory wiążące DNA oraz białka strukturalne i chaperonowe. W kontekście terapeutycznym, szczególne nadzieje pokłada się w inhibitorach deacetylaz histonów, które mogą mieć zastosowanie w leczeniu lub łagodzeniu skutków uszkodzeń mózgu w okresie okołoporodowym [151], [152].

1.4.3. Inhibitory deacetylaz histonów

Inhibitory deacetylaz histonów to zróżnicowana grupa substancji, obejmująca zarówno związki naturalne, jak i syntetyczne [153]. W zależności od struktury chemicznej, można wyróżnić kilka klas inhibitorów HDACs, takich jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kwasy hydroksyaminowe, cykliczne tetrapeptydy zawierające resztę epoksyketonu, cykliczne tetrapeptydy bez tej reszty oraz benzoamidy (Tabela 2) [154], [155], [156]. Pierwszym zdefiniowanym inhibitorem był kwas masłowy. Archer i Hodin (1999) wykazali, że oprócz inhibicji HDACs, wpływa także na metylację DNA oraz fosforylację i metylację białek histonowych [157]. Inhibitory deacetylaz działają jako odwracalne inhibitory kompetycyjne. Ich alifatyczne łańcuchy wbudowują się w miejsce aktywne HDACs, chelatując obecny tam jon Zn^{2+} i blokując aktywność enzymu. W wyniku tego procesu dochodzi do wzrostu acetylacji histonów. Skutkuje to powstaniem chromatyny o bardziej otwartej strukturze, odsłonięcia

miejsce przyłączenia czynników transkrypcyjnych i wznowienia ekspresji genów, które były wcześniej wyciszone.

Tabela 2. Klasyfikacja inhibitorów deacetylaz histonów

Klasa HDACi	Przykłady	Swoistość substratowa
Kwasy hydroksyaminowe	SAHA	HDAC1,2,3,4,6,7,9
	TSA	HDAC1,2,3,4,6,7,9
	Penobinostat	HDAC1,2,3,4,7,9
	Belinostat	HDAC II, HDAC6
	Dacinostat	HDAC i i II
	PCI24781	HDAC I
Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe	Maślan sodu	HDAC I, HDAC IIa
	VPA	HDAC II, HDAC IIa
	AN-9	brak danych
Cykliczne tetrapeptydy	Apicidin	HDAC i i HDAC II
	Romidepsyna	HDAC1, 2,4,6
Benzamidy	Entinostat	HDAC1,2,3,9
	Mocetinostat	HDAC1,2,3,11
	CI-994	brak danych

1.4.3.1. Działanie neuroprotecyjne inhibitorów deacetylaz histonów

W ostatnich latach przeprowadzono liczne badania, w których wykazano, że stosowanie inhibitorów deacetylaz histonów w leczeniu urazów mózgu oraz chorób neurodegeneracyjnych przynosi obiecujące efekty terapeutyczne. Wyniki badań opublikowane w ostatniej dekadzie dostarczyły znaczących dowodów na to, że inhibitory deacetylaz histonów są obiecującą grupą substancji wykazujących działanie neuroprotecyjne i przeciwzapalne w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu.

Pierwszymi inhibitorami, na których skupiono badania naukowe były kwas walproinowy (VPA, z ang. *valproic acid*), maślan sodu (SB, z ang. *sodium butyrate*) i trichostatyna A (TSA) [158], [159]. Wykazano, że kwas walproinowy pokonuje barierę krew-mózg oraz hamuje aktywność deacetylaz klasy I i IIa. Co więcej, VPA jest już zatwierdzoną substancją stosowaną jako lek w leczeniu padaczki oraz w stabilizacji nastroju [160]. W eksperymentalnym modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu (okluzji tętnicy środkowej mózgu, MCAO, z ang. *middle cerebral artery occlusion*) u dorosłych zwierząt, podanie tych inhibitorów HDAC prowadziło do zmniejszenia rozmiaru uszkodzenia kory mózgowej, spadku liczby komórek mikrogleju, zahamowania ich aktywacji i obniżenia poziomu innych markerów

stanu zapalnego oraz poprawy funkcji neurologicznych. Dodatkowo, w obszarach neurogennych zaobserwowano intensyfikację proliferacji progenitorów neuralnych, które migrowały do miejsc uszkodzenia i różnicowały się w kierunku komórek neuronalnych [139], [161]. W innych badaniach wykazano, że zastosowanie inhibitorów HDACs w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu chroniło barierę krew-mózg oraz redukowało obrzęk mózgu przez obniżenie ekspresji czynnika jądrowego NF- κ B i MMP-9 [162]. Ponadto zaobserwowano, że zastosowanie HDACis skutkowało spadkiem ekscytotoksyczności oraz wzrostem liczby prawidłowych, nieuszkodzonych mitochondriów w aksonach i oligodendrocytach. Jednocześnie inhibicja HDACs zmniejszała demielinizację aksonów i miała działanie ochronne na oligodendrocyty [141], [152], [156], [163]. Wykazano, że dzięki zastosowaniu inhibitorów HDACs hamowano aktywność astrocytów i mikrogleju. Prowadziło ono również do obniżenia poziomu czynników prozapalnych, przy jednoczesnym wzmocnieniu ekspresji czynników przeciwzapalnych [164], [165]. Pomimo licznych badań, molekularny mechanizm neuroprotekcijnego działania inhibitorów HDAC po ischemii nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Wykazano, że podanie inhibitorów HDACs po niedotlenieniu mózgu prowadzi do obniżenia ekspresji białek o właściwościach pro-apoptotycznych, takich jak czynnik transkrypcyjny p53, czynnik transkrypcyjny CHOP (z ang. *C/EBP homologous protein*), czynnik indukujący apoptozę AIF (z ang. *apoptosis inducing factor*), czy kaspaza-3, jednocześnie zwiększając ekspresję białek z rodziny Bcl-2, które mają działanie przeciwapoptotyczne [139], [166]. Inhibitory HDACs podnoszą również poziom białka szoku cieplnego HSP70, które pełni rolę kluczowego mediatora przeżywalności komórek, zapobiegając aktywacji czynników indukujących apoptozę (AIF, APAF (z ang. *apoptotic protease activating factor*)). Ponadto HDACis zwiększają poziom mózgowego czynnika neurotroficznego (BDNF, z ang. *brain-derived neurotrophic factor*), który wiąże się z receptorami kinazy tyrozynowej typu B (TrkB, z ang. *receptor tyrosine kinases B*), aktywując wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, które wpływają na różnicowanie i przeżywalność komórek. Inhibitory deacetylaz histonów, poprzez mechanizm zależny od transkrypcji, mogą modyfikować aktywność różnych czynników transkrypcyjnych, w tym NRF2 (z ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Aktywacja tego czynnika jest kluczowa w zwiększaniu odporności na stres oksydacyjny, w zaburzeniach metabolicznych oraz w przypadku udaru niedokrwienego [167]. Istnieje również mechanizm protekcynny niezależny od transkrypcji – selektywna inhibicja HDAC6 prowadzi do wzrostu acetylacji α -tubuliny, co z kolei zwiększa transport pęcherzykowy.

Badania będące podstawą prezentowanej rozprawy doktorskiej prowadzone były z wykorzystaniem maślanu sodu, który wykazuje działanie hamujące w stosunku do licznych HDAC należących do grupy I oraz IIA. Maślan sodu był pierwszą substancją endogenną zidentyfikowaną jako inhibitor HDAC i pozostaje najsilniejszym inhibitorem wśród naturalnych związków [168]. Maślan sodu, poprzez inhibicję HDAC, prowadzi do zwiększonej acetylacji histonów, co promuje transkrypcję genów związanych z redukcją apoptozy, stresem oksydacyjnym i zapaleniem oraz zwiększa ekspresję czynników neurotroficzných (BDNF), co skutkuje neuroregeneracją i naprawą tkanek po udarze mózgu [161], [169], [170]. Ponadto, maślan sodu reguluje acetylację wielu białek niehistonowych, takich jak czynniki transkrypcyjne (np. NF- κ B, HIF-1 α (czynnik indukowany hipoksją 1 α , z ang. *hypoxia-inducible factor-1 α*), białka cytoszkieletu (np. α -tubulina) oraz cząsteczki sygnalizacyjne (np. białka szoku cieplnego HSP90 (z ang. *heat shock protein 90 kilodalton*), co sugeruje, że neuroprotektoryjne działanie SB może wynikać z jego plejotropowego działania [171]. W mysim modelu okluzji tętnicy MCAO zaobserwowano, że SB pośredniczy w neuroprotekcji poprzez obniżenie ekspresji mediatorów prozapalnych (TNF α i syntazy tlenu azotu NOS2 oraz zwiększenie ekspresji mediatora przeciwzapalnego IL-10 w mikrogleju [172]. Ponadto analiza *in vitro* aktywowanego mikrogleju wykazała, że maślan sodu, zmienia transkrypcję w promotorach genów białek prozapalnych (TNF α , NOS2, czynnika transkrypcyjnego STAT1 (białko z rodziny STAT, z ang. *signal transducer and activator of transcription*), IL-6) i przeciwzapalnych (IL-10) oraz indukuje ekspresję genów szlaku przeciwzapalnego IL-10/STAT3 [172]. Badania przeprowadzone w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN, wykazały, że maślan sodu ma działanie neuroprotektoryjne w zwierzęcym modelu asfiksji okołoporodowej. Zaobserwowano zmniejszenie atrofii mózgu wywołanej HI po podaniu maślanu sodu w porównaniu ze zwierzętami nieleczonymi SB. Co więcej, badanie to wykazało również, że maślan sodu stymuluje neurogenezę po urazie niedotlenieniowo-niedokrwiennym [173]. To neuroprotektoryjne działanie SB było przynajmniej częściowo spowodowane zmniejszeniem stanu zapalnego wywołanego niedotlenieniem-niedokrwieniem. Zaobserwowano, że podawanie maślanu sodu zmniejszało liczbę aktywowanych komórek mikrogleju w niedotlenionej/niedokrwionej półkuli i promowało konwersję fenotypu mikrogleju z zapalnego M1 do przeciwzapalnego M2. Ponadto podawanie maślanu sodu hamowało produkcję markerów stanu zapalnego IL-1 β i chemokiny CXCL10 oraz blokowało wywołaną niedokrwieniem aktywację COX-2 [165], [174]. Przeciwzapalne działanie maślanu sodu potwierdzono również w modelu *in vitro*, w którym pierwotne hodowle komórek mikrogleju zostały poddane procedurze pozbawienia tlenu i glukozy (OGD). Przeprowadzając

analizę metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR, z ang. *quantitative polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction*) określono poziom mRNA w mikrogleju dla CD86, interleukiny 1 β (markery fenotypu prozapalnego M1 mikrogleju) oraz CD200 i arginazy (markery fenotypu przeciwzapalnego M2). Analiza wyników wykazała, że hodowla komórek mikrogleju poddanych procedurze OGD w obecności maślanu sodu, skutkowała znaczącym obniżeniem ekspresji markerów charakterystycznych dla fenotypu prozapalnego M1 (CD86 i IL-1 β) oraz wzrostem ekspresji CD200 i arginazy [175]. Inne badania także potwierdzają, że zastosowanie maślanu sodu powoduje przesunięcie aktywacji mikrogleju z prozapalnego fenotypu M1 do przeciwzapalnego fenotypu M2 w hodowlach pierwotnych *in vitro* stymulowanych LPS [176]. „Klasyczna” aktywacja mikrogleju/makrofagów w kierunku prozapalnego fenotypu M1 sprzyja produkcji i uwalnianiu mediatorów stanu zapalnego (cytokin, reaktywnych form tlenu, tlenku azotu (NO, z ang. *nitric oxide*), MMP), które nasilają uszkodzenie neuronów [54], [55], [177]. W przeciwieństwie do tego, „alternatywnie” aktywowany fenotyp M2 wykazuje zarówno właściwości immunosupresyjne, jak i neuroprotektoryjne ze względu na uwalnianie czynników przeciwzapalnych i neurotroficznych (IL-10, IGF, TGF- β , GDNF), które promują angiogenezę, przebudowę tkanek i neuroregenerację [61], [178], [179].

W świetle przedstawionych powyżej badań, dokładne i kompleksowe wyjaśnienie wpływu inhibitora HDAC – maślanu sodu na procesy zapalne w niedojrzałym mózgu wydaje się mieć ogromne znaczenie. Dokładny mechanizm molekularny związany z korzystnym działaniem maślanu sodu po HI nie jest do końca znany. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem hamującego działania HDACi wydaje się być zwiększenie acetylacji histonów; niemniej jednak nasze badania wykazały, że podawanie SB szczurom po procedurze HI nie zmieniło poziomu acetylacji histonu H3 [173]. Wiadomo jednak, że deacetylaza histonów ma działanie plejotropowe i reguluje również wiele cząsteczek niehistonowych, takich jak czynniki transkrypcyjne [139]. W badaniach przeprowadzonych przez Zespół z Zakładu Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN wykazano znaczny wzrost poziomu czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i spadek acetylacji α -tubuliny, w mózgach szczurów po HI, które powróciły do poziomów kontrolnych po podaniu maślanu sodu [165], [174]. W innych badaniach wykazano, że szlaki sygnałowe, takie jak PTEN/PI3K/AKT i MAP/ERK/JNK/p38, mogą być zaangażowane w modulację odpowiedzi zapalnej po niedokrwieniu [180]. Badania molekularnego mechanizmu działania maślanu sodu wymagają więc kontynuacji i dokładniejszych badań, niemniej jednak nasze wcześniejsze badania wskazują, że

neuroprotekcjne działanie SB w modelu asfiksji okołoporodowej, przynajmniej częściowo związane jest z redukcją/modulacją odpowiedzi zapalnej.

Coraz liczniejsze badania wskazują, że hamowanie stanu zapalnego może promować neuroprotekcję i ma potencjał do wykorzystania w klinicznym leczeniu niedokrwiennego uszkodzenia mózgu u noworodków [181], [182]. Wpływ maślanu sodu na aktywność układu dopełniacza po encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej jest nieznany. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że dopełniacz jest częścią odporności wrodzonej, a jego aktywność jest związana z aktywacją mikrogleju, można spekulować, że mechanizm działania tego inhibitora HDAC może również obejmować modulację układu dopełniacza.

2. Założenia i cele pracy

Realizacja niniejszej dysertacji stanowi kontynuację badań prowadzonych przez Zespół Zakładu Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN, dotyczących wpływu czynników epigenetycznych na modulację procesów indukowanych przez neonatalną hipoksję-ischemię. Uzyskane do tej pory wyniki wskazują, że maślan sodu poprzez ułatwienie konwersji komórek o fenotypie M1 do fenotypu M2 oraz obniżenie ekspresji czynników prozapalnych działa neuroprotekcynie. Wydaje się, że białka dopełniacza, oraz prowadzona za ich pośrednictwem przebudowa sieci synaptycznej może być niezwykle ważnym elementem składowym rozwoju uszkodzenia mózgu po neonatalnej HI, dlatego też wyjaśnienie roli układu dopełniacza, jaką spełnia w tym procesie, pozwoli wypełnić dotychczasową lukę w naszej wiedzy. Wpływ maślanu sodu na aktywność układu dopełniacza po asfiksji okołoporodowej jest nadal nieznany. Biorąc jednak pod uwagę, że dopełniacz jest częścią odporności wrodzonej, a jego aktywność jest związana z aktywacją mikrogleju, postawiliśmy hipotezę, że maślan sodu może również regulować układ dopełniacza oraz mieć korzystny efekt na przebudowę sieci synaptycznej wywołanej urazem niedotlenieniowo-niedokrwinnym. Ponieważ szereg wcześniejszych badań wykazało neuroprotekcyny wpływ maślanu sodu w modelu neonatalnej hipoksji-ischemii, wydaje się, że związek ten może być w przyszłości rozważany jako potencjalny lek łagodzący skutki asfiksji okołoporodowej. Dlatego też niezwykle istotne wydaje się dokładne i kompleksowe wyjaśnienie wpływu tego inhibitora na procesy zapalne w niedojrzałym mózgu.

Podstawowym celem prowadzonych badań była ocena stopnia uszkodzenia i zaburzenia cytoarchitektury ze szczególnym uwzględnieniem połączeń synaptycznych w tkance w różnym czasie po neonatalnej hipoksji-ischemii u szczura w obecności inhibitora deacetylaz histonów – maślanu sodu oraz ocena aktywności układu dopełniacza związana z przebudową synaptyczną i zaangażowanie komórek mikrogleju w ten proces.

Weryfikacja założeń badawczych opierała się na realizacji celów szczegółowych pracy:

- Ocena potencjalnego przeciwzapalnego działania maślanu sodu po hipoksji-ischemii. W tym celu została przeprowadzona analiza ekspresji mRNA (C1qa, C3, C5, C9, C3aR, C5aR – metodą qPCR) oraz białek układu dopełniacza (C3, C5 – metodą Western Blot) w półkulach mózgu zwierząt w różnym czasie po HI, w obecności i bez badanego inhibitora. Wykonano również podwójne barwienia immunohistochemiczne na materiale

pochodzącym od zwierząt poddanych procedurze HI w obecności i bez badanego inhibitora oraz zwierząt kontrolnych. Zastosowano markery znakujące dla białek synaptycznych: PSD-95 i synaptofizyny oraz dla białek C3 i C5 układu dopełniacza.

- Ocena poischemicznej modyfikacji sieci synaptycznych w mózgach zwierząt po HI po zastosowaniu maślanu sodu. W tym celu została przeprowadzona analiza ekspresji białek obecnych w błonach synaptycznych (synaptofizyna, synapsyna I, PSD-95) metodą Western Blot oraz ocena morfologiczna, ze szczególnym uwzględnieniem oceny połączeń synaptycznych, wykonana techniką mikroskopii elektronowej, w mózgach zwierząt kontrolnych oraz poddanych procedurze HI, w obecności i bez badanego inhibitora,
- Ocena wpływu maślanu sodu na funkcje lokomotoryczne oraz poznawcze u zwierząt po HI (przeprowadzenie testów behawioralnych).
- Określenie zależności pomiędzy poischemiczną modyfikacją sieci synaptycznych a ekspresją/lokalizacją białek dopełniacza w układzie *in vitro* (immunocytochemia).
- Analiza efektu maślanu sodu na morfologię i stopień skomplikowania budowy neuronów w modelu *in vitro* (analiza Sholla).
- Zbadanie wpływu maślanu sodu na profil aktywacji komórek mikrogleju po hipoksji-ischemii w układzie *in vitro*. Analiza wybranych markerów pro- i przeciwzapalnych (IL-1 β , TNF α , CD86, IL-4, arginaza 1, CD206 – metodą qPCR) oraz markerów powierzchniowych (CD86, CD206 – cytometria przepływowa).
- Zbadanie wpływu maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe np. PI3K/AKT oraz MAP kinazy/ERK (testy immunoenzymatyczne ELISA/Western Blot).

3. Materiały i metody

Wszystkie doświadczenia wykonano na zwierzętach pochodzących ze Zwierzętarni IMDiK PAN. Młode zwierzęta wykorzystywane do doświadczeń, przebywały w standardowych warunkach hodowlanych, w klatkach ze stałą wilgotnością i temperaturą około 20°C, z zachowaniem stałego fotoperiodu 12 h/12 h – światłość/ciemność, ze stałym dostępem do jedzenia, w obecności matki.

Wszystkie procedury, którym poddane zostały zwierzęta, przeprowadzono zgodnie z protokołem zatwierdzonym przez II Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (zezwolenie nr WAW2/081/2018) oraz zgodnie z Dyrektywą UE 2010/63/EU. Wszystkie metody i eksperymenty były realizowane zgodnie z obowiązującymi przepisami i wytycznymi ARRIVE.

3.1. Modele badawcze

3.1.1. Model okołoporodowego niedotlenieniowo-niedokrwiennego uszkodzenia mózgu *in vivo*

Uszkodzenie niedotlenieniowo-niedokrwiennie zostało wywołane u szczurów stada Wistar obu płci, w 7. dniu po urodzeniu (P7) poprzez trwałe jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej, a następnie przez zastosowanie niedotlenienia ogólnoustrojowego według metody zaproponowanej przez Rice'a, Vannucciego i Brierleya (1981) [183]. Na początku młode szczury zostały znieczulone izofluranem w tlenie (4% indukcja, 2% podtrzymanie), po czym lewa tętnica szyjna wspólna została wyeksponowana i trwale podwiązana za pomocą nici chirurgicznej. Czas trwania znieczulenia nie przekraczał 5 minut, aby uniknąć neuroprotekcijnego wpływu izofluranu. Po operacji młode szczury zostały umieszczone z powrotem w klatce z matką na 1 godzinę. Następnie niedotlenienie wywołano przez umieszczenie zwierząt w komorze hipoksyjnej o kontrolowanej temperaturze (około 35°C), gdzie podawano mieszanek 7,6% tlenu w azocie przez 1 godzinę. Samo podwiązanie tętnicy niewystarczająco zmniejsza perfuzję mózgu, a dodanie hipoksji jest konieczne do wywołania uszkodzenia mózgu [183]. Zwierzęta kontrolne poddano jedynie procedurze operacji pozorowanej, bez podwiązania tętnicy i bez wystawienia na warunki hipoksyjne (Ryc. 4). Po zakończeniu procedury zwierzęta zostały umieszczone w swojej klatce z matką, w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ i wilgotności $55 \pm 5\%$, w cyklu 12 h/12 h – światło/ciemność, z nieograniczonym dostępem do pokarmu. W tym modelu obserwowano uszkodzenie

hipoksyjno-ischemiczne w półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy (strona ipsilateralna) i tylko te półkule były wykorzystywane w dalszych eksperymentach.

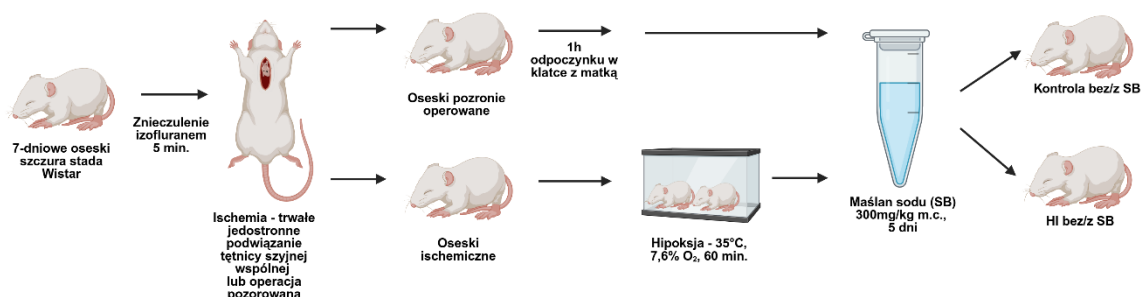
3.1.1.1. Stymulacja farmakologiczna

Maślan sodu (Sigma-Aldrich) był podawany zwierzętom podskórnym w postaci roztworu w soli fizjologicznej w dawce 300 mg/kg masy zwierzęcia raz dziennie przez 5 kolejnych dni (rozpoczynając bezpośrednio po wywołaniu HI). Maślan sodu podawano zarówno zwierzętom kontrolnym (grupa K+SB), jak i zwierzętom po HI (grupa HI+SB) (Ryc. 4). Optymalne dawki i czas podawania maślanu sodu zostały określone we wcześniejszych eksperymentach naszego Zespołu [173].

Zwierzęta losowo podzielono na 4 grupy eksperymentalne, według następującego wzorca (5 szczurów na grupę i punkt czasowy):

- 1) kontrola (K);
- 2) kontrola traktowana maślanem sodu, w celu oceny potencjalnych niepożądanych efektów podania maślanu sodu w grupach kontrolnych (K+SB);
- 3) zwierzęta po niedotlenieniu i niedokrwieniu (HI);
- 4) zwierzęta po niedotlenieniu i niedokrwieniu traktowane maślanem sodu (HI+SB).

Mózgi do dalszych procedur były izolowane 1, 3, 5, 7 i 14 dni po indukcji hipoksyji-ischemii.



Rycina 4. Schemat okoloporodowego niedotlenieniowo-niedokrwiennego modelu uszkodzenia mózgu *in vivo*. Rycina stworzona w programie BioRender.com.

3.1.1.2. Przygotowanie tkanki mózgu do dalszych analiz

W wybranych punktach czasowych (7 i 14 dni po zabiegu chirurgicznym) zwierzęta ze wszystkich grup badawczych były głęboko znieczulane za pomocą dootrzewnowej iniekcji ketaminy (100 mg/kg masy ciała) połączonej z ksylazyną (10 mg/kg masy ciała).

Do badań immunohistochemicznych, szczury perfundowano przez serce roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, z ang. *phosphate-buffered saline*) (100 mM NaCl, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄; pH 7,4), a następnie roztworem utrwalającym 4% paraformaldehydu (PFA) w PBS, przy użyciu pompy perystaltycznej typu PP1B-05A (Zalimp), z prędkością przepływu cieczy 5 ml/minutę. Mózgi wyizolowano, utrwalono przez kolejne 3 godziny w tym samym roztworze PFA w 4°C, następnie w 30% roztworze sacharozy przez 48 h, w celu uchronienia tkanki przed zniszczeniem spowodowanym zamrożeniem. Na koniec zamrożono tkankę na suchym lodzie. Półkule mózgu w kolejnym etapie zostały pokrojone (z punktu Bregma -2,80 mm Lambda 4,80 do punktu Bregma 3,40 mm Lambda 4,20) w rejonach kory mózgu i hipokampa, na skrawki grubości 30 µm, tak aby uzyskać 10 kolejnych skrawków, z wykorzystaniem kriostatu Microm HM550 (ThermoFisher). Skrawki mózgu umieszczono w płytkach 24-dołkowych w buforze chroniącym przed zamrożeniem AntiFreeze Buffer (roztwór 30% etyloglikolu (Sigma-Aldrich), 30% gliceryny (Sigma-Aldrich), 0,01 M NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich) i 0,04 M Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich)) i przechowywano w -20°C do czasu użycia.

Do analiz z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM, z ang. *transmission electron microscopy*) zwierzęta zostały perfundowane przez serce roztworem PBS, a następnie mieszaniną 2,5% roztworu glutaraldehydu (GA), 2% roztworu PFA i 0,1 M buforu kakodylowego, po czym mózgi zostały wyizolowane i inkubowane w 4°C przez 48 godzin w tej samej mieszaninie.

Analizy molekularne (qPCR) i biochemiczne (Western Blot) zostały przeprowadzone na nieperfundowanej tkance izolowanej 1, 3, 5 i 14 dni po indukcji HI lub w grupach kontrolnych w analogicznych punktach czasowych. Zwierzęta zostały znieczulone poprzez wziewne podanie izofluranu i zdekapitowane. Półkule, bez mózdzku, zostały wyizolowane, natychmiast zamrożone na suchym lodzie i przechowywane w temperaturze -80°C do momentu dalszych doświadczeń. Analizowane były tylko ipsilateralne (niedotlenieniowo-niedokrwienne) półkule (od zwierząt HI i HI+SB) oraz lewa półkula (od zwierząt K i K+SB).

3.1.2. Izolacja i współhodowla pierwotnych komórek mikrogleju i pierwotnych neuronów korowych – model *in vitro*

Hodowle neuronów i mikrogleju zostały przeprowadzone według zmodyfikowanych metod opisanych przez Vaslin i wsp. (2007), Ginet i wsp. (2014) oraz Ji i wsp. (2013), Chen i wsp. (2007), Sypecka i Sarnowska (2014), Gargaś i wsp. (2022) oraz Lui i wsp. (2016) [184] [185], [186], [187], [188], [189], [190].

Pierwotne neurony korowe zostały wyizolowane z kory mózgowej 2-dniowych szczurzych osesków (P2). Początkowo zwierzęta zostały uspię na lodzie, następnie zdekapitowane, a tkanka mózgu, bez mózdzku, wyizolowana. Z obu półkul mózgu odseparowano korę mózgu, którą w kolejnym kroku pocięto na drobne fragmenty przy użyciu skalpela chirurgicznego. Tak przygotowaną tkankę umieszczano w probówce typu falcon z pożywką utrzymującą Hbernate-A Medium (Gibco). Zawiesinę krótko wirowano, tak aby tkanka opadła na dno, a górną frakcję z pożywką usuwano. Następnie do próbki dodawano roztwór papiny (200U, Sigma-Aldrich) w zbalansowanym roztworze soli Hank'a, bez dodatku wapnia i magnezu (HBSS, z ang. *Hanks' balanced salt solution*, Gibco). Zawiesinę inkubowano w 37°C, przez 30 minut, co jakiś czas potrząsając probówką. Po inkubacji, czekano, aby na dno opadła tkanka, odciągano i odrzucano supernatant (zostawiając minimum roztworu), osadzoną tkankę zawieszano w pożywce utrzymującej i homogenizowano mechanicznie przy użyciu pipety. Następnie czekano około 1 minutę, tak aby na dno próbki opadła tylko niestrawiona/niezhomogenizowana tkanka, po czym do nowej próbki typu falcon zbierano górną frakcję z komórkami, a tkankę odrzucano. Następnie wirowano zawiesinę z komórkami przez 5 minut w 200 × g. Na koniec odrzucano supernatant, a osad zawieszano w pożywce hodowlanej DMEM GlutaMAX High Glucose (Gibco) z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS, z ang. *fetal bovine serum*, Gibco) – 10% v/v (stosunek objętościowy, z ang. *volume to volume ratio*), antybiotyku (AAS, z ang. *antibiotic antimycotic solution*, o składzie: amfoterycyna B, penicylina, streptomycyna, Gibco) – 1% v/v i suplementu NeuroBrew-21 (NB-21, MiltenyiBiotec) – 2% v/v. Neurony wysiewano w gęstości 30000 komórek/dolek na szkiełka (pokryte poli-D-lizyną (PDL, Gibco), aby zwiększyć adhezję komórek neuronowych) umieszczone na płytkach 24-dolekowych (Nunclon) i hodowano w inkubatorze o stałej wilgotności powietrza, w temperaturze 37°C, w warunkach normoksji fizjologicznej (atmosferze zawierającej 5% O₂ i 5% CO₂) [191] przez 10 dni. Niska gęstość wysiania komórek umożliwiała równomierny rozwój dendrytów, co było kluczowe przy dalszych analizach. Po 72 godzinach medium hodowlane wymieniano na pożywkę

bez surowicy Neurobasal (Gibco) z dodatkiem L-glutaminy (0,5 mM) (Sigma-Aldrich), suplementu B-27 (ThermoFisher) – 2% v/v i antybiotyku penicylina-streptomycyna (PS, ThermoFisher) – 1% v/v.

W celu izolacji komórek glejowych dwudniowe oseski szczura (P2) umieszczano na lodzie, wprowadzając je w stan letargu, a następnie poddawano dekapitacji. Wyizolowane półkule mózgu, bez mózdzka, przepłukiwano zimnym buforem PBS w celu pozbycia się zanieczyszczeń i następnie homogenizowano mechanicznie przy użyciu pipety Pasteura oraz strzykawki z igłą o średnicy 0,23 mm w zimnej pożywce DMEM GlutaMAX High Glucose z dodatkiem FBS – 10% v/v i AAS – 1% v/v. Rozdrobniona mechanicznie tkanka została przefiltrowana na sitku zawierającym membranę o średnicy porów 40 μm (Hydrophilic Nylon Net Filter), a otrzymaną zawiesinę mieszanych pierwotnych komórek glejowych wysiewano do butelek hodowlanych o powierzchni 75 cm^2 (Nunclon EasY), uprzednio pokrytych roztworem poli-L-lizyny (PLL, Sigma-Aldrich), aby zwiększyć adhezję komórek, w gęstości $9,5 \times 10^4$ komórek/ cm^2 . Hodowlę prowadzono przez 10-12 dni w inkubatorze o stałej wilgotności powietrza, w 37°C, w atmosferze zawierającej: 21% O₂, 5% CO₂. Po tym czasie przystępowano do izolacji komórek mikrogleju. W celu mechanicznej izolacji frakcji mikrogleju, butelki hodowlane umieszczano na wytrząsarce orbitalnej (Biosan) wewnątrz inkubatora i wytrząsano przez 1 godzinę (160 rpm). Po tym czasie pożywkę z odklejonymi komórkami zbierano i wirowano (5 minut, 2500 rpm), supernatant zlewano, a osad komórek zawieszano w pożywce Neurobasal bez surowicy, z dodatkiem L-glutaminy (0,5 mM), suplementu B-27 – 2% v/v i antybiotyku penicylina-streptomycyna – 1% v/v. Tak przygotowaną zawiesinę komórkową dosiewano do neuronów korowych (10 dnia ich hodowli), w stosunku 1:3 mikroglej:neurony. Współhodowlę pierwotnych neuronów korowych i pierwotnego mikrogleju hodowano w inkubatorze o stałej wilgotności powietrza, w temperaturze 37°C, w warunkach normoksji fizjologicznej (atmosferze zawierającej 5% O₂ i 5% CO₂). Pozostałe frakcje komórkowe (oligodendrocyty i astrocyty) z pierwotnej mieszanej hodowli glejowej, niestanowiące przedmiotu moich badań, były wykorzystywane do eksperymentów prowadzonych przez pozostałych członków Zakładu Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN, w celu ograniczenia liczby zwierząt doświadczalnych.

3.1.2.1. Procedura kontrolowanego deficytu tlenowo-glukozowego (OGD)

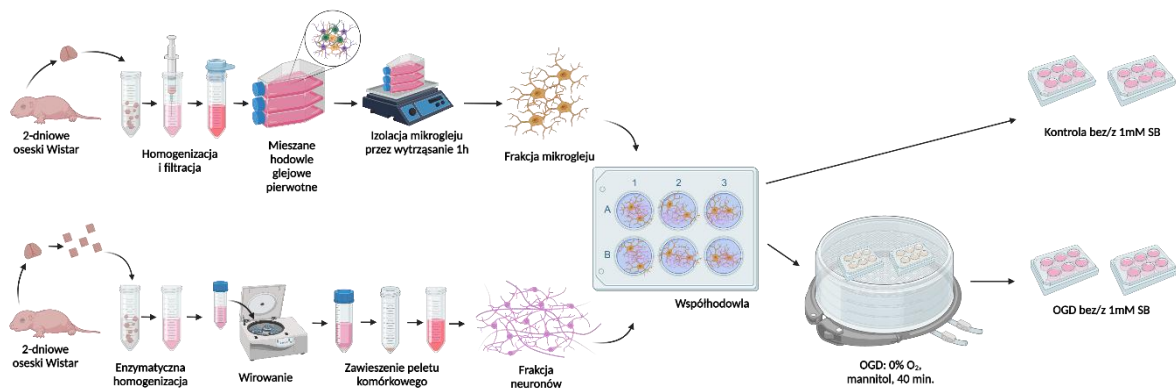
Uszkodzenie komórek symulujące uszkodzenie niedotlenieniowo-niedokrwienne, zostało wywołane na drugi dzień po wysianiu mikrogleju, poprzez usunięcie glukozy i tlenu

z ich środowiska na okres 40 minut – jest to procedura kontrolowanego deficytu tlenowo-glukozowego (OGD). W tym celu współhodowle komórek zostały umieszczone w buforze, w którym glukoza została zastąpiona roztworem Ringer'a zawierającym 10 mM mannitol. W celu usunięcia tlenu z pożywki została ona przepłukana mieszanką 95% N₂/5% CO₂ przez 10 minut, a następnie komórki były inkubowane w komorze beztlenowej wypełnionej mieszaniną gazów pozbawioną tlenu – wg. zmodyfikowanej metody Fernández-López'a i współpracowników (2005) [192]. Po 40-minutowej procedurze OGD, bufor mannitolowy został zastąpiony świeżą pożywką lub świeżą pożywką uzupełnioną o maślan sodu (Sigma-Aldrich) w stężeniu 1 mM, które zostało ustalone na podstawie naszych wcześniejszych badań [175]. W hodowlach kontrolnych (niepoddanych procedurze OGD), w tym samym czasie pożywka została wymieniona na świeżą. Dodatkowo, część współhodowli kontrolnych była hodowana w pożywce uzupełnionej o 1mM SB (Ryc. 5).

Współhodowle podzielono na 4 grupy eksperymentalne, według następującego wzorca:

- 1) kontrola (hodowle, na których nie przeprowadzano procedury OGD) (K);
- 2) kontrola traktowana maślanem sodu, w celu oceny potencjalnych niepożądanych efektów podania maślanu sodu w hodowlach kontrolnych (K+SB);
- 3) hodowle po procedurze OGD (OGD);
- 4) hodowle po procedurze OGD traktowane maślanem sodu (OGD+SB).

W dalszych etapach hodowle były prowadzone w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% O₂, 5% CO₂ i 95% wilgotności. Materiał do analiz zbierano w dwóch punktach czasowych: 24 i 72 godziny licząc od dnia przeprowadzenia procedury OGD lub w analogicznym czasie w przypadku hodowli kontrolnych.



Rycina 5. Schemat przedstawiający izolację i hodowlę pierwotnych komórek mikrogleju z pierwotnymi neuronami korowymi – model *in vitro*. Rycina przygotowana w programie BioRender.com.

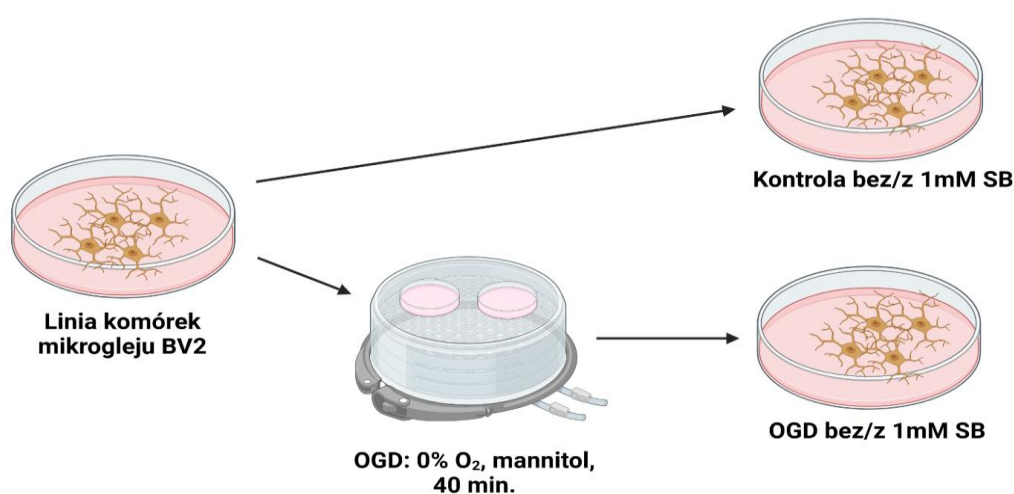
3.1.3. Hodowla komórek mikrogleju linii BV2 – model *in vitro*

W celu zoptymalizowania liczby komórek mikrogleju oraz zredukowania liczby użytych do eksperymentów zwierząt, część doświadczeń zdecydowano się przeprowadzić na komercyjnej, utrwalonej linii komórek mikrogleju BV2 (Elabscience). Hodowlę komórek mikrogleju linii BV2 prowadzono w pożywce DMEM GlutaMAX High Glucose z dodatkiem FBS – 10% v/v i AAS – 1% v/v (zgodnie z zaleceniami producenta), na szalkach hodowlanych o średnicy 10 cm (Nunc), w inkubatorze w warunkach 5% O₂, 5% CO₂, 37°C zgodnie z normoksją fizjologiczną [191]. Komórki pasażowano po osiągnięciu 80% konfluencji. Uszkodzenie hipoksyjno-ischemiczne hodowanych komórek indukowano przez eliminację ze środowiska glukozy i tlenu przez 40 minut (procedura OGD), tak jak opisano w poprzednim podrozdziale. Po procedurze OGD, bufor mannitolowy został zastąpiony świeżą pożywką bez FBS z dodatkiem antybiotyku (AAS) – 1% v/v lub świeżą pożywką DMEM GlutaMAX High Glucose bez FBS z dodatkiem antybiotyku (AAS) – 1% v/v, uzupełnioną o maślan sodu (Sigma-Aldrich) w stężeniu 1 mM (analogicznie jak w przypadku hodowli komórek pierwotnych, opisanych powyżej) (Ryc. 6).

Hodowle komórek BV2 podzielono na 4 grupy eksperymentalne, według następującego wzorca:

- 1) kontrola (hodowle, na których nie przeprowadzano procedury OGD) (K);
- 2) kontrola traktowana maślanem sodu, w celu oceny potencjalnych niepożądanych efektów podania maślanu sodu w hodowlach kontrolnych (K+SB);
- 3) hodowle po procedurze OGD (OGD);
- 4) hodowle po procedurze OGD traktowane maślanem sodu (OGD+SB).

W dalszych etapach hodowle mikrogleju BV2 były prowadzone w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% O₂, 5% CO₂ i 95% wilgotności. Materiał do analiz zbierano w dwóch punktach czasowych: 24 i 72 godziny licząc od dnia przeprowadzenia procedury OGD lub analogicznym czasie w przypadku hodowli kontrolnych.



Rycina 6. Schemat hodowli komórek mikrogleju linii BV2 – modelu *in vitro*. Rycina przygotowana w programie BioRender.com.

3.2. Barwienia immunohistochemiczne

W celu oceny wpływu maślanu sodu na zmiany w sieci synaptycznej oraz na wyrażanie/lokalizację wybranych białek dopełniacza w mózgu po urazie hipoksyjno-ischemicznym, przeprowadzono podwójne barwienie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał znakujących wybrane białka dopełniacza (C3 (ThermoFisher), C5 (ThermoFisher)) oraz białka zlokalizowane w błonie presynaptycznej i postsynaptycznej (synaptofizyna (Sigma-Aldrich), PSD-95 (ThermoFisher)). Dokładne informacje o przeciwciałach pierwszorzędowych użytych do barwień immunohistochemicznych zawarto w Tabeli 3. Skrawki mózgu zostały

umieszczone w nowej 24-dołkowej płytce i przepłukane PBS. Następnie, skrawki inkubowano w medium blokującym (10% roztwór normalnej surowicy koziej (NGS, z ang. *normal goat serum* (Sigma-Aldrich) lub 10% roztwór surowicy oślej (DS, z ang., *donkey serum* (Sigma-Aldrich) – w zależności od użytego przeciwciała pierwszorzędowego) w PBS zawierającym 0,25% Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich)) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie skrawki były inkubowane przez noc w 4°C z pierwszorzędowym przeciwciałem specyficznym dla białek dopełniacza (kozie poliklonalne przeciwciała przeciwko C3 (w rozcieńczeniu 1:500) lub królicze poliklonalne przeciwciała przeciwko C5 (w rozcieńczeniu 1:100)). Następnie skrawki przepłukano trzykrotnie PBS-em przez 5 minut, po czym inkubowano je w ciemności z odpowiednim drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z fluorochromem (Alexa Fluor 546, w rozcieńczeniu 1:500 (ThermoFisher)). W kolejnym etapie barwienia skrawki blokowano w 10% roztworze NGS w PBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (jeśli uprzednio skrawki blokowano w DS) lub trzykrotnie płukano PBS-em (jeśli poprzedniego dnia skrawki blokowano w NGS), po czym inkubowano przez noc w 4°C z pierwszorzędowym przeciwciałem przeciw białkom synaptycznym (mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko PSD-95 (w rozcieńczeniu 1:500) lub mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko synaptofizynie (w rozcieńczeniu 1:200)). Po trzykrotnym przepłukaniu PBS-em przez 5 minut, skrawki inkubowano z odpowiednim drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z fluorochromem (Alexa Fluor 488, w rozcieńczeniu 1:500 (ThermoFisher)) przez 1 godzinę w ciemności, w temperaturze pokojowej. Dokładne informacje o drugorzędowych przeciwciałach użytych do barwień immunohistochemicznych zawarto w Tabeli 4. Po kolejnych trzech 5-minutowych płukaniach w PBS, wybarwiono jądra przy użyciu fluorescencyjnego barwnika Hoechst 33258 (2 µg/ml PBS; Sigma-Aldrich) przez 20 minutową inkubację w ciemności w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki zostały ponownie przemyte trzykrotnie PBS-em (dwukrotnie przez 5 minut i jednokrotnie przez 10 minut) i umieszczone na szkiełkach mikroskopowych. Utrwalono je przy pomocy fluorescencyjnego środka zamykającego Fluorescent Mounting Medium (Dako) i pokryto szkiełkiem nakrywkowym. Następnie preparaty zostały wysuszone i poddane analizie mikroskopowej.

Tabela 3. Spis przeciwciał pierwszorzędowych użytych do immunofluorescencyjnego barwienia skrawków mózgu.

marker	przeciwciało I-rzędowe	rozcieńczenie	producent
C3	kozie przeciwciało poliklonalne IgG przeciwko C3	1:500 w 5% roztworze DS w PBS	ThermoFisher
C5	królicze przeciwciało poliklonalne IgG przeciwko C5	1:100 w 5% roztworze NGS w PBS	ThermoFisher
PSD-95	mysie przeciwciało monoklonalne IgG2a przeciwko PSD-95	1:500 w 5% roztworze NGS w PBS	ThermoFisher
Synaptofizyna	mysie przeciwciało monoklonalne IgG1 przeciwko synaptofizynie	1:200 w 5% roztworze NGS w PBS	Sigma-Aldrich

Tabela 4. Spis przeciwciał drugorzędowych użytych do immunofluorescencyjnego barwienia skrawków mózgu.

przeciwciało II-rzędowe	fluorochrom	rozcieńczenie	producent
ośle przeciwko koziemu IgG (H&L)	Alexa Fluor 546	1:500 w PBS	ThermoFisher
kozie przeciwko króliczemu IgG (H&L)	Alexa Fluor 546	1:500 w PBS	ThermoFisher
kozie przeciwko mysiemu IgG1	Alexa Fluor 488	1:500 w PBS	ThermoFisher
kozie przeciwko mysiemu IgG2a	Alexa Fluor 488	1:500 w PBS	ThermoFisher

3.3. Barwienia immunocytochemiczne

W celu określenia aktywacji układu dopełniacza i mikrogleju oraz poziomu rozgałęzienia neuronów we współhodowlach komórkowych *in vitro*, wykonano potrójne barwienia immunocytochemiczne z zastosowaniem odpowiednich markerów znakujących. Dokładne informacje o pierwszorzędowych przeciwciałach użytych do barwień immunocytochemicznych zawarto w Tabeli 5. Pierwszy etap polegał na utrwaleniu komórek wysianych na płytkę 24-dołkową. W tym celu komórki przepłukano dwukrotnie ciepłym PBS-em, następnie do każdego dołka w płytce hodowlanej dodano 0,2 ml ciepłego paraformaldehydu (stężenie: 4% PFA w PBS) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie komórki przepłukano trzykrotnie PBS-em przez 5 minut. W ostatnim płukaniu PBS zawierał dodatek 1% AAS, co umożliwiło przechowanie utrwalonego materiału w temperaturze 4°C. W celu oceny immunocytochemicznej utrwalone komórki ponownie płukano PBS-em, inkubowano przez 15 minut w roztworze 0,1% Tritonu X-100 w PBS, a następnie blokowano miejsca niespecyficznie wiążące antygeny mieszaniną blokującą: 10% roztwór normalnej surowicy koziej przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie komórki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z kurzym poliklonalnym przeciwciałem przeciw MAP2 (białko związane z mikrotubulami 2, z ang. *microtubule-associated protein 2*) (w rozcieńczeniu 1:10000, ThermoFisher). Następnie niezwiązane z antygenami przeciwciała

usuwano przez trzykrotne płukanie w PBS przez 5 min, po czym komórki inkubowano przez 1 godzinę w ciemności z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z fluorochromem (Alexa Fluor 488, w rozcieńczeniu 1:500, ThermoFisher) w temperaturze pokojowej. Komórki przepłukano ponownie PBS-em i w drugim etapie inkubowano je przez noc w 4°C z pierwszorzędowym przeciwciałem przeciw specyficznemu markerowi dla mikrogleju ED1 (mysie monoklonalne przeciwciało przeciwko CD68, w rozcieńczeniu 1:400, BioRad). Następnie komórki przepłukano trzykrotnie w PBS przez 5 minut, po czym przez 1 godzinę inkubowano je w temperaturze pokojowej (w ciemności), z odpowiednim drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z fluorochromem (Alexa Fluor 633, w rozcieńczeniu 1:500, ThermoFisher). W kolejnym etapie barwień komórki przepłukano ponownie PBS-em, a następnie zablokowano miejsca niespecyficznie wiążące antygeny mieszaniną blokującą: 10% roztworem surowicy oślej w PBS. Następnie komórki były inkubowane przez noc w 4°C z pierwszorzędowym przeciwciałem specyficznym dla białka dopełniacza (kozie poliklonalne przeciwciało przeciwko C3, w rozcieńczeniu 1:500). Po tym etapie komórki przepłukano trzykrotnie w PBS przez 5 minut, po czym inkubowano je przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w ciemności z odpowiednim drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z fluorochromem (Alexa Fluor 546, w rozcieńczeniu 1:500, ThermoFisher). Dokładne informacje o drugorzędowych przeciwciałach użytych do barwień immunocytochemicznych zawarto w Tabeli 6. Następnie przystąpiono do wybarwienia jąder komórkowych. W tym celu na komórki nakładano 5 µM roztwór Hoechst 33258 w PBS (0,25 ml) i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie komórki ponownie płukano przez 5 minut w PBS (dwukrotnie) i 10 minut (jednokrotnie). Następnie szkiełka z wybarwionymi komórkami usuwano z dołków płytek hodowlanych, nakładano na szkiełka podstawowe pokryte fluorescencyjnym środkiem zamykającym Fluorescent Mounting Medium (Dako) i suszono, pozostawiając w ciemności na noc w 4°C.

Tabela 5. Spis przeciwciał pierwszorzędowych użytych do immunofluorescencyjnego barwienia współhodowli pierwotnych neuronów korowych z pierwotnymi komórkami mikrogleju.

marker	przeciwciało I-rzędowe	rozcieńczenie	producent
MAP2	kurze przeciwciało poliklonalne IgY przeciwciało MAP2	1:10000 w 5% roztworze NGS w PBS	ThermoFisher
C3	kozie przeciwciało poliklonalne IgG przeciwko C3	1:500 w 5% roztworze DS w PBS	ThermoFisher
ED1	mysie przeciwciało monoklonalne IgG1 przeciwko ED1	1:400 w 5% roztworze NGS w PBS	BioRad

Tabela 6. Spis przeciwciał drugorzędowych użytych do immunofluorescencyjnego barwienia współhodowli pierwotnych neuronów korowych z pierwotnymi komórkami mikrogleju.

przeciwciało II-rzędowe	fluorochrom	rozcieńczenie	producent
kozie przeciwko kurzemu IgY (H&L)	Alexa Fluor 488	1:500 w PBS	ThermoFisher
ośle przeciwko koziemu IgG (H&L)	Alexa Fluor 546	1:500 w PBS	ThermoFisher
kozie przeciwko mysiemu IgG1	Alexa Fluor 633	1:500 w PBS	ThermoFisher

3.4. Wizualizacja mikroskopowa

Ocena barwienia immunohisto- i immunocytochemicznego skrawków mózgu i współhodowli komórek mikrogleju z neuronami była przeprowadzona za pomocą konfokalnego mikroskopu skanującego (LSM 780, CarlZeiss) oraz mikroskopu fluorescencyjnego Axioskop 2 (CarlZeiss) wyposażonego w kamerę (AxioCam MRm), z oprogramowaniem AxioVision Release 4.8.1. W mikroskopii konfokalnej, do wzbudzania fluorochromu Alexa Fluor 633 używano lasera helowo-neonowego (632,8 nm), do Alexa Fluor 546 używano lasera helowo-neonowego (543 nm), natomiast Alexa Fluor 488 był wzbudzany za pomocą lasera argonowego (488 nm). Obrazy były zbierane z trzech różnych pól widzenia (1214,6 μm \times 1214,6 μm , rozmiar piksela 1,19 μm), z trzech powtórzeń biologicznych. W świetlnym mikroskopie fluorescencyjnym wzbudzanie fluorescencji odbywało się za pomocą układu filtrów selekcyjnych odpowiednią długość fali. Obrazy były zbierane z trzech różnych pól widzenia, z trzech powtórzeń biologicznych. Do analizy obrazów użyto oprogramowania Zeiss LSM ImageBrowser.

3.5. Analiza Sholla

W celu oceny wpływu uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego oraz podawania maślanu sodu na morfologię neuronów, przeprowadzono analizę Sholla, na preparatach immunocytochemicznych (opisanych wyżej) pochodzących ze współhodowli komórek neuronów i mikrogleju. Ocenę ilości wypustek neuronów przeprowadzono po 24 i 72 godzinach od wykonania procedury OGD oraz na komórkach kontrolnych, traktowanych i nietraktowanych maślanem sodu. Najbardziej reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe neuronów, wyznakowanych przeciwciałem przeciw MAP2, zostały przekonwertowane na obrazy 8-bitowe. Następnie przy użyciu rozszerzenia NeuronJ (<https://imagej.net/NeuronJ>) do programu ImageJ wersja Fiji 2.16.0 wykonywano tzw. maski komórek, które odzwierciedlały wszystkie wypustki neuronów. Dzięki rozszerzeniu Sholl Analysis programu ImageJ, na przygotowane maski komórek nakładano serie koncentrycznych kręgów (co 4 μm),

których środek znajdował się w obrębie jądra komórki, a następnie zliczano wszystkie przecięcia wypustek z poszczególnymi okręgami. Otrzymane dane posłużyły do obliczenia szeregu parametrów charakteryzujących stopień złożoności budowy neuronów (m.in. wielkość komórki, liczba wypustek, gęstość wypustek, stopień rozgałęzienia komórek), które opisują morfologię komórek.

3.6. Oznaczanie poziomu mRNA genów metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym

W celu oceny wpływu maślanu sodu na ekspresję genów wybranych białek dopełniacza (C1q, C3, C5, C9) oraz ich receptorów (C3aR, C5aR) w mózgach zwierząt po uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym oraz wpływu tego związku na polaryzację mikrogleju oraz ekspresję genów wybranych składników prozapalnych (IL-1 β , TNF α , CD86) i przeciwzapalnych (IL-4, arginaza, CD206) w hodowlach komórkowych mikrogleju linii BV2 po procedurze OGD, przeprowadzono analizę ilościowego PCR w czasie rzeczywistym w wybranych punktach czasowych eksperymentu.

Z homogenatów mózgu i zebranego materiału z hodowli komórkowych *in vitro* izolowano całkowite RNA za pomocą zestawu kolumnkowego Total RNA Mini Kit (A&A Biotechnology), zgodnie z instrukcjami producenta. W pierwszym etapie ipsilateralne półkule mózgu były homogenizowane poprzez ucieranie w ciekłym azocie. Do sproszkowanej tkanki oraz zwirowanego materiału komórkowego pochodzącego z hodowli *in vitro* dodawano po 0,8 ml Fenzolu i każdą próbkę mieszano poprzez pipetowanie, aż do całkowitej lizy komórek. Następnie próbki inkubowano w termobloku TS-100 (Biosan) w temperaturze 50°C przez 5 minut. Do przygotowanych tym sposobem lizatów dodano po 0,2 ml chloroformu i mieszano przez kilkukrotne odwracanie probówek. Następnie próbki pozostawiono przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 10 minut w 11000 rpm. Pobrano około 0,45 ml przesączu (górną frakcję) do nowych probówek i dodano po 0,25 ml izopropanolu. Całość dokładnie wymieszano, następnie próbki naniesiono na minikolumny do izolacji RNA i wirowano przez 1 minutę w 11000 rpm. Kolumnienki przeniesiono do nowych sterylnych probówek i naniesiono na nie roztwór płuczący (0,7 ml). Probki ponownie zwirowano przez 1 minutę w 11000 rpm, po czym usunięto przesącz. Dwukrotnie powtórzono płukanie. Po ostatnim wirowaniu kolumnienki umieszczono w nowych jałowych, wolnych od RNazy probówkach elucyjnych. Na złożę znajdujące się na dnie minikolumn dodano po 0,1 ml wody jałowej pozbawionej nukleaz. Probki pozostawiono na 3 minuty w temperaturze pokojowej,

a następnie zwirowano przez 1 minutę przy 11000 rpm. Stężenie i czystość RNA w otrzymanych próbkach oznaczano przy pomocy spektrofotometru NanoDrop One (ThermoFisher). Do dalszych analiz wykorzystywano próbki, których wartość proporcji absorbancji przy długości fali 260 nm do absorbancji przy długości fali 280 nm – A260/A280 przekraczała 1,9, co świadczyło o czystości otrzymanego materiału (A260 wskazuje stężenie kwasu nukleinowego w próbce, a A280 wskazuje przede wszystkim zanieczyszczenie białkiem). Próbki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji i dalszych analiz.

Łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR, z ang. *reverse transcription-polymerase chain reaction*) została przeprowadzona za pomocą zestawu High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) zgodnie z instrukcjami producenta. Reakcję przeprowadzono wykorzystując 250 ng/ μ l wyizolowanego mRNA, będącego matrycą do syntezy cDNA (komplementarnego DNA, z ang. *complementary DNA*) w reakcji odwrotnej transkrypcji. Mieszanina reakcyjna dla pojedynczej próbki składała się z odpowiedniej objętości mRNA, 10 μ l buforu RT, 1 μ l mieszaniny enzymów. Całość dopełniano wodą wolną od nukleaz do objętości 20 μ l. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej przeprowadzono na lodzie. Następnie próbki umieszczono w termocyklerze (Eppendorf Mastercycler pro vapo.protect), gdzie były inkubowane w temperaturze 37°C przez 60 minut. Reakcję zakończono przez inkubację próbek przez 5 minut w 95°C, w celu dezaktywacji polimerazy, po czym próbki schładzano do temperatury 4°C. Ilość otrzymanego cDNA mierzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop One, a próbki przechowywano w -20°C do czasu dalszych analiz.

Na potrzeby analizy zmian poziomu ekspresji genów techniką qPCR zaprojektowano pary starterów dla wybranych genów, posługując się sekwencjami referencyjnymi udostępnionymi w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information). W programie Primer-BLAST zaprojektowano pary starterów, starając się stosować do następujących zasad: pary starterów oddzielone przynajmniej 1 intronem w odpowiadającym im genomowym DNA (uniemożliwienie amplifikacji ewentualnych pozostałości genomowego DNA), długość starterów: 19-23 zasad, długość produktu PCR: 75-200 zasad, temperatura topnienia starterów (T_m): 55-60°C, udział zasad GC: 40-60% sekwencji. Następnie sprawdzono specyficzność zaprojektowanych par starterów w programie Nucleotide BLAST. Sekwencje starterów dla poszczególnych genów analizowanych w modelu *in vivo* zestawiono w Tabeli 7,

a dla poszczególnych genów analizowanych w modelu *in vitro* zestawiono w Tabeli 8. Startery zsyntetyzowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk.

Ilościową reakcją łańcuchową polimerazy (qPCR) przeprowadzono z zastosowaniem zoptymalizowanej mieszaniny reakcyjnej: (1) dla modelu *in vivo* – FAST SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems), zawierającej m.in. polimerazę DNA AmpliTaq Fast, dezoksyrybonukleotydy, barwnik SYBR Green i barwnik referencyjny ROX lub (2) dla modelu *in vitro* – SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), zawierającej m.in. polimerazę DNA AmpliTaq Gold, dezoksyrybonukleotydy, barwnik SYBR Green i barwnik referencyjny ROX. Reakcję qPCR przeprowadzono w 96-dołkowych płytkach (Applied Biosystems), w 20 µl objętości mieszaniny reakcyjnej na dołek, zawierającej: 2,5 ng/µl cDNA, po 0,5 µl każdego ze starterów w stężeniu 10 µM w orientacji *forward i reverse*, 10 µl FAST SYBR™ Green Master Mix lub SYBR™ Green PCR Master Mix. Całość dopełniono odpowiednią objętością wody wolnej od nukleaz. Reakcję prowadzono z użyciem termocyklera z systemem 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem). Etapy reakcji przeprowadzanej na materiale pochodzącym z półkul mózgow zwierząt w modelu *in vivo* obejmowały: (1) faza początkowa: aktywacja polimerazy i denaturacja DNA – 20 sek. w 95°C; (2) faza cykliczna – 40 cykli amplifikacji: denaturacja – 3 sek. w 95°C, przyłączanie starterów – 30 sek. w 60°C i wydłużanie amplifikonu – 45 sek. w 72°C; (3) faza krzywej topnienia – 15 sek. w 95°C, 1 min. w 60°C, 30 sek. w 95°C, 15 sek. w 60°C. Etapy reakcji przeprowadzanej na materiale pochodzącym z hodowli komórkowych w modelu *in vitro* obejmowały: (1) faza początkowa: aktywacja polimerazy i denaturacja DNA – 20 sek. w 50°C i 10 minut w 95°C; (2) faza cykliczna – 40 cykli amplifikacji: denaturacja – 15 sek. w 95°C, przyłączanie starterów – 60 sek. w 60 °C i wydłużanie amplifikonu – 45 sek. w 72°C; (3) faza krzywej topnienia – 15 sek. w 95°C, 1 min. w 60°C, 30 sek. w 95°C, 15 sek. w 60°C. Każdą próbkę badano trzykrotnie, do doświadczeń wykorzystano trzy powtórzenia biologiczne. Krzywa topnienia była wykorzystywana do określenia specyficzności amplifikacji. Sygnały fluorescencyjne dla konkretnego transkryptu były normalizowane względem sygnałów dla genu referencyjnego dla β-aktyny (*act*). Wyniki przedstawione zostały w postaci wartości cyklu progowego ΔCT : $\Delta CT = CT$ analizowanego genu – CT *act*. Względna ekspresja genów została obliczona z zastosowaniem algorytmu $2^{-\Delta\Delta CT}$ [193].

Tabela 7. Lista zaprojektowanych starterów użytych do ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym na materiale pochodzącym z mózgów zwierząt w modelu *in vivo*.

Starter	Sekwencja (5'-3')	Temperatura topnienia (T_M) [°C]	Zawartość GC [%]
<i>C1qa forward</i>	GCTAACACCTGAAAGAGCCC	53,8	55,0
<i>C1qa reverse</i>	GTGATCTCCAAGTGGGACCT	53,8	55,0
<i>C3 forward</i>	CGCACTGTTTCTGGTTCTTCTG	54,8	50,0
<i>C3 reverse</i>	AGGTCAGGAACGAAGGTTTCATC	54,8	50,0
<i>C5 forward</i>	CAGCATAATTCAGGGTGAACG	52,4	47,6
<i>C5 reverse</i>	CAGCTTGTCATTTGAGCCAC	51,8	50,0
<i>C9 forward</i>	TTTATTAACGAGAGATTGGCATTG	50,6	33,3
<i>C9 reverse</i>	TGATGTCGTCTCTGTTTCAGGTC	55,3	47,8
<i>C3aR forward</i>	GACCTACACTCAGGGC	48,5	62,5
<i>C3aR reverse</i>	ATGACGGACGGGATAAG	47,1	52,9
<i>C5aR forward</i>	ATGCCTGCAGATGGCGTTTA	51,8	50,0
<i>C5aR reverse</i>	CAGAAACCAAATGGCGTTGAC	52,4	47,6
<i>β-actin forward</i>	CGGTCAGGTCATCACTATCG	53,8	55,0
<i>β-actin reverse</i>	TTCCATACCCAGGAAGGAAG	51,8	50,0

Tabela 8. Lista zaprojektowanych starterów użytych do ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym na materiale pochodzącym z hodowli komórkowych mikrogleju linii BV2 w modelu *in vitro*.

Starter	Sekwencja (5'-3')	Temperatura topnienia (T _M) [°C]	Zawartość GC [%]
IL-1 β forward	CCACCTTTTGACAGTGATGA	49.7	45.0
IL-1 β reverse	GAGATTTGAAGCTGGATGCT	49.7	45.0
TNF α forward	CCCTCCAGAAAAGACACCATG	54.4	52.4
TNF α reverse	GCCACAAGCAGGAATGAGAAG	54.4	52.4
CD86 forward	TCTCCACGGAAACAGCATCT	51.8	50.0
CD86 reverse	CTTACGGAAGCACCCATGAT	51.8	50.0
IL-4 forward	ATCGGCATTTTGAACGAGGTCACA	55.7	45.8
IL-4 reverse	CGAAGCACCTTGGAAGCCCTA	56.3	57,1
Arg1 forward	AGGAAAGCTGGTCTGCTGGAA	54.4	52.4
Arg1 reverse	GATGCTTCCAAGTCCAGAC	54.4	52.4
CD206 forward	CTCAACCCAAGGGCTCTTCTAA	54.8	50.0
CD206 reverse	AGGTGGCCTCTTGAGGTATGTG	56.7	54.5
β -actin forward	CTGAGAGGGAAACGTGCGT	53.8	55.0
β -actin reverse	CCACAGGATTCCATACCCAAGA	54.8	50.0

3.7. Analiza biochemiczna poziomu ekspresji białek metodą Western Blot.

Techniką Western Blot określono wpływ maślanu sodu na: (1) poziom ekspresji białek dopełniacza oraz białek presynaptycznych i postsynaptycznych w półkulach mózgu po uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym oraz (2) wybrane ścieżki sygnałowe związane z poischemiczną aktywacją mikrogleju w komórkach linii BV2 po procedurze OGD.

Tkankę (półkule mózgu) lub zebrany materiał komórkowy homogenizowano w buforze do lizy RIPA (10 mM Tris-HCl; pH 7,5, zawierającym 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1% niedenaturującego, niejonowego detergentu Nonidet P40 (octylofenoksypolietoksyetanol, Sigma-Aldrich), 0,1% SDS (dodecylosiarczan sodu, Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100, PMSF 0,1 mg/ml (fluorek fenylometylosulfonylu, Sigma-Aldrich), uzupełnionym o inhibitor proteaz i fosfataz (w rozcieńczeniu 1:100, Sigma-Aldrich), a następnie inkubowano przez 30 minut

na lodzie. Lizaty poddano wirowaniu przy 13000 rpm przez 10 minut w 4°C. Supernatant został zebrany i użyty do dalszych badań. Całkowite stężenie białka w supernatancie oceniono za pomocą zmodyfikowanej metody Lowry'ego, z użyciem zestawu do oznaczania białka Bio-Rad DCTM (Bio-Rad). Do wyznaczenia krzywej standardowej użyto wzorcowych roztworów albuminy z surowicy bydłowej (Sigma-Aldrich). Odczyt absorbancji (przy długości fali 750 nm) przeprowadzano na spektrofotometrze Fluostar Omega (BMG Labtech). W kolejnym etapie przygotowywano próbki do analizy Western Blot. W tym celu lizaty inkubowano w łaźni wodnej z buforem denaturującym (Laemmli Sample Buffer, BioRad), w stosunku 1:1, w 100°C przez 5 minut. Bufor denaturujący zawierał dodatek β -merkaptotolanu (BioRad) – 1% v/v, który degraduje trzecio- i czwartorzędowe struktury białek. Próbki zawierające 50 μ g białka poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu SDS–PAGE w buforze o składzie: 25mM Tris, 192 mM glicyna, 0,5% SDS, przy stałym napięciu prądu wynoszącym 180V przez około 45 minut. Po zakończeniu rozdzielania elektroforetycznego białka przeniesiono z żelu poliakrylamidowego na nitrocelulozę (AmershamTM ProtranTM Supported 0,45 μ m NC) w buforze o składzie: 25mM Tris, 192 mM glicyna, 20% metanol, przy stałym napięciu prądu 100V, przez około 90 minut. Białka znajdujące się na błonie nitrocelulozowej zostały następnie poddane analizie immunochemicznej. Po zablokowaniu w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w TBST (mieszanina buforowanego trisem roztworu soli fizjologicznej (TBS) – 20 mM Tris (Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich) i 0,1% Tween 20 (polisorbat 20 – niejonowy środek powierzchniowo czynny) (Sigma-Aldrich)), membrany inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym (anty-C3, anty-C5, anty-PSD95, anty-synapsyna I, anty-synaptofizyna, anty-pAKT, anty-AKT, anty-pERK, anty-ERK). Dokładne informacje o pierwszorzędowych przeciwciałach użytych do analiz Western Blot znajdują się w Tabeli 9. W kolejnym etapie analizy Western Blot, membrany przepłukano 3 razy w buforze TBST, a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednim drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową (Sigma-Aldrich). Dokładne informacje o drugorzędowych przeciwciałach użytych do analiz Western Blot znajdują się w Tabeli 10. W celu weryfikacji otrzymanych wyników i wyeliminowania ewentualnych błędów wynikających z niewłaściwej ilości nałożonego białka przeprowadzono reakcję immunochemiczną z przeciwciałem skierowanym przeciw β -aktynie (CellSignaling, 1:1000), jako kontrolę wewnętrzną dla każdej analizy Western Blot. Sygnały immunochemiczne uwidoczniono za pomocą zestawu do chemiluminescencji ECL (GE Healthcare Life Sciences), czyli reakcji świetlnej, która towarzyszy reakcji chemicznej katalizowanej przez rozkład

peroksydazy chrzanowej związanej z przeciwciałem drugorzędowym, przez nasświetlanie membrany HyperfilmTM ECL (GE Healthcare Life Sciences). Półilościową ocenę poziomów białek wykrytych przez immunoblotting określono densytometrycznie z użyciem oprogramowania LKB Utrascan XL Program GelScan. Wartości densytometrii obliczono dla wszystkich grup, następnie wartości dla jednego powtórzenia biologicznego uśredniono. Tak obliczone wartości densytometrii dla grup kontrolnych przyjęto jako 100%. Dane z odpowiednich grup eksperymentalnych przedstawiono jako udział procentowy wartości kontrolnej. Do analiz wykorzystano minimum trzy powtórzenia biologiczne.

Tabela 9. Spis przeciwciał pierwszorzędowych użytych do analiz Western Blot.

białko	przeciwciało I-rzędowe	rozcieńczenie	producent
C3	kozy przeciwciało poliklonalne IgG przeciwko C3	1:1000 w TBST	ThermoFisher
C5	królicze przeciwciało IgG poliklonalne przeciwko C5	1:2000 w TBST	ThermoFisher
PSD-95	mysie przeciwciało IgG2a monoklonalne przeciwko PSD-95	1:2000 w TBST	ThermoFisher
Synaptofizyna	mysie przeciwciało IgG1 monoklonalne przeciwko synaptofizynie	1:1000 w TBST	Sigma-Aldrich
Synapsyna I	królicze przeciwciało IgG poliklonalne przeciwko synapsynie I	1:1000 w TBST	ThermoFisher
phospho-AKT (Ser473)	królicze przeciwciało IgG poliklonalne przeciwko p-AKT	1:1000 w TBST	CellSignaling
AKT	królicze przeciwciało IgG poliklonalne przeciwko AKT	1:1000 w TBST	CellSignaling
p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	królicze przeciwciało IgG poliklonalne przeciwko p-ERK	1:1000 w TBST	Affinity Biosciences
p44/42 MAPK (ERK 1/2)	królicze przeciwciało IgG poliklonalne przeciwko ERK	1:1000 w TBST	CellSignaling
β-aktyna	mysie przeciwciało IgG2b monoklonalne przeciwko β-aktynie	1:1000 w TBST	CellSignaling

Tabela 10. Spis przeciwciał drugorzędowych użytych do analiz Western Blot.

przeciwciało II-rzędowe	rozcieńczenie	producent
królicze przeciwciało kozjemu IgG (whole molecule)	1:8000 w 2,5% roztworze mleka odtuszczonego w TBST	Sigma-Aldrich
kozy przeciwko króliczemu IgG (whole molecule)	1:8000 w 2,5% roztworze mleka odtuszczonego w TBST	Sigma-Aldrich
kozy przeciwko mysjemu IgG (Fab specific)	1:4000 w 2,5% roztworze mleka odtuszczonego w TBST	Sigma-Aldrich

3.8. Analiza biochemiczna poziomu ekspresji białek za pomocą płytkowego testu immunoenzymatycznego – ELISA

Część wyników otrzymanych metodą Western Blot zostało dodatkowo zweryfikowanych za pomocą testów ELISA. Metodą tą określono wpływ maślanu sodu na poziom ekspresji i fosforylacji/aktywacji kinaz ERK/pERK i AKT/pAKT, które biorą udział w poischemicznej aktywacji mikrogleju. W tym celu wykonano analizę biochemiczną poziomu ekspresji wyżej wspomnianych białek za pomocą płytkowego testu immunoenzymatycznego – ELISA na komórkach mikrogleju linii BV2 24 i 72 godziny po procedurze OGD i po traktowaniu maślanem sodu.

W wybranych punktach czasowych hodowle komórkowe przepłukano PBS-em, następnie dodawano bufor Cell Extraction Buffer PTR (znajdujący się w zestawie testów ELISA) z dodatkiem inhibitora proteaz i fosfataz (w stosunku 1:100; Sigma-Aldrich) w objętości 400 μ l na dołek i inkubowano w 4°C przez 15 minut. Następnie komórki zebrano do probówek i wirowano przez 10 min w 13000 \times g w 4°C. Otrzymany supernatant umieszczano w nowych, jałowych probówkach i przechowywano w temp. -80°C do dalszych analiz. Całkowite stężenie białka w lizatach komórkowych oznaczane było testem Bradford (Sigma-Aldrich). Do krzywej standardowej użyto wzorcowych roztworów albuminy pochodzącej z surowicy bydłowej (Sigma-Aldrich). Odczyt absorbancji (przy długości fali 595 nm) przeprowadzano na spektrofotometrze Fluostar Omega. Stężenia kinaz AKT i ERK w próbkach oznaczano z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów immunoenzymatycznego testu ELISA (Tabela 11) według protokołów dostarczonych przez producentów. Na spektrofotometrze FluoStar Omega przeprowadzano odczyt absorbancji przy długości fali 450 nm. Aby znormalizować wyniki otrzymane za pomocą testu ELISA, uzyskane stężenia analizowanych białek odniesiono do stężenia całkowitego białka w badanej próbce. Wyniki dla próbek kontrolnych przyjęto jako 100%, a dane z odpowiednich grup eksperymentalnych przedstawiono jako udział procentowy wartości kontrolnej.

Tabela 11. Spis zastosowanych komercyjnie dostępnych zestawów immunoenzymatycznych testów ELISA.

Nazwa zestawu ELISA	Producent	Numer katalogowy
AKT 1/2/3 pS473 + AKT 1/2/3 Total ELISA Kit	abcam	ab253299
ERK 1/2 (pT202/Y204 + Total) ELISA Kit	abcam	ab176660

3.9. Cytometria przepływowa

W celu oceny wpływu maślanu sodu na polaryzację mikrogleju po procedurze OGD w hodowlach komórkowych linii BV2, przeprowadzono analizę metodą cytometrii przepływowej w różnych punktach czasowych po OGD. Do tego zadania użyto przeciwciał skierowanych przeciw markerom charakterystycznym dla fenotypu M1 i M2 (Tabela 12). Komórki mikrogleju oznaczone zostały przeciwciałami CD11b (szczurze przeciwciało przeciwko mysiemu CD11b, sprzężone z APC, BD Pharmingen™), a także przeciwciałem CD86 znakującym mikroglej o fenotypie prozapalnym M1 (szczurze przeciwciało przeciwko mysiemu CD86, sprzężone z BV421, BD Pharmingen™) oraz przeciwciałem CD206 charakterystycznym dla mikrogleju M2 (szczurze przeciwciało przeciwko mysiemu CD206, sprzężone z PE, BD Pharmingen™).

Aby zablokować niespecyficzne wiązanie receptorów Fc, próbki inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w 500 µl mieszaniny blokującej: roztwór 10% FBS w HBSS bez wapnia i bez magnezu. Następnie, próbki inkubowano z przeciwciałami przez 30 minut w temperaturze pokojowej, w 200 µl całkowitej objętości. Przeciwciała zostały rozcieńczone w roztworze 5% FBS w HBSS w stosunku 1:200. Po inkubacji próbki zostały trzykrotnie przepłukane 1 ml roztworu 5% FBS w HBSS i przeniesione do probówek typu FACS (Falcon™, ThermoFisher).

Analizy przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II (BD Biosciences) z laserami wzbudzającymi o długości fali 405 nm, 488 nm i 633 nm oraz filtrami detekcyjnymi dla długości fal 450 ± 50 nm (dla przeciwciała sprzężonego z BV421), 585 ± 42 nm (dla przeciwciała sprzężonego z PE) oraz 660 ± 20 nm (dla przeciwciała sprzężonego z APC). Strategia bramkowania polegała na oddzieleniu komórek na podstawie względnej wielkości i ziarnistości, czyli odpowiednio rozpraszania światła na przednim (FSC, z ang. *forward scatter*) i bocznym (SSC, z ang. *side scatter*) detektorze optycznym w celu

usunięcia agregatów komórek i małych zanieczyszczeń, a następnie bramkowaniu pojedynczych komórek na podstawie parametrów obszaru piku rozproszenia światła na przednim detektorze (FSC-A, z ang. *forward scatter-area*) i wysokości piku rozpraszania światła na przednim detektorze (FSC-H, z ang. *forward scatter-height*). Do poszczególnych subpopulacji komórki były kwalifikowane na podstawie względnej intensywności fluorescencji charakterystycznych markerów. Komórki mikrogleju były określane na podstawie ekspresji markera CD11b. Za komórki mikrogleju uznano populację CD11b+. Następnie fenotypy mikrogleju określano na podstawie intensywności fluorescencji przeciwciał przeciwko markerowi CD86 lub markerowi CD206. Prozapalną populację mikrogleju M1 zdefiniowano jako CD11b+CD86+, a przeciwzapalną populację mikrogleju M2 jako CD11b+CD206+. Z każdej zebranej próbki zadano, aby układ cytometru pobrał i zliczył 3×10^4 zdarzeń, czyli odczytów sygnału rozpraszania światła.

Tabela 12. Spis przeciwciał użytych do cytometrii przepływowej.

marker	przeciwciało	rozcieńczenie	producent
CD11b	szczurze przeciwciało przeciwko mysiemu CD11b, sprzężone z APC	1:200 w 5% FBS w HBSS	BD Pharmingen™
CD86	szczurze przeciwciało przeciwko mysiemu CD86, sprzężone z BV421	1:200 w 5% FBS w HBSS	BD Pharmingen™
CD206	szczurze przeciwciało przeciwko mysiemu CD206, sprzężone z PE	1:200 w 5% FBS w HBSS	BD Pharmingen™

3.10. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Badania techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) zostały przeprowadzone we współpracy z Pracownią Badań Mikroskopowo-Elektronowych IMDiK PAN.

Zwierzęta doświadczalne zostały perfundowane przez serce roztworem PBS, a następnie mieszaniną 2,5% glutaraldehydu (GA), 2% PFA i 0,1 M buforu kakodylowego, po czym mózgi zostały wyizolowane i inkubowane w 4°C przez 24 godziny w tej samej

mieszaniu. Po 24-godzinnej inkubacji kora mózgu i hipokamp obu półkul zostały izolowane z mózgu i pocięte na małe fragmenty, które były płukane trzykrotnie w 0,1 M buforze kakodylowym, a następnie utrwalane w 1% tetroksydzie osmu (OsO_4) i 0,8% cyjanidzie potasu ($\text{K}_4(\text{FeCN})_6$) przez 2 godziny. Tak przygotowane fragmenty tkanki w kolejnym etapie odwodniono w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (30% - 99,8%) oraz w tlenku propylenu. Następnie próbki zostały zatopione w żywicy Epon i poddane polimeryzacji w temperaturze 60°C przez 24 godziny. Tak przygotowana tkanka została pocięta na ultracienkie skrawki (grubości 40-60 nm) na ultramikrotomie MTXL (RMC), przy użyciu noża diamentowego. Następnie skrawki zostały umieszczone na siatkach miedzianych (300 oczek) i wybarwione metodą podwójnego kontrastu z użyciem octanu uranylu (30 minut) i cytrynianu ołowiu (15 minut). Analiza przygotowanych preparatów została przeprowadzona za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM-1011 (JEOL) działającego przy napięciu przyspieszającym 80 kV. Ocena poziomu uszkodzenia cytoarchitektury tkanki mózgu została przeprowadzona ze szczególnym uwzględnieniem połączeń synaptycznych.

3.11. Badania behawioralne

Badania behawioralne zostały przeprowadzone we współpracy z Pracownią Behawioralno-Metaboliczną IMDiK PAN. Podczas trwania eksperymentów behawioralnych, szczury trzymane w standardowych warunkach hodowlanych, w klatkach ze stałą wilgotnością i temperaturą około 20°C , z zachowaniem stałego fotoperiodu 12 h/12 h – światłość/ciemność, z dostępem do wody i jedzenia *ad libitum* (z łac. według upodobań – bez ograniczeń).

Badania behawioralne przeprowadzono w celu oceny reakcji na bodźce za pomocą wybranych testów oraz zmian w funkcjach motorycznych, sensorycznych i równowagi, za pomocą zmodyfikowanej skali nasilenia neurologicznego (mNSS, z ang. *modified neurological severity scores*) u zwierząt po urazie hipoksyjno-ischemicznym i po podaniu maślanu sodu.

Zwierzęta zostały podzielone na 4 grupy eksperymentalne, analogicznie jak w przypadku wyżej opisanych analiz (6 szczurów na grupę):

- 1) kontrolne (K),
- 2) kontrolne traktowane maślanem sodu (K+SB),
- 3) zwierzęta po niedokrwieniu-niedotlenieniu (HI),
- 4) zwierzęta po niedokrwieniu-niedotlenieniu traktowane maślanem sodu (HI+SB).

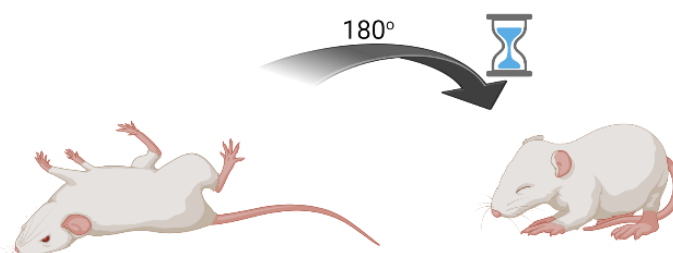
Wszystkie testy behawioralne były przeprowadzane w pokoju izolowanym od bodźców zewnętrznych. Piątego i siódmego dnia po HI oraz u takich samych wiekowo zwierząt kontrolnych oceniano odruch przyjmowania wyprostowanej postawy (z ang. *righting reflex test*) i zachowanie negatywnej geotaksji (z ang. *negative geotaxis behaviour test*) w oparciu o pracę Lyu i wsp. (2021) oraz publikację Chen i wsp. (2022) [194], [195]. Aby przeprowadzić test przyjęcia wyprostowanej postawy, młode szczury były umieszczane w pozycji na plecach, rejestrowano czas, jaki zajmował im obrót oraz ustawienie wszystkich czterech łap z powrotem na podłożu (Ryc. 7). W przypadku testu zachowania negatywnej geotaksji, szczury były umieszczane głową w dół na równi pochyłej (umieszczonej pod kątem 40°). Rejestrowano czas, jaki zajmowało im obrócenie się o 180° do pozycji z głową ku górze kładki, z krytycznym punktem czasowym 60 sekund. Przekroczenie 60 sek. było uznawane za brak wykonania obrotu (Ryc. 8). Dziesiątego dnia po HI oraz u analogicznych wiekowo zwierząt kontrolnych, przeprowadzono ocenę przy użyciu zmodyfikowanej skali nasilenia neurologicznego (mNSS), aby ocenić funkcje odruchowe, motoryczne, sensoryczne i równowagi [196]. Szczegółowy opis testów znajduje się w Tabeli 13. W zestawie testów mNSS zwierzę otrzymywało 1 punkt za każde pomyślne przejście testu, do zdobycia było łącznie 11 punktów. Dwunastego dnia po HI oraz analogicznego dnia życia u zwierząt kontrolnych oceniano zdolność do utrzymania się na drucianej kratce w pozycji wiszącej (z ang. *wire hang test*) na podstawie pracy Chen i współpracowników (2022) [195]. Szczury były wystawione na drucianą kratkę, tak aby mogły się jej uchwycić łapami i ogonem, a następnie kratka była powoli obracana o 180°. Mierzono czas, w którym zwierzęta zwolniły uchwyt i upadały na znajdujące się bezpośrednio pod nimi miękkie podłoże (Ryc. 9). Czas zwolnienia uchwytu był mierzony w 5 kolejnych próbach.

Aby zredukować liczbę zwierząt wykorzystanych we wszystkich doświadczeniach, zwierzęta po badaniach behawioralnych były przeznaczone do badań molekularnych

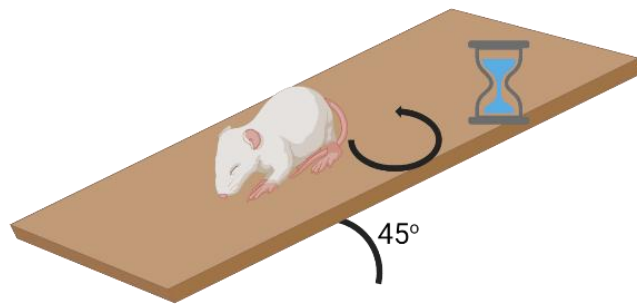
i biochemicznych. W tym celu poddano je dekapitacji w 14 dniu po urazie hipoksyjno-ischemicznym i stanowiły ostatni badany w tych analizach punkt czasowy.

Tabela 13. Spis testów wykonywanych w zmodyfikowanej skali nasilenia neurologicznego (mNSS).

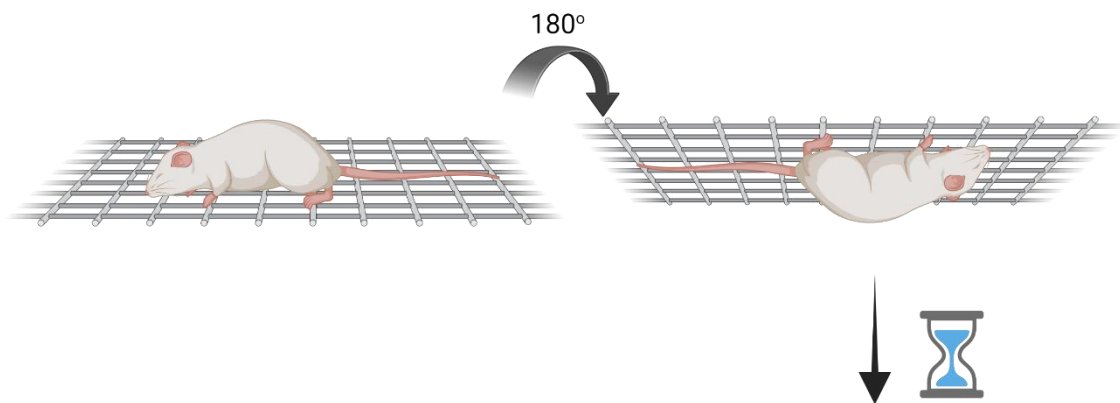
Zadanie	Opis	Porażka/Sukces (pkt.)
Porażenie kończyn	Brak porażenia kończyn	0/1
Chód prosty	Chód aktywny, harmonijny i w linii prostej	0/1
Pozycja ogona	Pozycja ogona jest uniesiona	0/1
Odruch małżowiny usznej	Potrząsanie głową podczas kontaktu z zewnętrznym aparatem słuchowym (uchem)	0/1
Odruch zaskoczenia	Reakcja motoryczna na głośny hałas	0/1
Wyjście z kręgu	Zdolność do znalezienia wyjścia z dużego okrągłego pojemnika w 2 minuty	0/1
Balansowanie po okrągłym pręcie	Zdolność do balansowania po pręcie o średnicy 5 mm przez 10 sek.	0/1
Ujemny odruch biegunowy	Zdolność do odwrócenia się z pozycji z głową w dół na pochyłej platformie	0/1
Chód po belce szerokości 1,5 cm	Zsuniecie się z belki nie więcej niż 2 razy	0/1
Chód po belce szerokości 1,0 cm	Zsuniecie się z belki nie więcej niż 2 razy	0/1
Chód po belce szerokości 0,8 cm	Zsuniecie się z belki nie więcej niż 2 razy	0/1
Maksymalny wynik		11



Rycina 7. Uproszczony schemat testu oceniającego odruch przyjmowania wyprostowanej postawy (z ang. *righting reflex test*). Rycina wykonana w programie BioRender.com.



Rycina 8. Uproszczony schemat testu oceniającego zachowanie negatywnej geotaksji (z ang. *negative geotaxis behaviour test*). Rycina wykonana w programie BioRender.com.



Rycina 9. Uproszczony schemat testu oceniającego zdolność do utrzymania się na drucianej kratce w pozycji wiszącej (z ang. *wire hang test*). Rycina wykonana w programie BioRender.com.

3.12. Analiza statystyczna

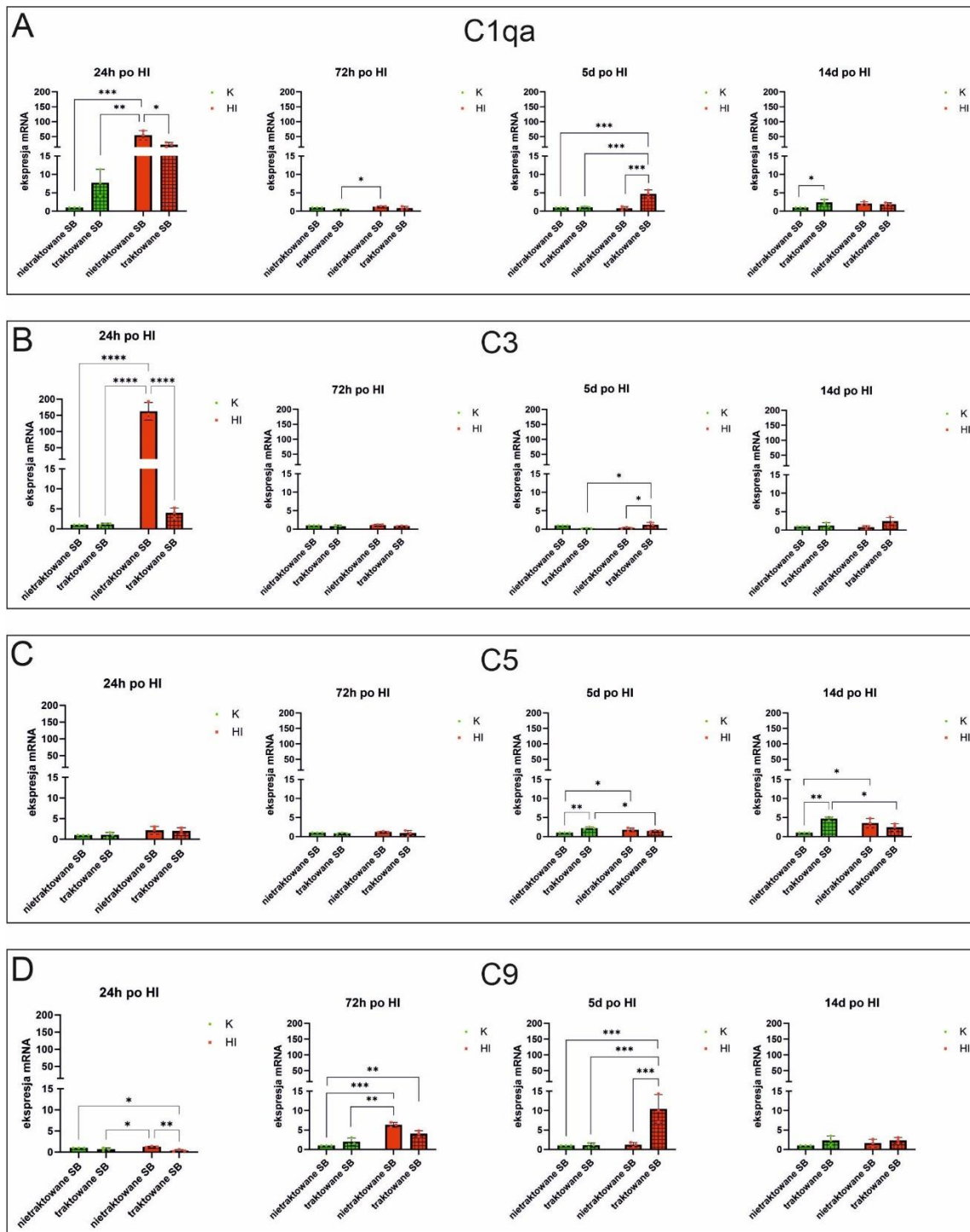
Statystyczną analizę danych przeprowadzono za pomocą dedykowanego oprogramowania statystycznego (GraphPad Prism 10.1.0). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości z poszczególnych danych eksperymentalnych \pm odchylenie standardowe (SD, z ang. *standard deviation*). Analizy statystyczne przeprowadzono na danych uzyskanych z co najmniej 3 eksperymentów (powtórzeń biologicznych) i 3 powtórzeń technicznych. Porównania między grupami zostały przeprowadzone przy użyciu dwukierunkowej analizy wariancji (two-way ANOVA) z testem post-hoc Bonferroni dla wielokrotnych porównań. Dane zostały uznane za statystycznie istotne przy wartości $p < 0,05$.

4. Wyniki

4.1. Model *in vivo*

4.1.1. Ekspresja mRNA białek układu dopełniacza w mózgu po hipoksji-ischemii

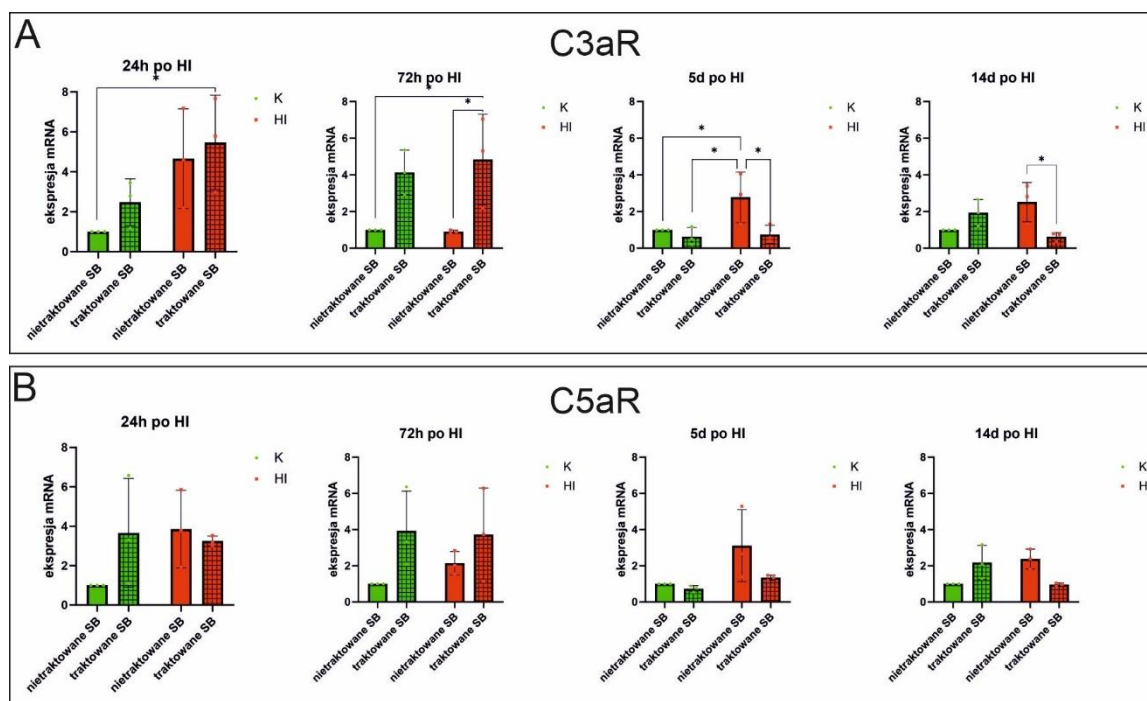
Stan zapalny jest kluczowym czynnikiem patologicznym w uszkodzeniach mózgu w okresie okołoporodowym, a układ dopełniacza jako składowa stanu zapalnego, aktywuje się po hipoksji-ischemii. Dlatego też, w pierwszym etapie eksperymentów obejmujących niniejszą rozprawę doktorską określono poziom ekspresji mRNA molekuł będących składnikami układu dopełniacza oraz wpływ maślanu sodu na tę ekspresję. Aby zmierzyć poziomy ekspresji mRNA białek C1qa, C3, C5 i C9, wykonano analizy metodą qPCR na próbkach pobranych od zwierząt kontrolnych oraz po HI, a także od zwierząt kontrolnych i po HI traktowanych inhibitorem. Materiał pobrano 24 i 72 godziny oraz 5 i 14 dni po indukcji HI. Jako genu referencyjnego użyto genu dla β -aktyny amplifikowanego z tego samego cDNA. Po 24 godzinach od epizodu hipoksyjno-ischemicznego zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA dla białek C1qa i C3 układu dopełniacza, natomiast po podaniu maślanu sodu ekspresja obu białek zmniejszyła się (Ryc. 10A, B). Ekspresja białka C5 była nieznacznie zwiększona po 5 i 14 dniach od indukcji HI (wyniki statystycznie istotne). Po podaniu maślanu sodu ekspresja mRNA C5 zmniejszyła się, natomiast wyniki te nie były istotne statystycznie (Ryc. 10C). Z kolei po 72 godzinach zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA dla białka C9 układu dopełniacza, który zmniejszył się po zastosowaniu maślanu sodu (Ryc. 10D). Po 5 dniach w grupie HI+SB zauważono wzrost ekspresji mRNA dla C1qa, C3 i C9 w porównaniu do grupy zwierząt po HI nieleczonych maślanem sodu (Ryc. 10A, B, D).



Rycina 10. Ekspresja mRNA białek układu dopełniacza. Przeprowadzono analizę qPCR na materiale pochodzącym od zwierząt, u których zaindukowano HI i zwierząt kontrolnych, w obecności i nieobecności maślanu sodu. Materiał pobierano 24 h i 72 h oraz 5 d i 14 d po indukcji HI. A – wyniki analizy dla C1qa, B – wyniki analizy dla C3, C – wyniki analizy dla C5, D – wyniki analizy dla C9. K – kontrola, HI – niedotlenienie-niedokrwienie. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD), obliczone względem genu referencyjnego dla β -aktyny. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej $n=3$. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

4.1.2. Ekspresja mRNA receptorów dla białek układu dopełniacza w mózgu po hipoksji-ischemii

Następnym celem badań, było określenie ekspresji mRNA receptorów białek układu dopełniacza w obecności i braku maślanu sodu. Aby zmierzyć poziom ekspresji mRNA C3aR i C5aR, ponownie przeprowadzono analizy qPCR na próbkach uzyskanych od zwierząt kontrolnych oraz po indukcji HI, a także od zwierząt kontrolnych oraz po indukcji HI, którym podano SB. Materiał pobrano 24 i 72 godziny, 5 i 14 dni po indukcji HI. Po 24 godzinach od epizodu hipoksyjno-ischemicznego zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA dla obu badanych receptorów, a podanie maślanu sodu nieznacznie zwiększyło ekspresję C3aR i zmniejszyło ekspresję C5aR, jednak te wyniki nie były istotne statystycznie. Po 72 godzinach od indukcji HI wzrosła ekspresja C5aR, a podanie inhibitora dodatkowo zwiększyło tę ekspresję, choć i w tym przypadku były to wyniki nieistotne statystycznie. W analogicznym punkcie czasowym nie obserwowaliśmy zmian w ekspresji C3aR po HI, jednak zastosowanie SB istotnie zwiększało poziom mRNA dla tego receptora, zarówno w grupie kontrolnej (K+SB) jak i u zwierząt hipoksyjno-ischemicznych (HI+SB). Po 5 dniach i 2 tygodniach nadal obserwowano wzrost ekspresji mRNA obu receptorów w próbkach pobranych od zwierząt po HI w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas gdy po podaniu maślanu sodu ekspresja ta uległa znacznemu zmniejszeniu (Ryc. 11A, B).

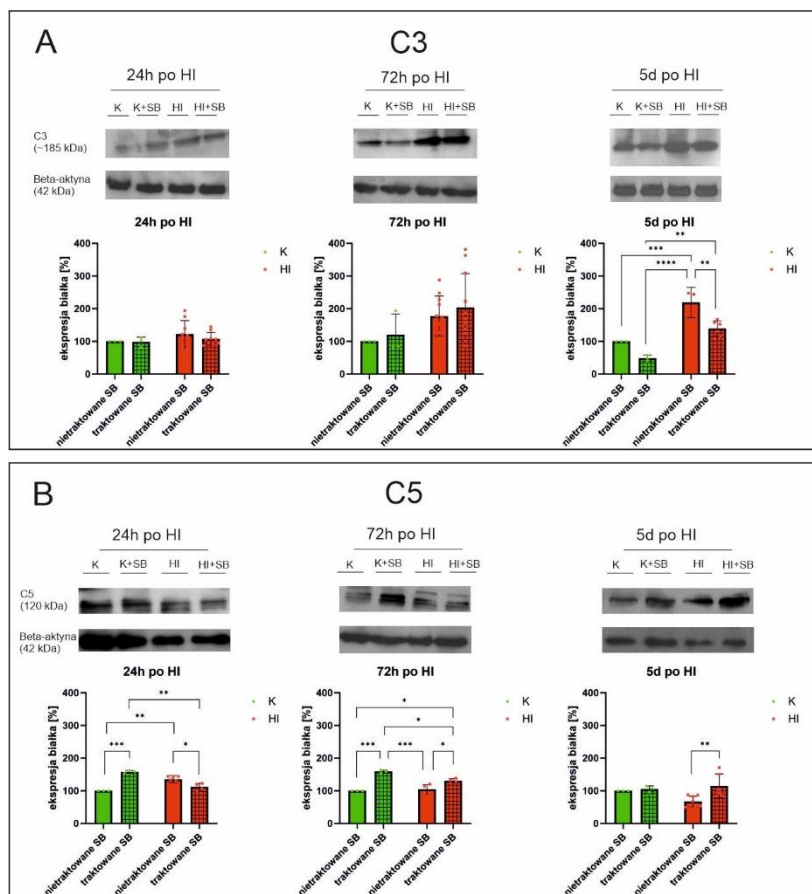


Rycina 11. Ekspresja mRNA receptorów dla białek układu dopełniacza. Przeprowadzono analizę qPCR na materiale pochodzącym od zwierząt, u których zaindukowano HI i zwierząt kontrolnych, w obecności i nieobecności maślanu sodu. Materiał pobierano 24 h, 72 h, 5 d i 14 d po indukcji HI. A – wyniki analizy dla C3aR, B – wyniki analizy dla C5aR. K – kontrola, HI – niedotlenienie-niedokrwienie. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD), obliczone względem genu referencyjnego dla β -aktyny. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej $n=3$. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: $*p < 0,05$.

4.1.3. Aktywacja układu dopełniacza w uszkodzeniu mózgu wywołanym neonatalną HI

W kolejnym kroku skupiono się na określeniu i ocenie ekspresji molekuł będących składnikami układu dopełniacza w obecności i braku badanego inhibitora. Aby zmierzyć poziom białek C3 i C5 układu dopełniacza, przeprowadzono analizy metodą Western Blot na próbkach uzyskanych od zwierząt kontrolnych oraz po indukcji HI, a także od zwierząt po HI i kontrolnych traktowanych SB. Materiał do badania (półkule mózgu) pobrano 24 i 72 godziny oraz 5 dni po indukcji HI. Po 24 godzinach od wywołania HI odnotowano istotnie zwiększoną ekspresję C5, a podanie maślanu sodu zmniejszyło poziom ekspresji tego białka. Zmiany w poziomie białka C3 w tym punkcie czasowym były nieistotne statystycznie (Ryc. 12A, B). Po 72 godzinach hipoksja-ischemia zwiększyła ekspresję białka C3, podczas gdy podanie maślanu sodu dodatkowo powodowało wzrost poziomu obu badanych białek, jednak ponownie wyniki te są istotne statystycznie tylko dla białka C5 (Ryc. 12A, B). Przy

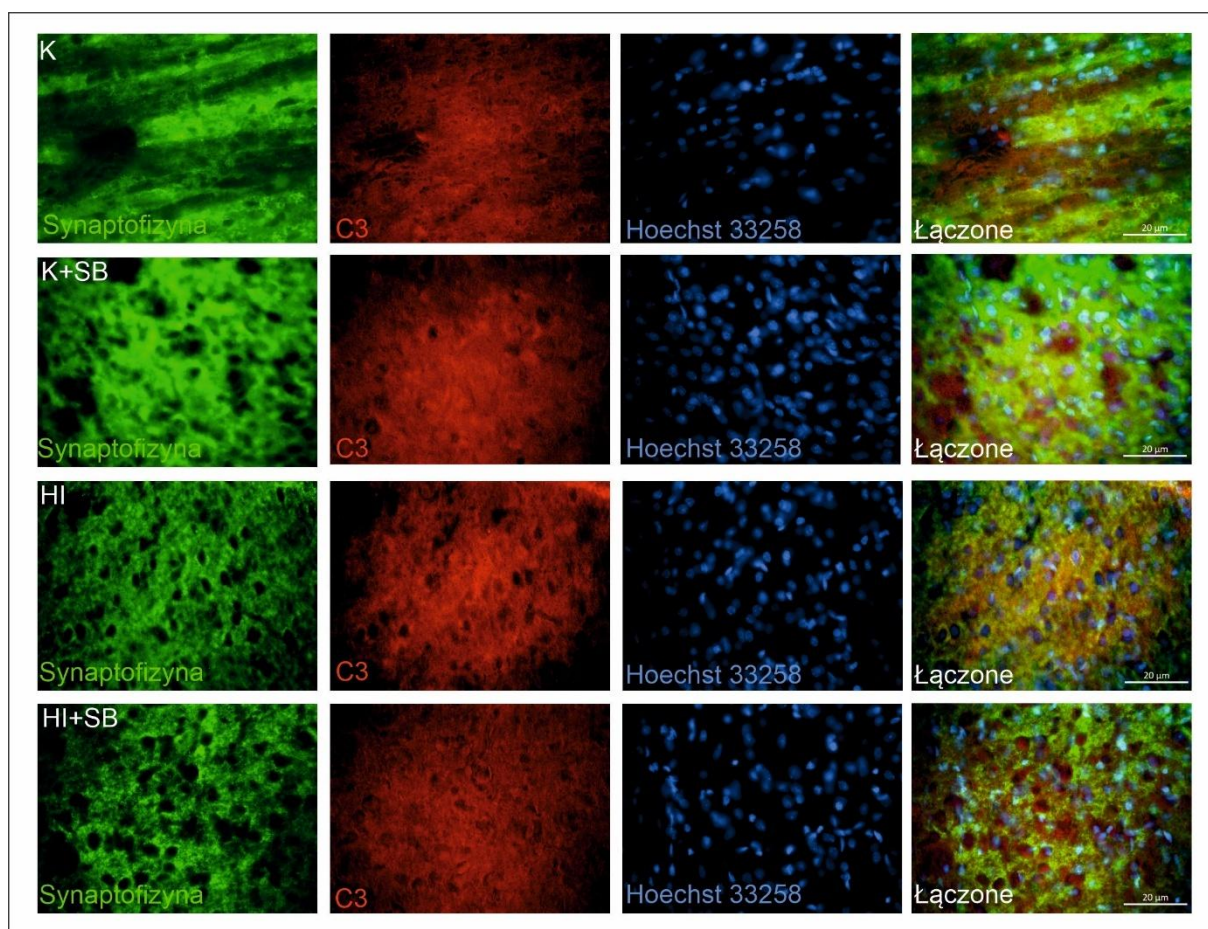
wydłużeniu czasu przeżycia zwierząt do 5 dni, zauważono wzrost poziomu białka C3 u zwierząt po hipoksji-ischemii, natomiast podanie maślanu sodu istotnie zmniejszyło poziom ekspresji tego białka (Ryc. 12A). W tym punkcie czasowym odnotowano również spadek poziomu białka C5, a w grupie zwierząt traktowanych SB (HI+SB) wykazano wzrost poziomu tego białka (Ryc. 12B).



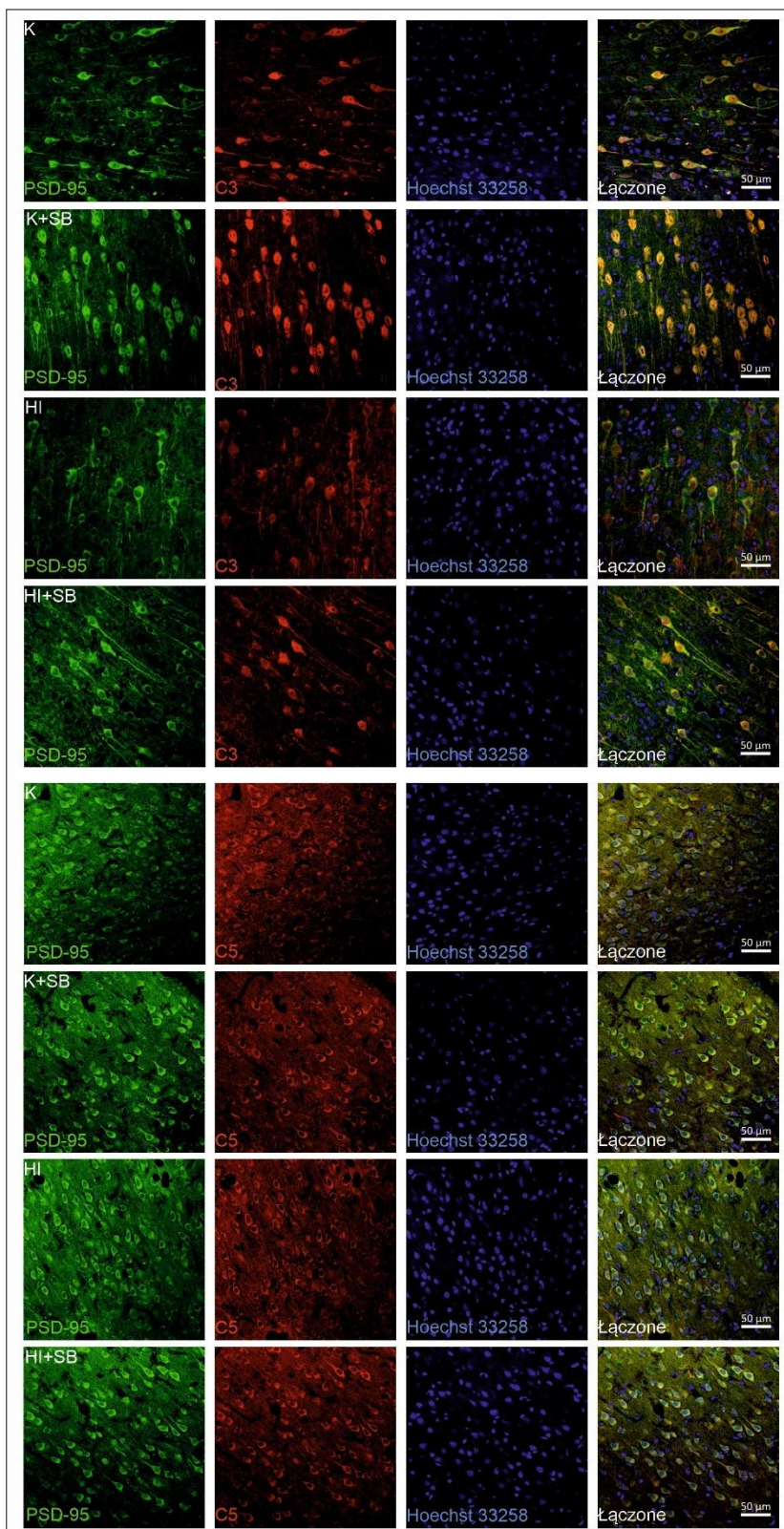
Rycina 12. Aktywacja dopełniacza w uszkodzeniu mózgu wywołanym przez neonatalną HI. Przeprowadzono analizę Western Blot na materiale pochodzącym od zwierząt, u których zaindukowano HI i zwierząt kontrolnych, w obecności i nieobecności maślanu sodu. Materiał uzyskano 24 h, 72 h oraz 5 dni po indukcji HI. A – analiza wyników dla C3, B – analiza wyników dla C5. K – kontrola, K+SB – kontrola w obecności maślanu sodu, HI – niedotlenienie-niedokrwienie, HI+SB – niedotlenienie-niedokrwienie w obecności maślanu sodu. Wyniki uzyskano za pomocą analizy densytometrycznej poziomów szarości prążków po rozkładzie elektroforetycznym, wyrażonych jako procent stosunku gęstości optycznej (OD z ang. *optical density*) prążków K+SB, HI i HI+SB w odniesieniu do K. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej min. $n=3$. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

4.1.4. Lokalizacja składników układu dopełniacza w mózgu po hipoksji-ischemii

Ponieważ białka dopełniacza mogą odgrywać ważną rolę w przeorganizowaniu sieci synaptycznych w różnych stanach patologicznych, w późniejszym etapie badań podjęto próbę zlokalizowania białek układu dopełniacza w mózgu w obecności i braku badanego inhibitora. Sprawdzone, czy białka dopełniacza znajdują się w pobliżu synaps oraz czy hipoksja-ischemia oraz podawanie maślanu sodu wpływa na ich lokalizację. Aby określić obecność białek C3 i C5 układu dopełniacza, przeprowadzono podwójne barwienie immunohistochemiczne na skrawkach mózgu uzyskanych od zwierząt kontrolnych i po HI, w obecności lub braku inhibitora. Materiał pobrano 2 tygodnie po wywołaniu HI. Wyniki immunohistochemiczne oceniano za pomocą konfokalnego mikroskopu skanującego (LSM 780, CarlZeiss) wyposażonego w oprogramowanie Zeiss LSM ImageBrowser oraz mikroskopu fluorescencyjnego Axioskop 2 (CarlZeiss) wyposażonego w kamerę (AxioCam MRm), z oprogramowaniem AxioVision Release 4.8.1. Białka C3 i C5 układu dopełniacza były obecne we wszystkich obszarach mózgu, w tym w korze mózgu, hipokampie i prążkowie, w przestrzeniach perisynaptycznych, zarówno w tkankach zdrowych, jak i uszkodzonych przez epizod hipoksyjno-ischemiczny (Ryc. 13, 14). Liczne kolokalizacje białek C5 i C3 z białkami synaptycznymi – PSD-95 i synaptofizyną potwierdzają, że znajdują się one w bezpośrednim sąsiedztwie synaps. Niemniej jednak, na podstawie uzyskanych wyników, nie można jednoznacznie stwierdzić, czy HI lub SB wpływają na lokalizację białek dopełniacza.



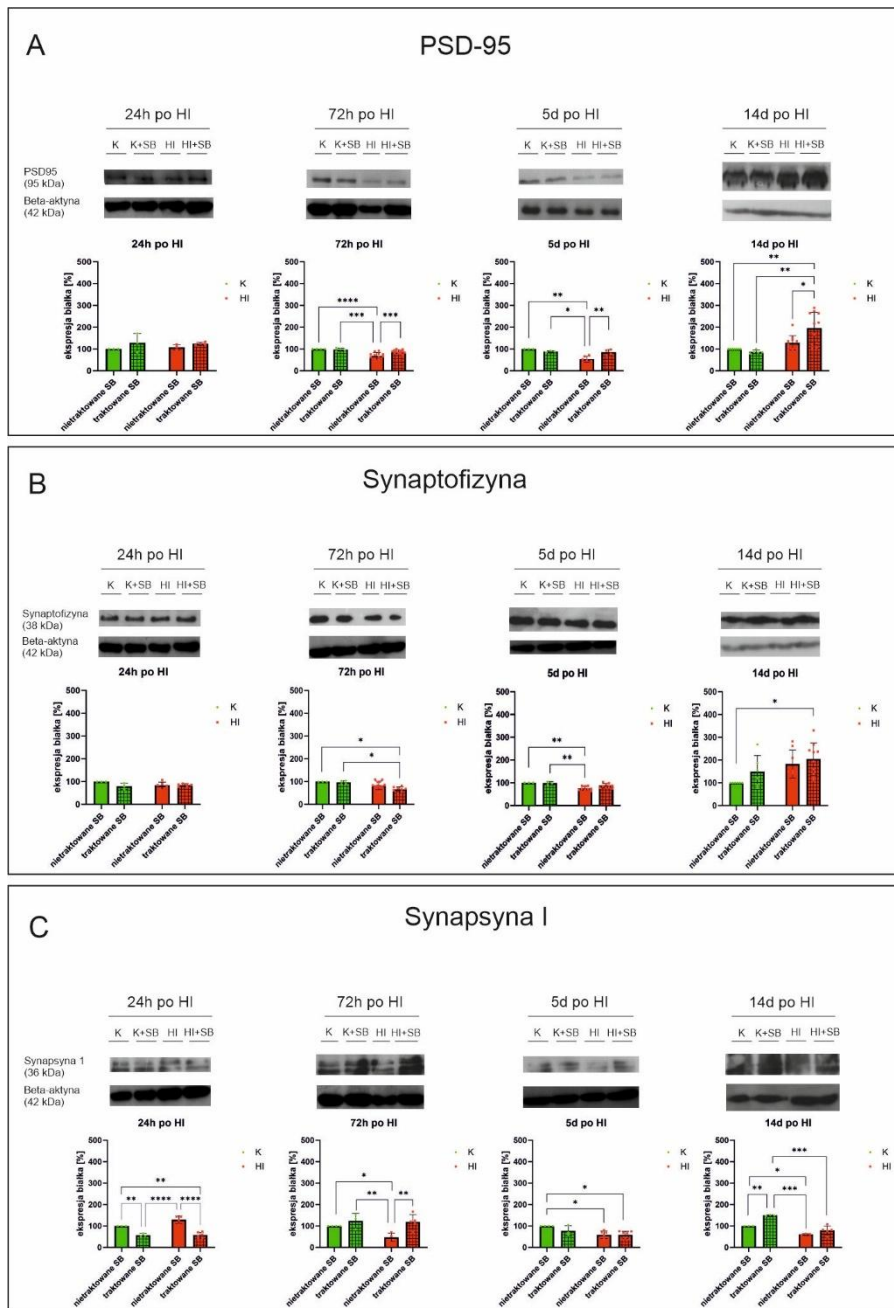
Rycina 13. Lokalizacja składników układu dopełniacza w mózgu. Przeprowadzono podwójne barwienie immunohistochemiczne na skrawkach mózgu zwierząt, u których zaindukowano HI w obecności i przy braku maślanu sodu (2 tygodnie po indukcji HI), a także zwierząt kontrolnych. K – kontrola, HI – niedotlenienie-niedokrwienie, K+SB – zwierzęta kontrolne po leczeniu maślanem sodu, HI+SB – zwierzęta po niedotlenieniu-niedokrwieniu, którym podawano maślan sodu. Kolor zielony – synaptofizyna, czerwony – C3, niebieski – Hoechst 33258. Skala 20 µm.



Rycina 14. Lokalizacja składników układu dopełniacza w mózgu. Przeprowadzono podwójne barwienie immunohistochemiczne na skrawkach mózgu zwierząt, u których zaindukowano HI w obecności i przy braku maślanu sodu (2 tygodnie po indukcji HI), a także zwierząt kontrolnych. K – kontrola, HI – niedotlenienie-niedokrwienie, K+SB – zwierzęta kontrolne po leczeniu maślanem sodu, HI+SB – zwierzęta po niedotlenieniu-niedokrwieniu, którym podawano maślan sodu. Kolor zielony – PSD-95, czerwony – C3/C5, niebieski – Hoechst 33258. Skala 50 μm .

4.1.5. Degradacja białek synaptycznych wywołana neonatalną hipoksją-ischemią

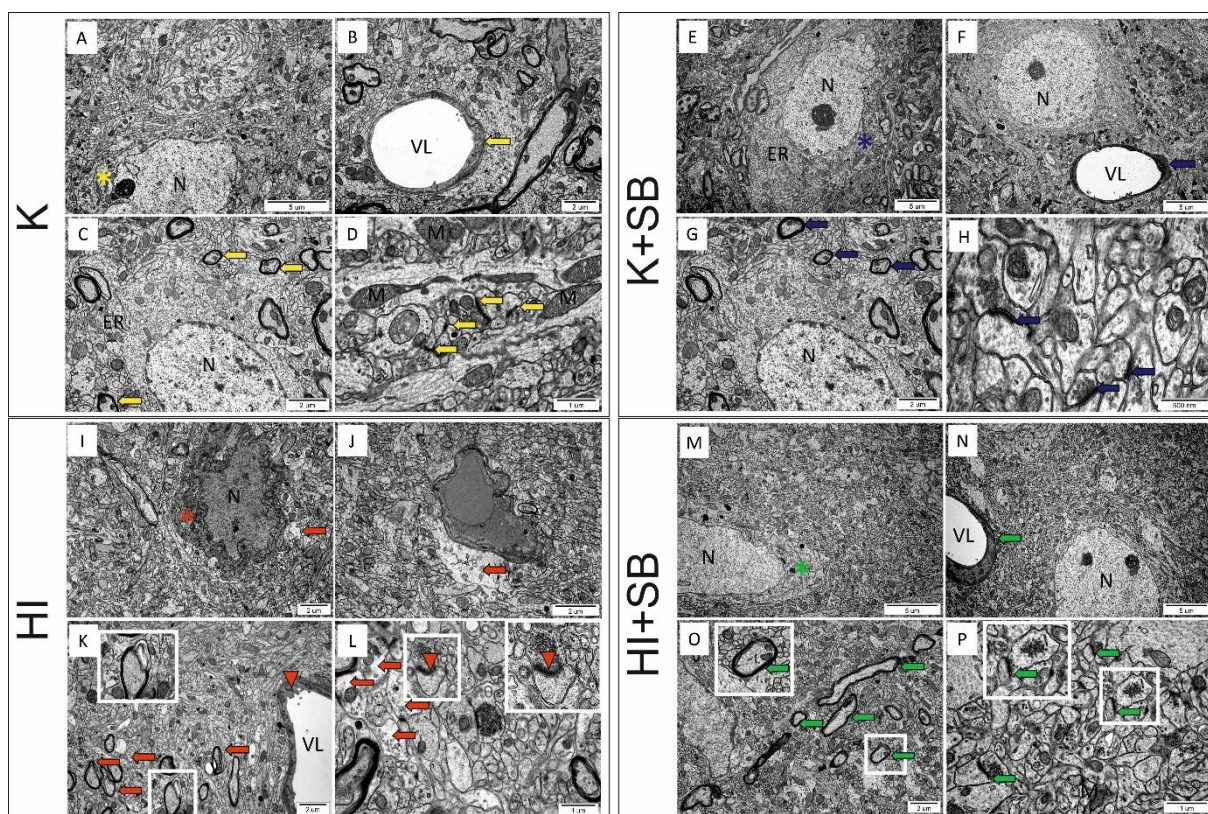
W kolejnym etapie określono wpływ hipoksji-ischemii oraz podawania maślanu sodu na ekspresję molekuł będących składnikami błon synaptycznych. W tym celu wykonano analizy metodą Western Blot. Określono poziomy białek presynaptycznych – synaptofizyny i synapsyny I oraz białka postsynaptycznego – PSD-95 w próbkach uzyskanych od zwierząt kontrolnych oraz po indukcji HI, a także od zwierząt kontrolnych i po HI traktowanych SB. Hipoksja-ischemia zmniejsza ekspresję białka PSD-95 w ipsilateralnej półkuli po 72 godzinach i 5 dniach od indukcji HI, podczas gdy po podaniu maślanu sodu ekspresja wraca do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej. Maślan sodu również zwiększył ekspresję białka PSD-95 po 14 dniach w mózgach zwierząt po HI w porównaniu do grupy, która nie była traktowana tym inhibitorem (HI+SB vs HI, $p < 0,05$) (Ryc. 15A). Wpływ HI na białko presynaptyczne – synaptofizynę nie był tak wyraźny jak w przypadku PSD-95. Istotnie statystyczne obniżenie poziomu tego białka obserwowaliśmy jedynie po 5 dniach od indukcji HI. Wpływ maślanu sodu na synaptofizynę również nie był jednoznaczny. W grupie zwierząt traktowanych inhibitorem zaobserwowano istotny spadek poziomu synaptofizyny 72 godziny po indukcji HI, natomiast w ostatnim badanym punkcie czasowym (14 dni po HI) zastosowanie SB spowodowało istotny wzrost poziomu tego białka (Ryc. 15B). W przypadku drugiego białka presynaptycznego – synapsyny I obserwowaliśmy przejściowy wzrost ekspresji po HI w pierwszym badanym punkcie czasowym (24 h), natomiast wydłużenie czasu przeżycia zwierząt istotnie statystycznie obniżało poziom synapsyny I w półkulach hipoksyjno-ischemicznych. Zastosowanie maślanu sodu po HI istotnie zwiększało ekspresję badanego białka jedynie po 72 godzinach od indukcji uszkodzenia w porównaniu do zwierząt nieleczonych (Ryc. 15C).



Rycina 15. Ekspresja białek synaptycznych w mózgu szczurów po neonatalnej hipoksji-ischemii. Przeprowadzono analizę Western Blot na materiale uzyskanym od zwierząt po HI i zwierząt kontrolnych w obecności i nieobecności maślanu sodu. Materiał uzyskano 24 h, 72 h, 5 d i 14 d po indukcji HI. A – wyniki analizy dla białka PSD-95, B – wyniki analizy dla białka synaptofizyny, C – wyniki analizy dla białka synapsyny I. K – kontrola, K+SB – kontrola z zastosowaniem maślanu sodu, HI – niedotlenienie-niedokrwienie, HI+SB – niedotlenienie-niedokrwienie z zastosowaniem maślanu sodu. Wyniki uzyskano za pomocą analizy densytometrycznej poziomów szarości prążków po rozdziale elektroforetycznym, wyrażonych jako procent stosunku gęstości optycznej (OD) prążków K+SB, HI i HI+SB w odniesieniu do K. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej min. n=3. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05.

4.1.6. Architektura tkanki mózgu po neonatalnej hipoksji-ischemii

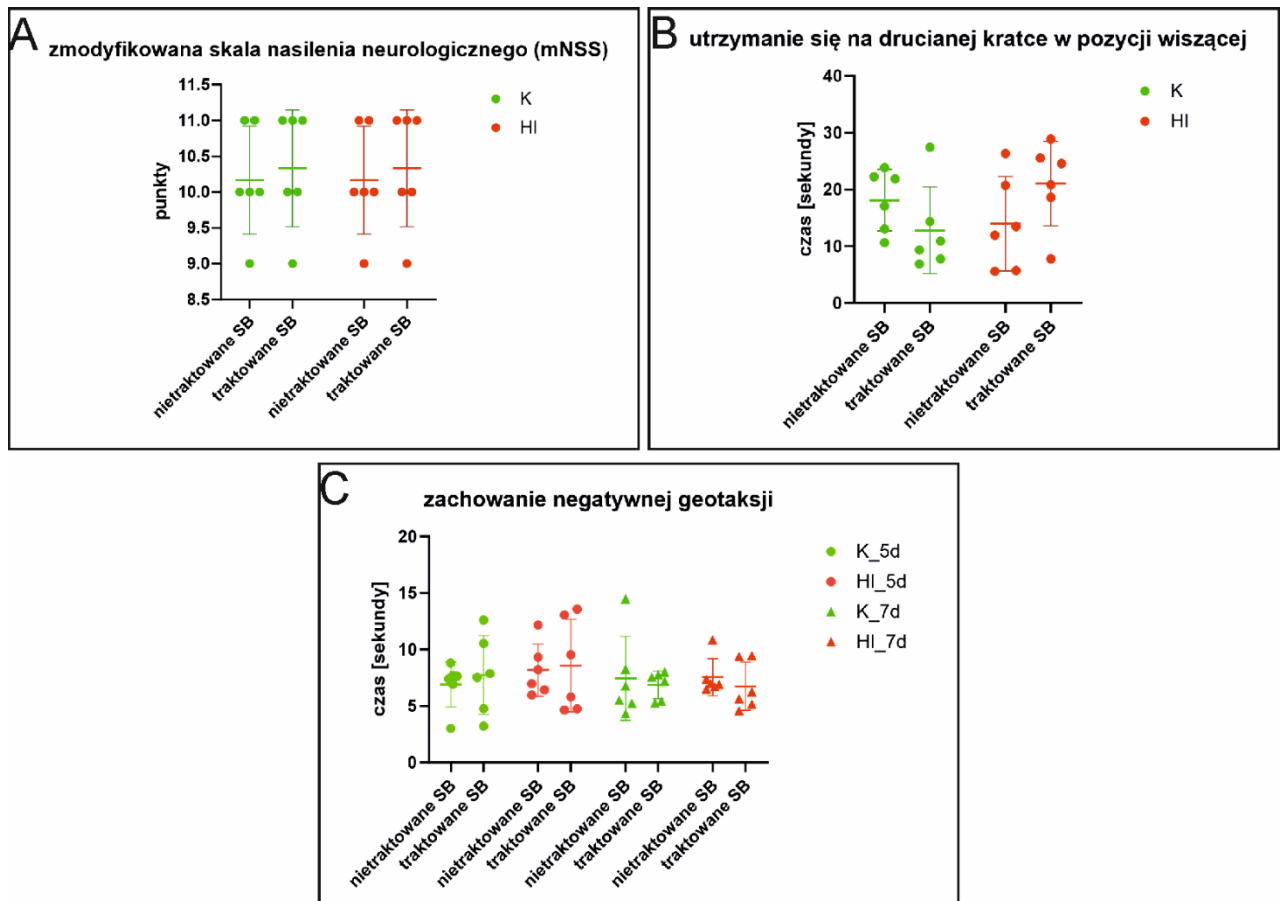
Przeprowadzono analizę morfologii tkanki mózgu, koncentrując się na połączeniach synaptycznych, z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej w Pracowni Badań Mikroskopowo-Elektronowych IMDiK PAN. Materiał do badań został pobrany tydzień po wywołaniu uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego oraz od będących w tym samym wieku zwierząt kontrolnych, a także zwierząt po indukcji HI i kontrolnych, którym podano maślan sodu. Tkanka po uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym wykazała zmiany ultrastrukturalne (Ryc. 16I-L). Zaobserwowano uszkodzenia w półkulach po hipoksji-ischemii, takie jak: obrzęk tkanki nerwowej (Ryc. 16I), „ciemne neurony” (Ryc. 16I, czerwony asterysk (*)), obrzęk okołonaczyniowy (Ryc. 16J, czerwona strzałka), wypustki śródbłonna w świetle naczyń (Ryc. 16K, czerwony grot strzałki), rozwarstwioną, degradowującą mielinę (Ryc. 16K, czerwone strzałki, białe ramki), rozmyte/zatarte struktury synaptyczne (Ryc. 16L, czerwone grotki strzałek, białe ramki) oraz obrzęk zakończeń synaptycznych (Ryc. 16L, czerwone strzałki). Podanie maślanu sodu wykazało efekt neuroprotekcyny. W tkance pobranej od zwierząt po indukcji HI, traktowanych inhibitorem wykazano lepszą morfologię neuronów (Ryc. 16M, zielony asterysk (*)), mniejszy obrzęk tkanki nerwowej (Ryc. 16M), brak poważniejszych obrzęków okołonaczyniowych (Ryc. 16N, zielona strzałka), normalną strukturę osłonek mielinowych w większości badanej tkanki (Ryc. 16O, zielone strzałki, białe ramki) oraz lepszą ultrastrukturę połączeń synaptycznych (Ryc. 16P, zielone strzałki, białe ramki) w porównaniu do zwierząt po HI, które nie były traktowane maślanem sodu. Tkanka pobrana od zwierząt kontrolnych, którym podawany był maślan sodu (Ryc. 16E-H) nie różniła się od grupy kontrolnej (Ryc. 16A-D).



Rycina 16. Zmiany ultrastruktury tkanki w mózgu zwierząt po neonatalnej hipoksji-ischemii. Przeprowadzono analizę ultrastrukturalną tkanki mózgowej zwierząt kontrolnych i po HI w obecności i przy braku maślanu sodu za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronicznej. Materiał pobrano 1 tydzień po indukcji HI. Panele A-D przedstawiają elektronografie zwierząt kontrolnych. Nie zaobserwowano żadnych zmian ultrastrukturalnych. U zwierząt po HI zaobserwowano degradację tkanek (I-L, czerwone strzałki i asterysk): I – cechy morfologiczne obrzęku tkanki nerwowej, * – „ciemny neuron”; J – cechy morfologiczne obrzęku okołonaczyniowego; K, czerwone strzałki, białe ramki – degradacja osłonek mielinowych, czerwony grot strzałki – wypukłości śródbłonna do światła naczynia; L czerwone strzałki – morfologiczne cechy obrzęku zakończeń synaptycznych, białe ramki, czerwone grot strzałki – zatarte struktury synaptyczne. Efekt neuroprotekcynny zaobserwowano po leczeniu maślanem sodu (M-P, zielone strzałki i asterysk): M – brak obrzęku tkanki nerwowej, * – morfologicznie niezmienny neuron; N – kapilarne naczynie krwionośne, brak obrzęku okołonaczyniowego; O – zwarte osłonki mielinowe; P – morfologicznie niezmiennione struktury synaptyczne. Wyniki te zostały zinterpretowane w odniesieniu do kontroli (A-D, żółte strzałki i asterysk). W grupie kontrolnej, której podawano maślan sodu (E-H, niebieskie strzałki i asterysk) nie zaobserwowano żadnych różnic morfologicznych w tkance mózgu w porównaniu do grupy kontrolnej. K – kontrola, K+SB – zwierzęta kontrolne, którym podawano maślan sodu, HI – niedotlenienie-niedokrwienie, HI+SB – niedotlenienie-niedokrwienie zwierząt po leczeniu maślanem sodu. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej n=5.

4.1.7. Wpływ maślanu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze u zwierząt po HI

W ostatnim etapie badań przeprowadzono eksperymenty mające na celu ocenę wpływu maślanu sodu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze u zwierząt po hipoksji-ischemii. Testy behawioralne przeprowadzono na zwierzętach kontrolnych oraz zwierzętach po indukcji HI, bez podania lub po podaniu maślanu sodu. Piątego i siódmego dnia po indukcji HI oraz analogicznego dnia u zwierząt kontrolnych oceniano odruch przyjmowania wyprostowanej postawy (z ang. *righting reflex test*) i zachowanie negatywnej geotaksji (z ang. *negative geotaxis behaviour test*). W pierwszym wymienionym teście, młode szczury były umieszczane w pozycji na plecach, rejestrowano czas, jaki zajmował im obrót oraz ustawienie wszystkich czterech łap z powrotem na podłożu. Wszystkie zwierzęta w każdej grupie testowej odwróciły się natychmiast (z ang. *instant*), a pomiędzy grupami badawczymi ani punktami czasowymi, w których testy były wykonywane nie stwierdzono różnic. W teście oceniającym zachowanie negatywnej geotaksji, szczury były umieszczane na pochylonej platformie (pod kątem 40°) głową w dół. Rejestrowano czas, jaki zajmowało im obrócenie się o 180° do pozycji z głową ku górze kładki, z krytycznym punktem czasowym 60 sekund. Przekroczenie 60 sek. było uznawane za brak wykonania obrotu. Wszystkie zwierzęta w każdej grupie badawczej przeszły test pomyślnie, ale nie zauważono różnic w czasie obrotu pomiędzy grupami ani punktami czasowymi, w których testy były wykonywane (Ryc. 17C). Dziesiątego dnia po indukcji HI oraz analogicznego dnia u zwierząt kontrolnych, użyto zmodyfikowanej skali nasilenia neurologicznego (mNSS), aby ocenić funkcje odruchowe, motoryczne, sensoryczne i równowagi. W tym teście zwierzęta mogły uzyskać maksymalnie 11 punktów. Ponownie, nie stwierdzono różnic w wynikach między grupami badawczymi (Ryc. 17A). Dwunastego dnia po HI oraz analogicznego dnia u zwierząt kontrolnych oceniono zdolność do utrzymania się na drucianej kratce w pozycji wiszącej (z ang. *wire hang test*). Szczury umieszczano na drucianej kratce, a następnie kratka była powoli obracana o 180°. Mierzono czas, w którym zwierzęta zwolniły uchwyt i upadały na znajdujące się bezpośrednio pod nimi miękkie podłoże. Po raz kolejny, nie stwierdzono różnic między grupami badawczymi (Ryc. 17B). W przeprowadzonych testach behawioralnych nie zaobserwowano wpływu hipoksji-ischemii ani maślanu sodu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze u młodych szczurów.



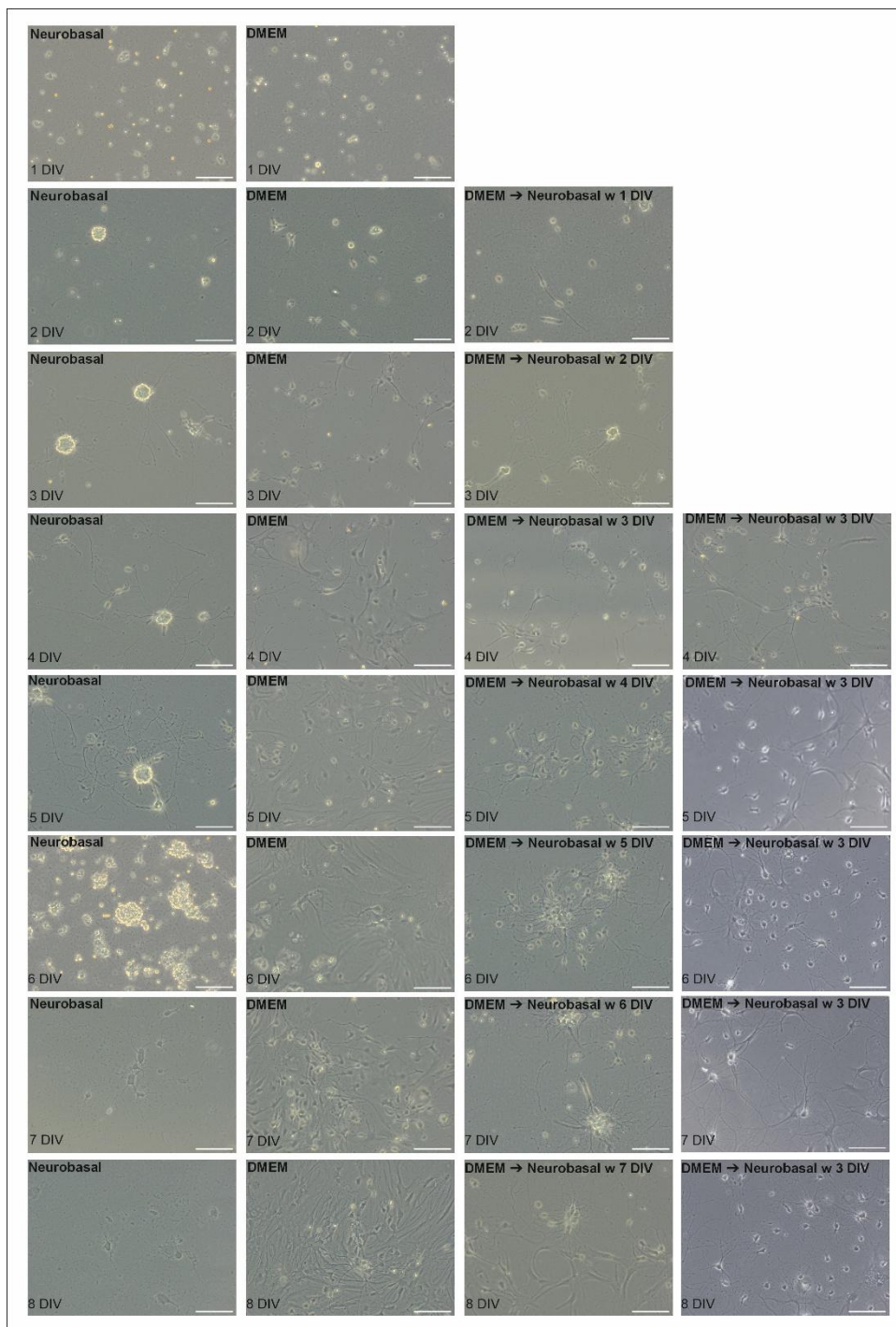
Rycina 17. Wpływ maślanu sodu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze u zwierząt po HI. Testy behawioralne przeprowadzono na zwierzętach, u których zaindukowano HI, a także na zwierzętach kontrolnych, w obecności i przy braku maślanu sodu. Test zachowania negatywnej geotaksji przeprowadzono w dniach 5 i 7 po HI oraz analogicznego dnia u zwierząt kontrolnych, a zmodyfikowaną skalę nasilenia neurologicznego i zdolność do utrzymania się na drucianej kratce w pozycji wiszącej oceniano odpowiednio w 10 i 12 dniu po HI oraz w analogicznych dniach u zwierząt kontrolnych. A – wyniki dla zmodyfikowanej skali nasilenia neurologicznego (mNSS), B – wyniki testu utrzymania się na drucianej kratce w pozycji wiszącej, C – wyniki testu zachowania negatywnej geotaksji. K – kontrola, HI – niedotlenienie-niedokrwienie. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Liczba zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej $n=6$. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego.

4.2. Model *in vitro* – współhodowle neuronów i mikrogleju

4.2.1. Ustalenie warunków hodowli pierwotnych neuronów korowych

Pierwsze próby hodowli *in vitro* pierwotnych neuronów korowych przy wysianiu komórek bezpośrednio do pożywki dedykowanej neuronom: Neurobasal + L-glutamina + B-27 + PS, określanej dalej w tekście jako Neurobasal (zgodnie z protokołem hodowli pierwotnych neuronów korowych zaproponowanym przez Vaslin i współpracowników (2007)

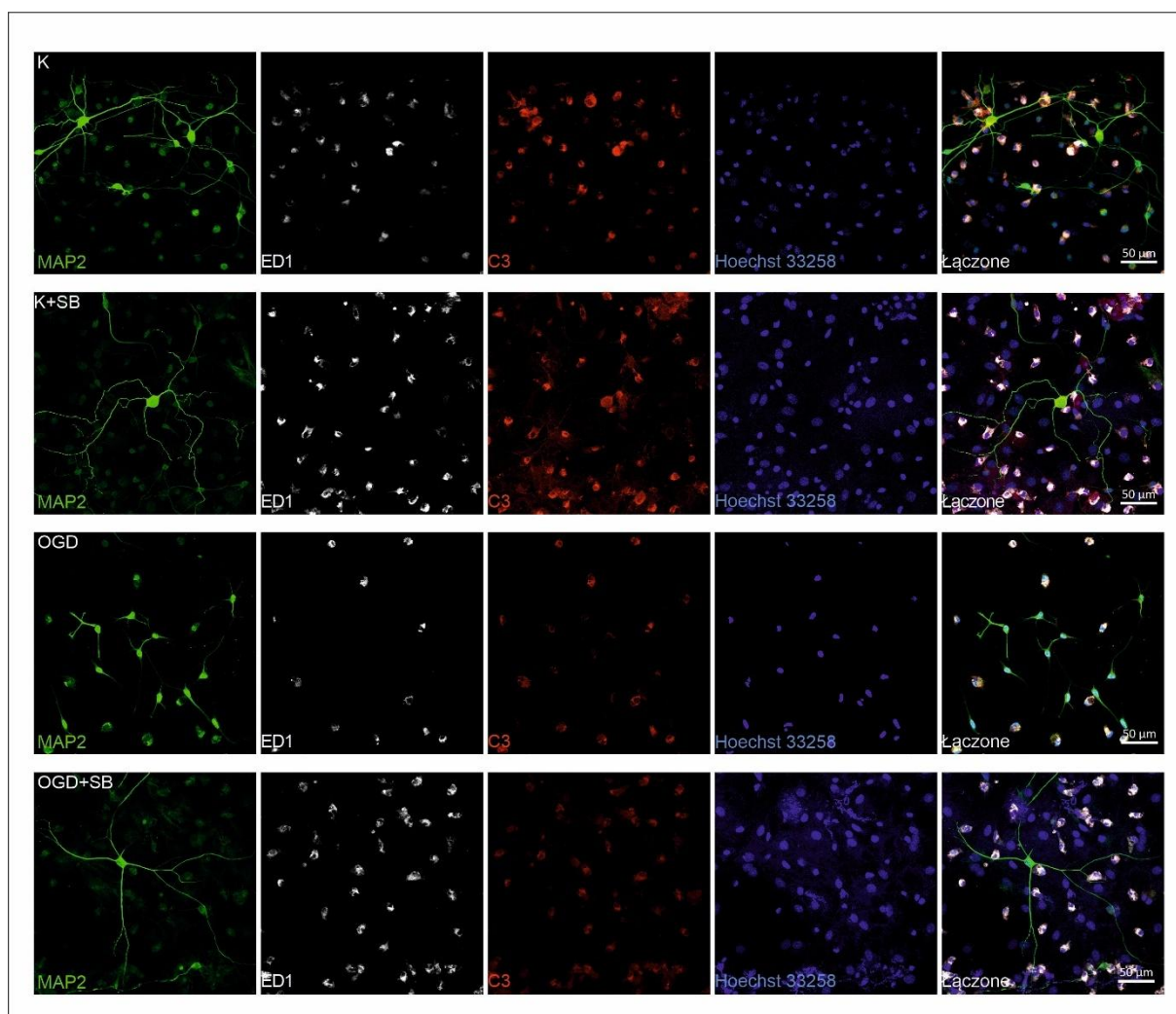
i Ginet i współpracowników (2014) [185], [186]), kończyły się niepowodzeniem. Komórki miały tendencję do tworzenia agregatów komórkowych, które nie nadawały się po utrwaleniu i wybarwieniu do przeprowadzenia analizy Sholla oraz szybko obumierały. W celu wyeliminowania tego problemu, przeanalizowano różne warianty hodowli. Sprawdzone jaki wpływ na morfologię neuronów ma długość czasu, w którym komórki utrzymywane są w pożywce zawierającej surowicę (DMEM + 10% FBS + NB-21 + AAS, określaną dalej w tekście jako DMEM), po którym zostaje dokonana zmiana na pożywkę dedykowaną neuronom – Neurobasal. Pierwotne neurony korowe wysiano na szkiełka pokryte poli-D-lizyną, umieszone w płytkach 24-dołkowych w gęstości 30000 komórek/dołek. Komórki hodowane w pożywce DMEM zostały podzielone na kilka grup eksperymentalnych, po czym w każdej z grup pożywkę DMEM zmieniano na Neurobasal innego dnia (2, 3, 4, 5, 6, 7 dnia hodowli *in vitro*). W kolejnych dniach prowadzenia hodowli dokonywano obserwacji i oceny kondycji i morfologii komórek. Zauważono, że najlepszym momentem na wymianę pożywki DMEM na Neurobasal będzie 3 dzień prowadzenia hodowli *in vitro* - 3 DIV (z ang. *day in vitro*). Zbyt wczesna zmiana pożywki skutkowała tworzeniem agregatów komórek nerwowych, które nie nadawały się do przeprowadzenia analizy Sholla. Natomiast zbyt długie utrzymywanie komórek w pożywce DMEM skutkowało bardziej fibroblastyczną morfologią hodowli komórkowej (Ryc. 18). Kiedy dokonywano zmiany rodzaju pożywki w 3 DIV, w obserwacji tych hodowli przez kolejne dni, dało się zauważyć pojedyncze komórki nerwowe, o dużym stopniu rozgałęzienia, jak i komórki sieciujące się, ponadto komórki wykazywały lepszą kondycję niż komórki z pozostałych wariantów eksperymentalnych. Oceniono, że morfologia neuronów obserwowana dla hodowli, w której dokonano zmiany pożywki DMEM na Neurobasal 3-go dnia prowadzenia hodowli *in vitro* będzie najlepsza, dla uzyskania zadowalających rezultatów podczas dalszych procedur. Dlatego też w następnych etapach tej części eksperymentów prowadzono hodowlę pierwotnych neuronów korowych ze zmianą rodzaju medium po 72 godzinach od wysiania komórek.



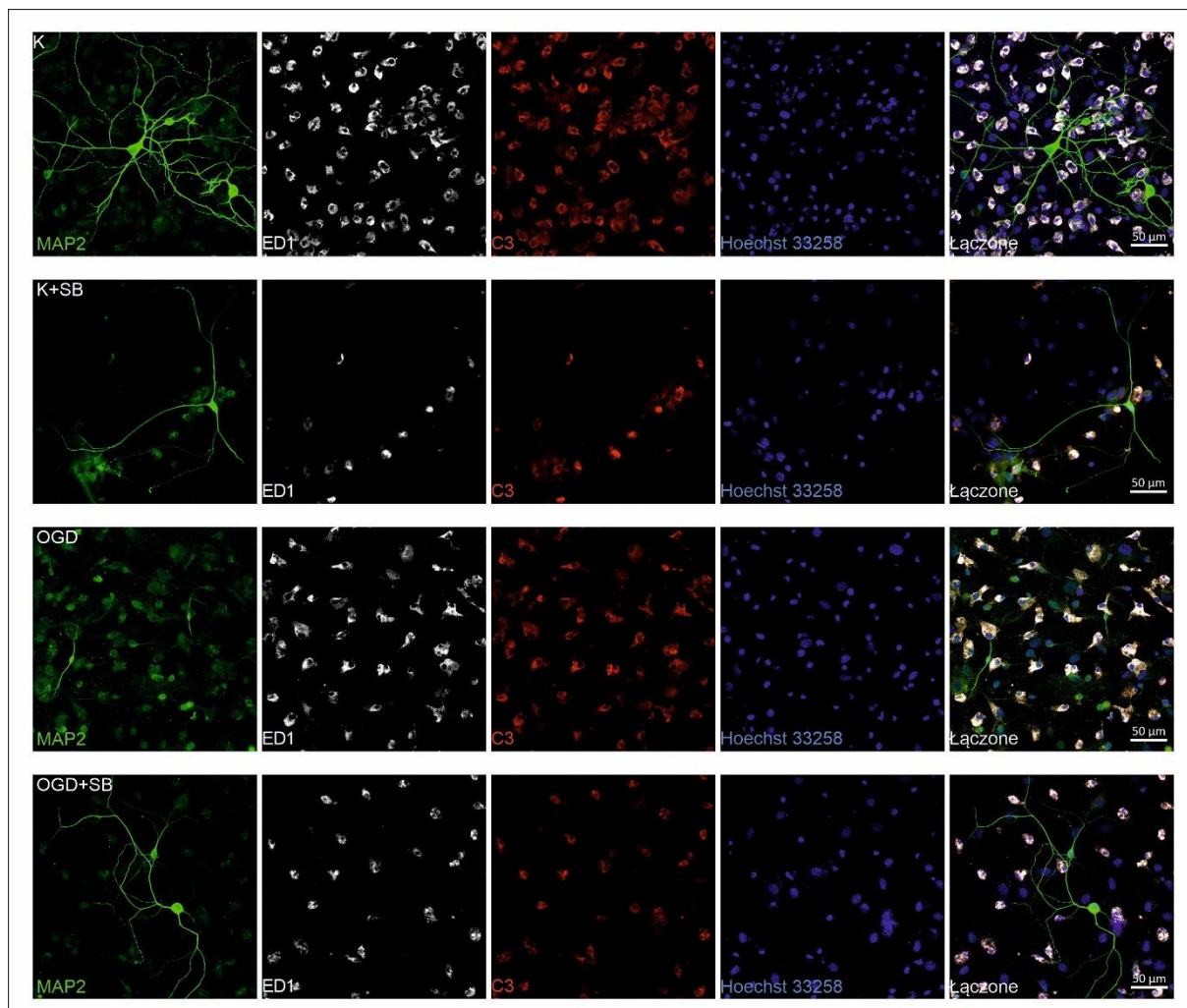
Rycina 18. Hodowla *in vitro* pierwotnych neuronów korowych. Na płytkę 24-dołkową wysiano pierwotne neurony korowe w gęstości 30000 komórek/dołek. Komórki pierwotnie wysiano w pożywce Neurobasal – Neurobasal + L-glutamina + B-27 + PS. Następnie sprawdzono jaki wpływ na morfologię neuronów ma moment, w którym komórkom utrzymywanym w pożywce zawierającej surowicę: DMEM – DMEM + 10% FBS + NB-21 + AAS, wymienia się medium na pożywkę dedykowaną neuronom – Neurobasal. Komórki hodowane w pożywce DMEM podzielono na kilka grup eksperymentalnych, w których pożywkę DMEM zmieniano na Neurobasal innego dnia (2, 3, 4, 5, 6, 7 dnia hodowli *in vitro*). Hodowle obserwowano przez kolejne dni. DIV – dzień prowadzenia hodowli *in vitro*. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej n=5. Skala 100 μ m.

4.2.2. Wpływ maślanu sodu na aktywację mikrogleju, lokalizację białek dopełniacza oraz morfologię neuronów po procedurze OGD

Ponieważ komórki mikrogleju przy zaangażowaniu białek układu dopełniacza mogą odgrywać ważną rolę w przycinaniu wypustek neuronów podczas rozwoju mózgu, jak i w różnych stanach patologicznych, podjęto próbę zlokalizowania komórek mikrogleju i białek układu dopełniacza we współhodowlach pierwotnych neuronów korowych z pierwotnymi komórkami mikrogleju, poddanych procedurze OGD, w obecności i braku badanego inhibitora, jak i we współhodowlach kontrolnych. Sprawdzone, czy mikroglej oraz białka dopełniacza znajdują się w pobliżu wypustek neuronalnych oraz czy deficyt tlenowo-glukozowy oraz podawanie maślanu sodu wpływa na ich lokalizację. Aby określić obecność mikrogleju i białka C3 układu dopełniacza w pobliżu neuronów, przeprowadzono potrójne barwienie immunocytochemiczne. Materiał komórkowy utrwalano 24 i 72 godziny po procedurze OGD. Wyniki immunocytochemiczne oceniano za pomocą konfokalnego mikroskopu skanującego (LSM 780, CarlZeiss) wyposażonego w oprogramowanie Zeiss LSM ImageBrowser. Odnotowano mniejszą liczbę wypustek neuronalnych oraz mniejsze ich rozgałęzienie we współhodowlach neuronów z mikroglejem po OGD, zarówno po 24, jak i 72 godzinach od przeprowadzenia procedury. Podanie maślanu sodu powodowało ochronę komórek nerwowych. Neurony we współhodowlach po OGD, w obecności SB wykazywały dłuższe wypustki, większą ich liczbę oraz większy stopień ich rozgałęzienia w porównaniu do grupy po OGD bez traktowania maślanem sodu (24 i 72 godziny od OGD) (Ryc. 19 i 20). Pomimo wykonania wielu prób barwienia immunocytochemicznego, komórki aktywowanego mikrogleju oraz białko C3 układu dopełniacza zauważano w sąsiedztwie wypustek neuronów we wszystkich badanych grupach w obu analizowanych punktach czasowych (Ryc. 19, 20). Biorąc po uwagę uzyskane wyniki, nie możemy jednoznacznie stwierdzić, czy procedura OGD i podawanie maślanu sodu wpływają na lokalizację i aktywację mikrogleju oraz białek dopełniacza (Ryc. 19 i 20). Liczne kolokalizacje aktywnego mikrogleju z białkiem C3 przy wypustkach neuronów sugerują, że układ dopełniacza angażuje mikroglej w ich przycinanie, jednak, na podstawie uzyskanych barwień immunocytochemicznych, nie możemy tego jednoznacznie potwierdzić. Ponieważ nie udało nam się wykazać żadnych różnic w aktywacji mikrogleju pomiędzy analizowanymi grupami badawczymi, w dalszej części eksperymentu skupiono się wyłącznie na dokładniejszej ocenie wpływu procedury OGD i podawania SB na morfologię neuronów.



Rycina 19. Wpływ maślanu sodu na aktywację mikrogleju i ochronę neuronów po 24 godzinach od procedury OGD. Przeprowadzono potrójne barwienie immunocytochemiczne na współhodowlach pierwotnych komórek mikrogleju z pierwotnymi neuronami korowymi, które poddano procedurze OGD w obecności i przy braku maślanu sodu, a także na współhodowlach kontrolnych. Komórki utrwalano 24 godziny od procedury OGD. K – kontrola, K+SB – kontrola traktowana maślanem sodu, OGD – deficyt tleno-glukozowy, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane maślanem sodu. Kolor zielony – MAP2, biały – ED1, czerwony – C3, niebieski – Hoechst 33258. Skala 50 µm.



Rycina 20. Wpływ maślanu sodu na aktywację mikrogleju i ochronę neuronów po 72 godzinach od procedury OGD. Przeprowadzono potrójne barwienie immunocytochemiczne na współhodowlach pierwotnych komórek mikrogleju z pierwotnymi neuronami korowymi, które poddano procedurze OGD w obecności i przy braku maślanu sodu, a także na współhodowlach kontrolnych. Komórki utrwalano 72 godziny od procedury OGD. K – kontrola, K+SB – kontrola traktowana maślanem sodu, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane maślanem sodu. Kolor zielony – MAP2, biały – ED1, czerwony – C3, niebieski – Hoechst 33258. Skala 50 µm.

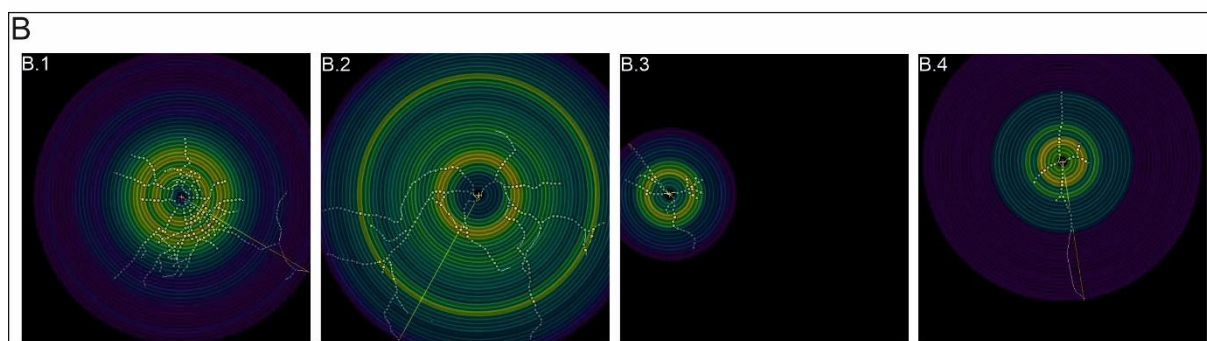
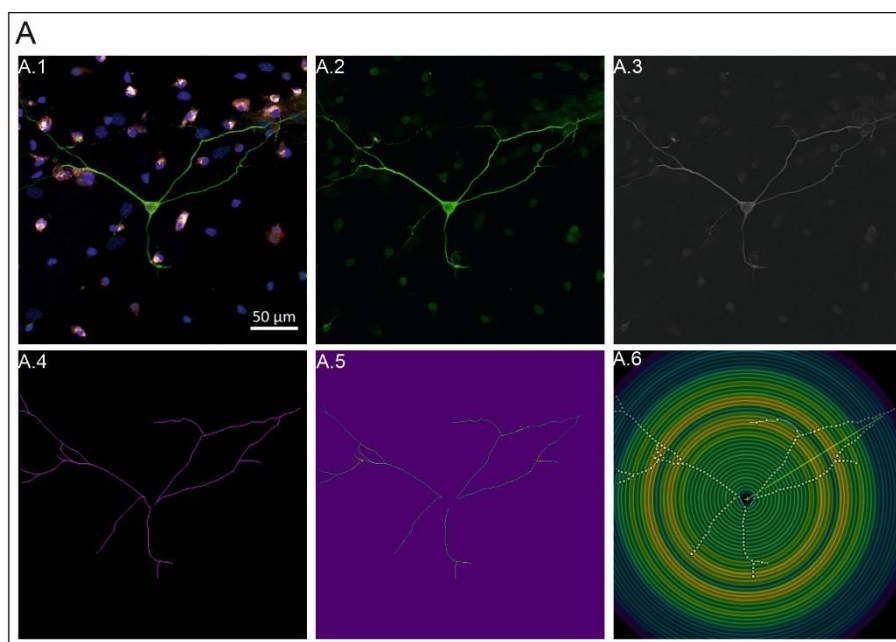
4.2.3. Wpływ maślanu sodu na morfologię neuronów po procedurze OGD – analiza Sholla

Sposobem na ocenę wpływu maślanu sodu na morfologię neuronów po procedurze OGD była analiza liczby wytwarzanych przez nie wypustek oraz stopnia ich rozgałęzienia. Na podstawie reprezentatywnych zdjęć mikroskopowych pierwotnych neuronów korowych wyznakowanych przeciwciałem anty-MAP2 (Ryc. 21A.1, A.2 oraz 22A.1 i A.2)

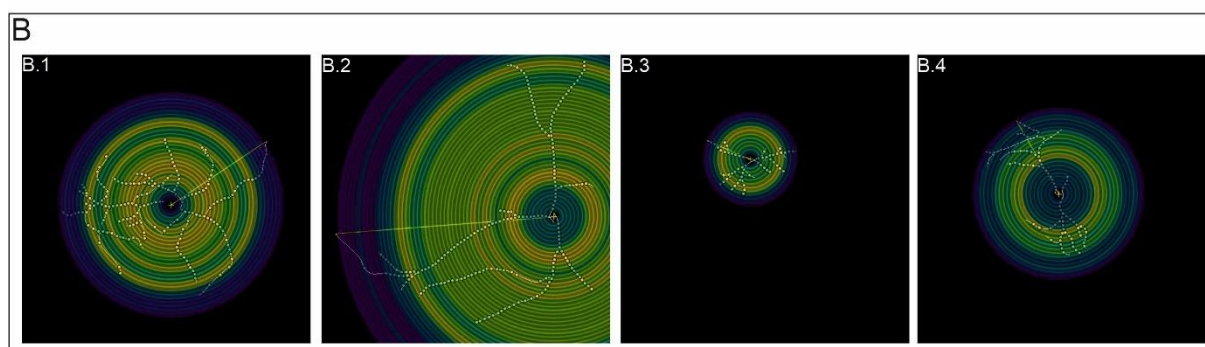
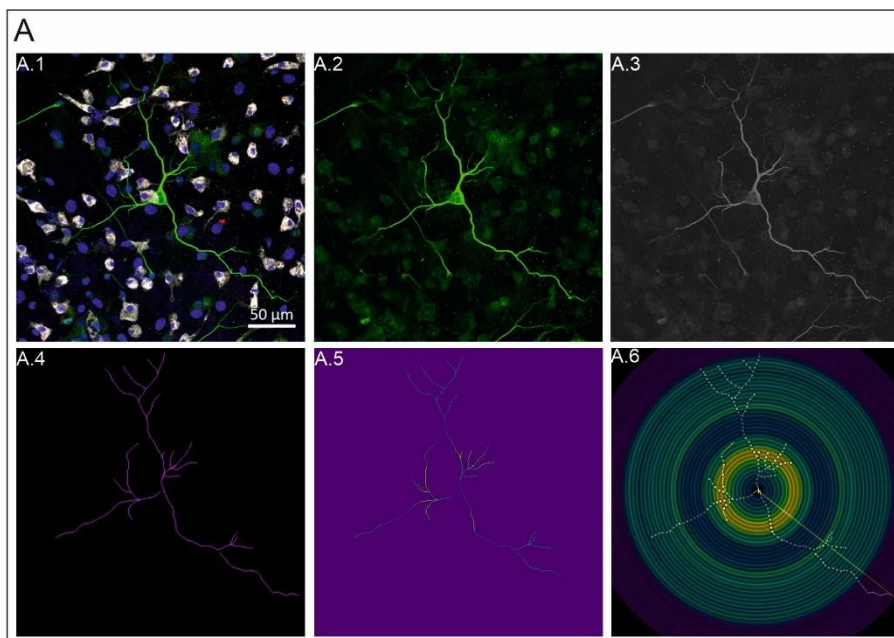
we współhodowlach z pierwotnym mikroglejem przy użyciu rozszerzenia NeuronJ (<https://imagej.net/NeuronJ>) do programu ImageJ wykonywano tzw. maski komórek, odzwierciedlające dendryty neuronów (Rycina 21A.3 - A.5 oraz 22A.3 - A.5). Następnie przy pomocy rozszerzenia Sholl Analysis programu ImageJ, na przygotowane maski komórek nakładano serie koncentrycznych kręgów w odstępach co 4 μm , o środku w obrębie ciała komórki (Rycina 21A.6 oraz 22A.6). W kolejnym kroku zliczano wszystkie przecięcia wypustek z poszczególnymi okręgami. Otrzymane dane posłużyły do obliczenia szeregu parametrów charakteryzujących stopień rozgałęzienia wypustek neuronów i złożoność ich budowy.

Przeprowadzono cenę wpływu OGD i podawania maślanu sodu na stopień rozgałęzienia wypustek neuronów z zastosowaniem analizy Sholla obrazów mikroskopowych komórek utrwalonych 24 i 72 godziny po procedurze OGD, wyznakowanych markerem anty-MAP2, który dobrze wybarwia dendryty komórek nerwowych. Na Rycinie 21B i Rycinie 22B przedstawiono reprezentatywne schematy komórek poddane analizie Sholla. Wyniki pomiarów 30 reprezentatywnych komórek dla każdej z grup eksperymentalnych pokazujące średnią liczbę przecięć wypustek na okrąg w odniesieniu do odległości od środka ciała komórki przedstawiono na Rycinie 23. Zauważono, że neurony po procedurze OGD charakteryzują się najmniejszą długością wypustek w porównaniu do pozostałych grup badawczych w obu analizowanych czasach. Dodatkowo charakteryzują się najmniejszym stopniem rozgałęzienia wypustek. W hodowlach poddanych procedurze OGD po zastosowaniu maślanu sodu, charakterystyka wypustek neuronów była zbliżona do wypustek komórek kontrolnych, co szczególnie widać po 72 godzinach od deficytu tlenowo-glukozowego (Ryc. 23A i B). Współczynnik regresji Sholla (z ang. *k-Sholl's regression coefficient*) przedstawiony został jako współczynnik k z równania regresji liniowej $\log_{10} \left(\frac{N}{S} \right) = -k * r + m$, gdzie N odpowiada średniej liczbie przecięć na dany okrąg o promieniu r ; S odpowiada długości obwodu tego okręgu (Ryc. 24 i 25). Współczynnik k określający nachylenie krzywej regresji liniowej na otrzymanych wykresach wskazuje na stopień rozgałęzienia komórek w odniesieniu do odległości od środka komórki. Im większa wartość współczynnika, tym rozgałęzienie komórek jest większe bliżej ciała komórki. Otrzymane wyniki wskazują, że wartość współczynnika k była najmniejsza dla komórek poddanych procedurze OGD w obu analizowanych czasach (Ryc. 24 i 25). W analizie neuronów po OGD, hodowanych w obecności maślanu sodu współczynnik regresji liniowej k był wyższy niż dla komórek po OGD hodowanych bez inhibitora i zbliżał się do wartości współczynnika k otrzymanego

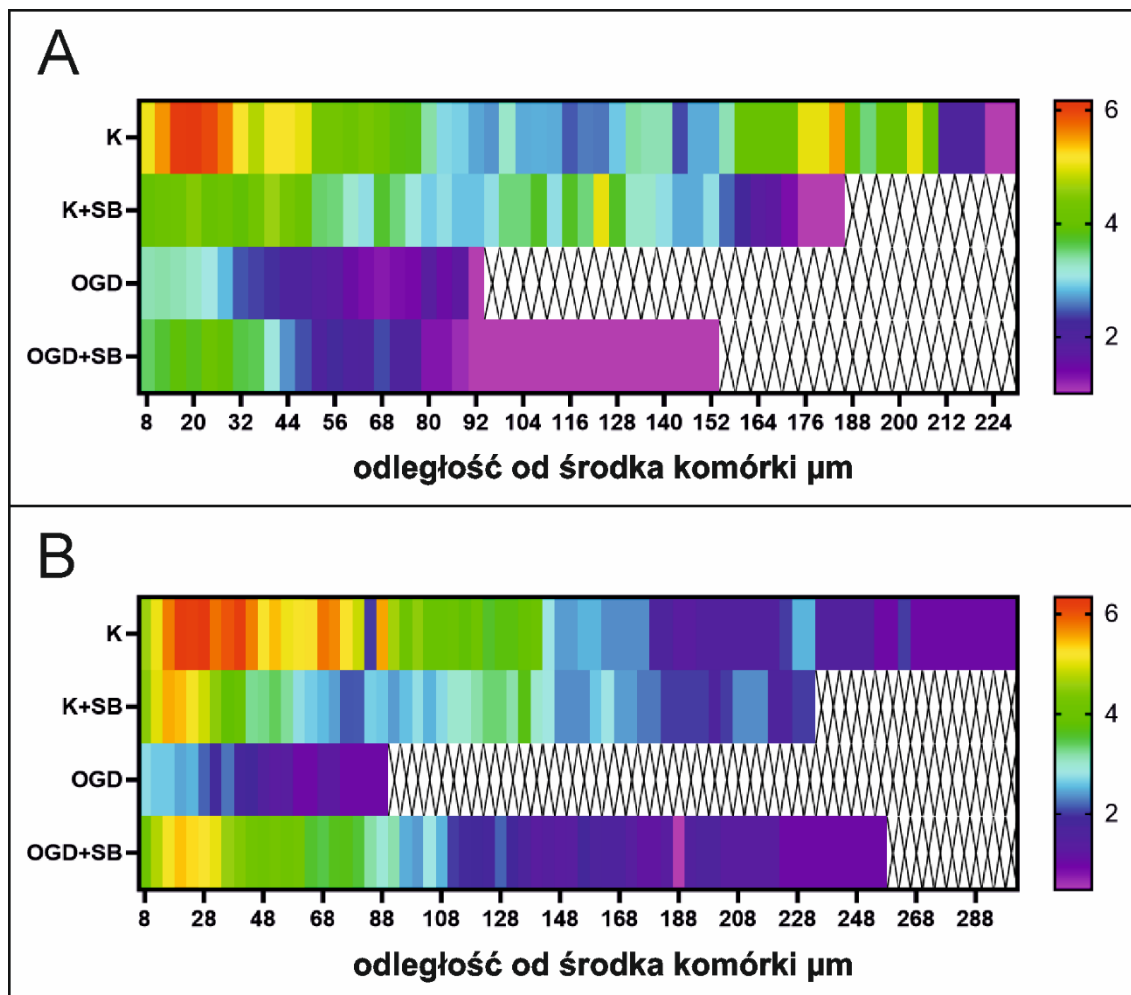
dla komórek kontrolnych (Ryc. 24 i 25), co jest szczególnie widoczne po 72 godzinach od procedury OGD. Świadczyć to może o tym, że maślan sodu działa ochronnie na komórki nerwowe. Analiza pozostałych parametrów wskazuje przede wszystkim na zwiększenie długości wypustek w grupie OGD+SB w stosunku do komórek po OGD (Rycina 26, Tabele 14 i 15), o czym świadczy dłuższy promień ostatniego okręgu, na którym wykryto przecięcia z komórką ($72,00 \pm 33,42 \mu\text{m}$ w OGD+SB vs. $44,61 \pm 25,26 \mu\text{m}$ w OGD po 24 h oraz $100,19 \pm 56,90 \mu\text{m}$ w OGD+SB vs. $51,33 \pm 18,34 \mu\text{m}$ w OGD po 72 h). Maksymalna liczba przecięć dendrytów z okręgiem również była dużo większa dla grupy poddanej deficytowi tlenowo-glukozowemu, której podawano inhibitor, niż w grupie, której nie aplikowano SB (Ryc. 26, Tabele 14 i 15). O większym skomplikowaniu budowy neuronów po OGD, którym podawano SB w odniesieniu do komórek bez wystawienia na działanie inhibitora, świadczy również większa liczba wypustek pierwszorzędowych (Ryc. 26, Tabele 14 i 15). Do ocenianych parametrów należy również współczynnik rozgałęzienia RI (z ang. *ramification index*), obliczany jako iloraz maksymalnej liczby przecięć oraz liczby wypustek pierwszorzędowych. I w tym przypadku możemy mówić o korzystnym efekcie podawania maślanu sodu po OGD. Stopień rozgałęzienia komórek w grupie OGD+SB był wyższy od stopnia rozgałęzienia komórek po OGD i zbliżał się do wartości charakterystycznych dla komórek z grup kontrolnych, szczególnie po 72 godzinach od procedury deficytu tlenowo-glukozowego (Ryc. 26, Tabele 14 i 15). Warto również podkreślić, że po procedurze OGD wykazano mniejszą przeżywalność neuronów. Z przeprowadzonych pomiarów można zatem wywnioskować, że maślan sodu działa ochronnie na neurony poddane procedurze OGD, mają one więcej wypustek, które są jednocześnie dłuższe i bardziej rozgałęzione. Podsumowanie wyników oceny wpływu OGD i podawania maślanu sodu przedstawiono na Rycinie 26 i w Tabelach 14 i 15.



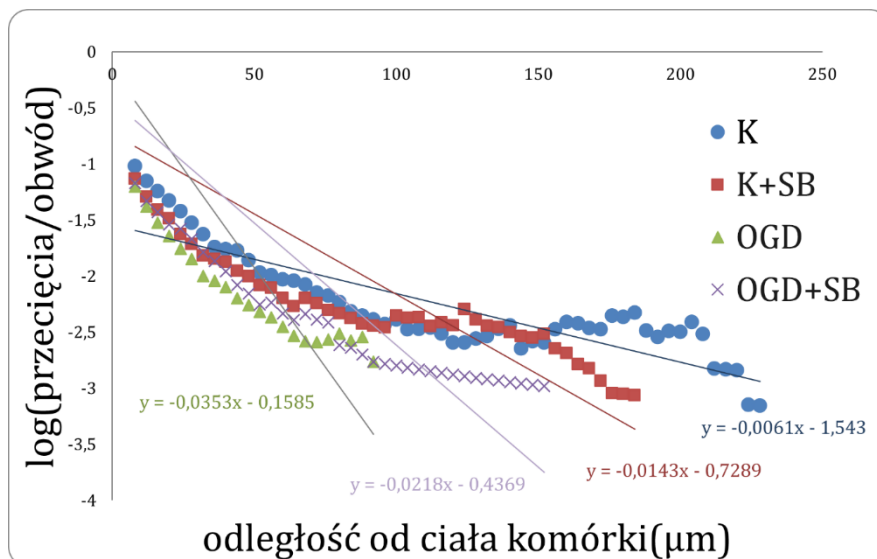
Rycina 21. Schemat przygotowania analizy Sholla – 24 godziny po procedurze OGD. A – Schemat przygotowania obrazów mikroskopowych do analizy Sholla. A.1 – oryginalny obraz z mikroskopii konfokalnej (kolor zielony – MAP2, czerwony – C3, biały – ED1, niebieski – Hoechst 33258, skala 50 μm). A.2 – kanał C1 z mikroskopii konfokalnej (zielony – MAP2); A.3 – tworzenie binarnego obrazu komórki; A.4 – tworzenie ścieżek wypustek komórki; A.5 – tworzenie maski komórki; A.6 – nakładanie serii koncentrycznych okręgów i wykrywanie przecięć z wypustkami komórki. B – Analiza rozgałęzień neuronów metodą Sholla po 24 godzinach hodowli. B.1 – reprezentatywny schemat komórki kontrolnej w analizie Sholla; B.2 – reprezentatywny schemat komórki kontrolnej po podaniu SB w analizie Sholla; B.3 – reprezentatywny schemat komórki po procedurze OGD w analizie Sholla; B.4 – reprezentatywny schemat komórki po OGD traktowanej maślanem sodu w analizie Sholla.



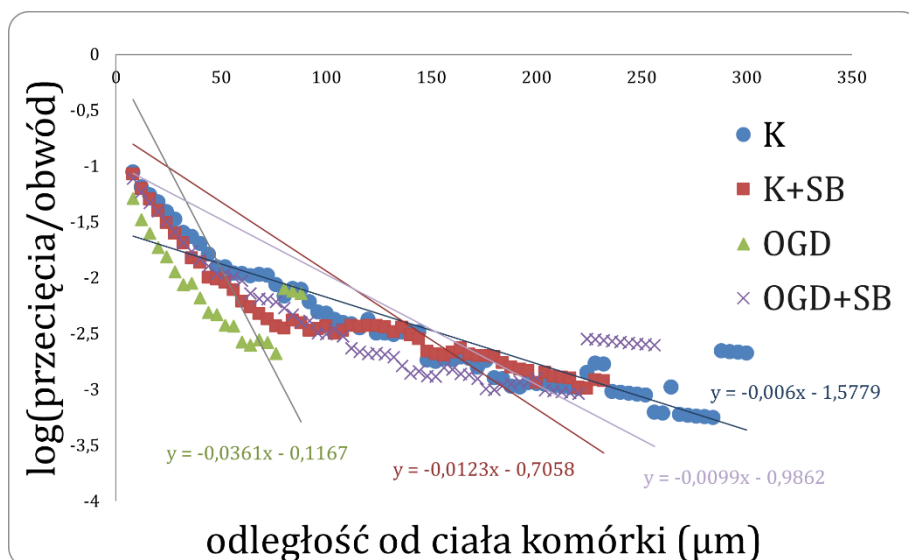
Rycina 22. Schemat przygotowania analizy Sholla – 72 godziny po procedurze OGD. A – Schemat przygotowania obrazów mikroskopowych do analizy Sholla. A.1 – oryginalny obraz z mikroskopii konfokalnej (kolor zielony – MAP2, czerwony – C3, biały – ED1, niebieski – Hoechst 33258, skala 50 μm). A.2 – kanał C1 z mikroskopii konfokalnej (zielony – MAP2); A.3 – tworzenie binarnego obrazu komórki; A.4 – tworzenie ścieżek wypustek komórki; A.5 – tworzenie maski komórki; A.6 – nakładanie serii koncentrycznych okręgów i wykrywanie przecięć z wypustkami komórki. B – Analiza rozgałęzień neuronów metodą Sholla po 72 godzinach hodowli. B.1 – reprezentatywny schemat komórki kontrolnej w analizie Sholla; B.2 – reprezentatywny schemat komórki kontrolnej po podaniu SB w analizie Sholla; B.3 – reprezentatywny schemat komórki po procedurze OGD w analizie Sholla; B.4 – reprezentatywny schemat komórki po OGD traktowanej maślanem sodu w analizie Sholla.



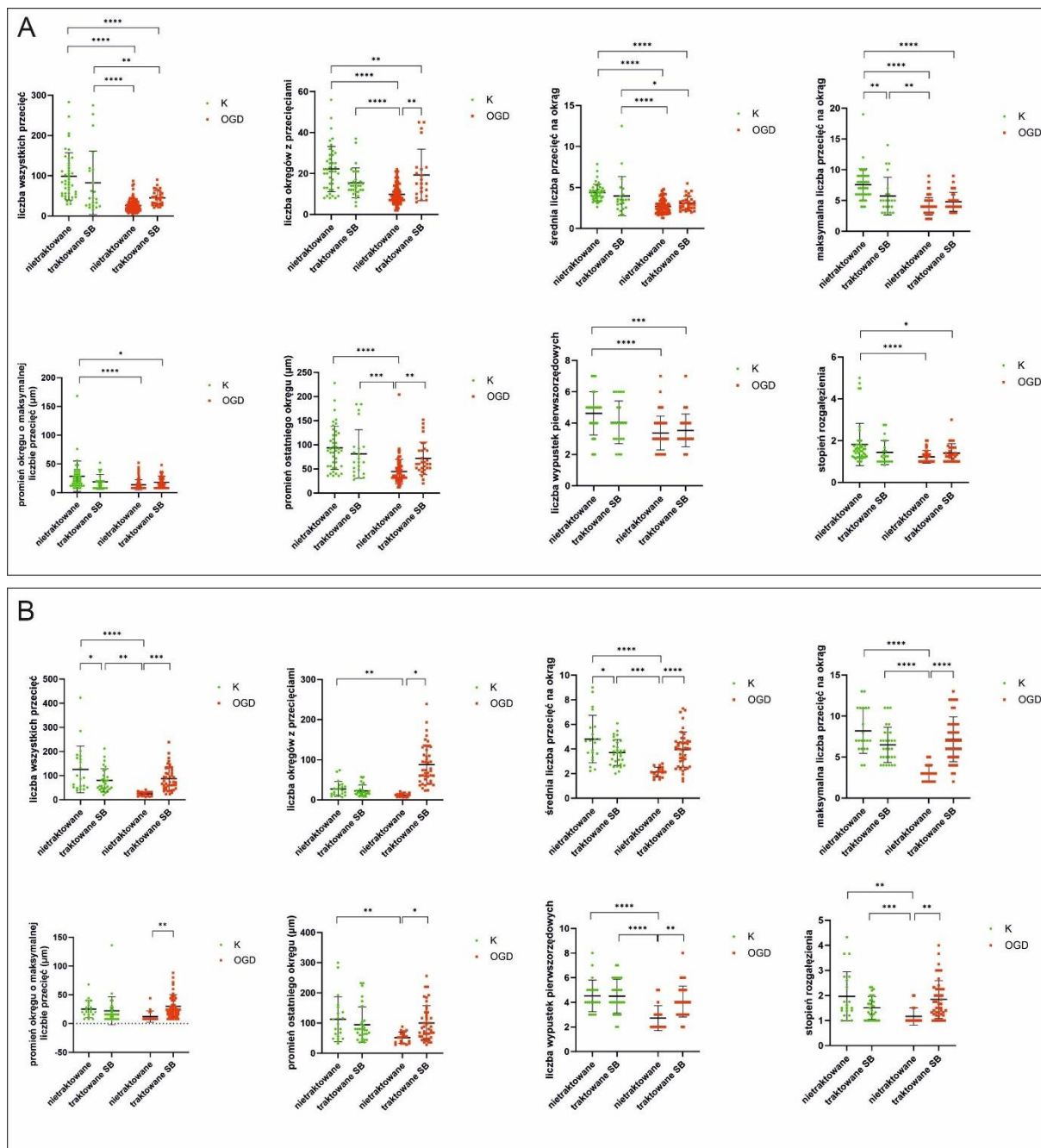
Rycina 23. Wykres typu heatmap pokazujący średnią liczbę przecięć wypustek na okrąg w odniesieniu do odległości od środka komórki. A – wykres przedstawiający średnią liczbę przecięć wypustek na okrąg w odniesieniu do odległości od środka ciała komórki po 24 godzinach od procedury OGD, B – wykres przedstawiający średnią liczbę przecięć wypustek na okrąg w odniesieniu do odległości od środka ciała komórki po 72 godzinach od procedury OGD. K – kontrola, K+SB – kontrola traktowana SB, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane SB. Liczba komórek poddanych analizie w każdej z grup n=30. Skala: kolor czerwony – największa liczba przecięć, kolor fioletowy – brak przecięć.



Rycina 24. Wykres półlogarytmiczny przedstawiający średnią liczbę przecięć znormalizowaną w odniesieniu do obwodu okręgu – 24 godziny po procedurze OGD; nachylenie krzywej regresji liniowej na uzyskanym wykresie wskazuje na stopień rozgałęzienia komórki w stosunku do odległości od środka komórki, oceniony przez obliczony współczynnik regresji Sholla k ; K – kontrola, K+SB – kontrola traktowana SB, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane SB. Liczba komórek poddanych analizie w każdej z grup $n=30$.



Rycina 25. Wykres półlogarytmiczny przedstawiający średnią liczbę przecięć znormalizowaną w odniesieniu do obwodu okręgu – 72 godziny po procedurze OGD; nachylenie krzywej regresji liniowej na uzyskanym wykresie wskazuje na stopień rozgałęzienia komórki w stosunku do odległości od środka komórki, oceniony przez obliczony współczynnik regresji Sholla k ; K – kontrola, K+SB – kontrola traktowana SB, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane SB. Liczba komórek poddanych analizie w każdej z grup $n=30$.



Rycina 26. Wykresy przedstawiające wskaźniki Sholla obliczone na podstawie uzyskanych danych.

A – analiza rozgałęzień metodą Sholla po 24 godzinach od OGD. B – analiza rozgałęzień metodą Sholla po 72 godzinach od OGD. K – kontrola, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie otrzymanych wyników \pm odchylenie standardowe (SD). Liczba komórek poddanych analizie w każdej z grup $n=30$. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$.

Tabela 14. Zestawienie wskaźników Sholla obliczone na podstawie uzyskanych danych – 24 godziny od OGD. K – kontrola, K+SB – kontrola traktowana SB, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane SB. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie otrzymanych wyników ± odchylenie standardowe (SD). Liczba komórek poddanych analizie w każdej z grup n=30. Aby Tabela pozostała czytelna, nie przedstawiono w niej istotności statystycznych. Wszystkie istotności statystyczne naniesiono na Rycinę 26.

	K	K+SB	OGD	OGD+SB
Liczba wszystkich przecięć	98,62 ± 57,71	82,64 ± 77,10	26,38 ± 16,16	45,1 ± 17,84
Liczba okręgów z przecięciami	22,21 ± 10,90	19,27 ± 12,29	9,79 ± 4,69	15,47 ± 7,16
Średnia liczba przecięć na okrąg	4,40 ± 1,02	3,96 ± 2,34	2,66 ± 0,82	3,08 ± 0,85
Maksymalna liczba przecięć na okrąg	7,57 ± 2,575	5,73 ± 2,99	4,07 ± 1,42	4,8 ± 1,51
Promień okręgu z maksymalną liczbą przecięć (µm)	28,67 ± 26,08	18,91 ± 12,49	13,69 ± 8,88	18,27 ± 10,36
Promień ostatniego okręgu (µm)	93,81 ± 44,28	81,09 ± 49,16	44,61 ± 25,26	72,00 ± 33,42
Liczba wypustek pierwszorzędowych	4,61 ± 1,36	4,05 ± 1,33	3,36 ± 1,07	3,53 ± 1,02
Stopień rozgałęzienia	1,82 ± 1,00	1,44 ± 0,57	1,23 ± 0,30	1,40 ± 0,44

Tabela 15. Zestawienie wskaźników Sholla obliczone na podstawie uzyskanych danych – 72 godziny od OGD. K – kontrola, K+SB – kontrola traktowana SB, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane SB. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie otrzymanych wyników \pm odchylenie standardowe (SD). Liczba komórek poddanych analizie w każdej z grup n=30. Aby Tabela pozostała czytelna, nie przedstawiono w niej istotności statystycznych. Wszystkie istotności statystyczne naniesiono na Rycinę 26.

	K	K+SB	OGD	OGD+SB
Liczba wszystkich przecięć	125,48 \pm 94,19	79,93 \pm 47,29	24,33 \pm 9,05	87,53 \pm 48,85
Liczba okręgów z przecięciami	27,10 \pm 18,08	22,63 \pm 14,46	11,78 \pm 4,55	24,07 \pm 14,20
Średnia liczba przecięć na okrąg	4,80 \pm 1,89	3,71 \pm 1,03	2,11 \pm 0,38	3,95 \pm 1,42
Maksymalna liczba przecięć na okrąg	8,19 \pm 2,67	6,50 \pm 2,11	3,06 \pm 0,97	7,16 \pm 2,69
Promień okręgu z maksymalną liczbą przecięć (μm)	25,14 \pm 14,19	22,13 \pm 23,82	12,22 \pm 9,19	29,95 \pm 20,07
Promień ostatniego okręgu (μm)	112,38 \pm 72,31	94,53 \pm 57,82	51,33 \pm 18,34	100,19 \pm 56,90
Liczba wypustek pierwszorzędowych	4,52 \pm 1,26	4,50 \pm 1,34	2,72 \pm 0,99	4,07 \pm 1,25
Stopień rozgałęzienia	1,97 \pm 0,95	1,51 \pm 0,45	1,17 \pm 0,33	1,84 \pm 0,75

4.3. Model *in vitro* - linia BV2 mikrogleju

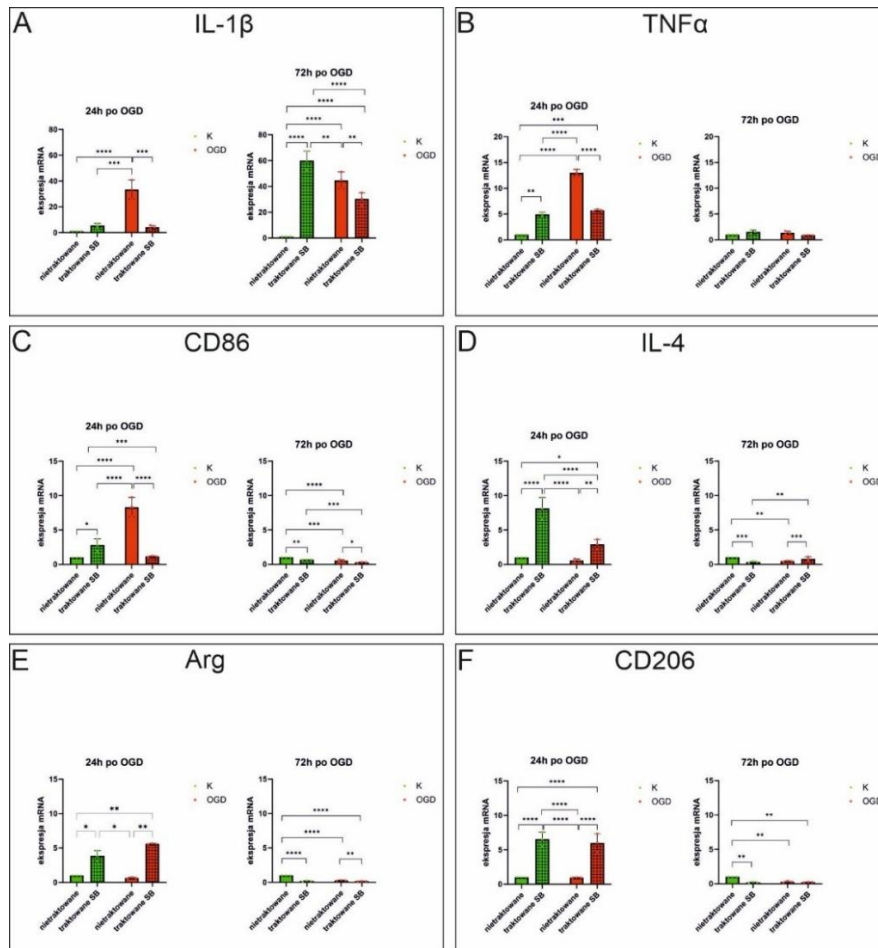
4.3.1. Wpływ maślanu sodu na ekspresję wybranych genów mikrogleju po procedurze OGD

W pierwszym etapie badań nad linią BV2 mikrogleju wykonano ilościową analizę PCR do oceny wpływu maślanu sodu na ekspresję genów pro- i przeciwzapalnych w hodowlach kontrolnych, jak również w hodowlach poddanych procedurze OGD. Eksperymenty przeprowadzono po 24 i 72 godzinach od OGD oraz w dopasowanych czasowo hodowlach kontrolnych. Poziomy ekspresji ocenianych genów prozapalnych (IL-1 β , TNF α , CD86) i przeciwzapalnych (IL-4, CD206, arginaza) obliczono względem genu referencyjnego dla β -aktyny, który amplifikowano z tego samego cDNA. Analiza uzyskanych wyników wykazała zwiększoną ekspresję mRNA wszystkich genów prozapalnych 24 h po procedurze OGD

w porównaniu do kontrolnych, nietraktowanych próbek. Suplementacja pożywki hodowlanej maślanem sodu po deficycie tlenowo-glukozowym znacząco obniżyła poziom mRNA IL-1 β , TNF α i CD86 w komórkach BV2 24 godziny po OGD, przy czym poziom mRNA IL-1 β i CD86 do poziomu obserwowanego w hodowlach kontrolnych (Ryc. 27A, B, C). Podobny wzór ekspresji markerów prozapalnych po procedurze OGD i zastosowaniu inhibitora zaobserwowano w drugim badanym punkcie czasowym. Poziom IL-1 β znacząco wzrósł 72 godziny po OGD, a zastosowanie maślanu sodu zmniejszyło tę ekspresję, jednak nie tak wyraźnie, jak we wcześniejszym punkcie czasowym (Ryc. 27A). Podobny efekt SB 72 h po OGD obserwowaliśmy także w przypadku CD86 (Ryc. 27C). Ekspresja TNF α w komórkach mikrogleju w tym punkcie czasowym nie zmieniła się znacząco w porównaniu do hodowli kontrolnej (niepoddanej procedurze OGD) (Ryc. 27B).

Niedobór tlenu i glukozy nie miał wpływu na ekspresję markerów przeciwzapalnych (IL-4, arginazy i CD206) w komórkach BV2 w pierwszym badanym punkcie czasowym (24 godziny) w porównaniu do hodowli kontrolnej. Przedłużenie hodowli komórek do 72 godzin po OGD spowodowało niewielkie, ale statystycznie istotne zmniejszenie ekspresji wszystkich badanych markerów przeciwzapalnych w komórkach BV2 poddanych OGD (Ryc. 27D, E, F). Podanie SB znacznie zwiększyło ekspresję analizowanych markerów przeciwzapalnych po OGD we wcześniejszym punkcie czasowym (24 godziny). Jednak po wydłużeniu okresu hodowli do 72 godzin, efekt ten był obserwowany jedynie dla IL-4 (Ryc. 27D, E, F).

Warto zauważyć, że obecność inhibitora HDAC w hodowli kontrolnej BV2 wpływa także na ekspresję markerów zarówno pro- jak i przeciwzapalnych. W komórkach kontrolnych BV2 traktowanych SB po 24 godzinach obserwowaliśmy istotny wzrost ekspresji TNF α , CD86, IL-4, CD206 i arginazy. Po wydłużeniu czasu hodowli kontrolnych do 72 h maślan sodu miał efekt odwrotny – obniżał ekspresję CD86 oraz wszystkich badanych markerów przeciwzapalnych. W tym punkcie czasowym jedynie poziom mRNA dla IL-1 β w grupie K+SB był znacząco wyższy w stosunku do hodowli kontrolnych nietraktowanych SB (Ryc. 27).

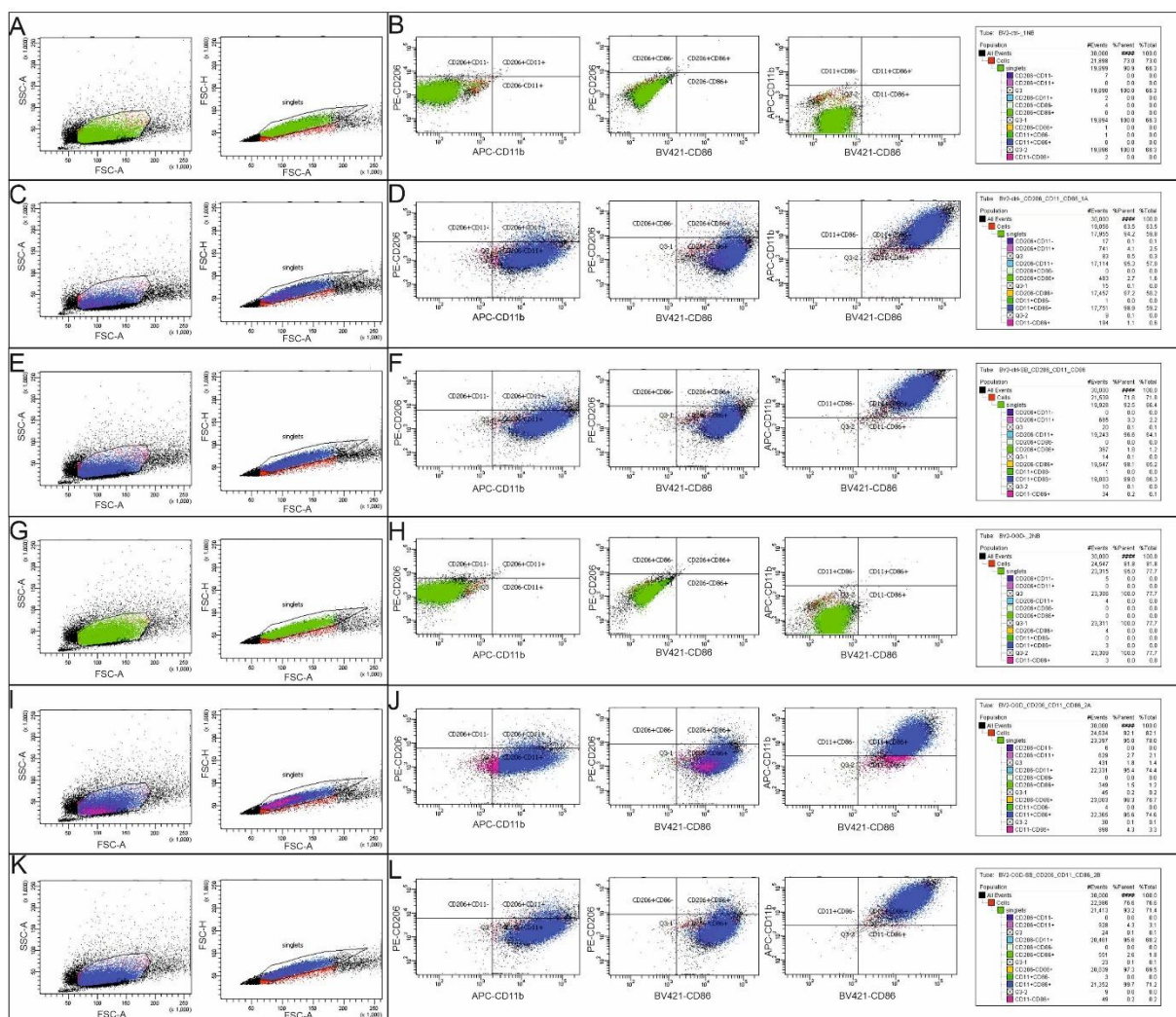


Rycina 27. Ekspresja mRNA genów białek charakterystycznych dla profilu pro- i przeciwzapalnego mikrogleju. Przeprowadzono analizę qPCR na materiale pochodzącym z hodowli mikrogleju linii BV2, na których przeprowadzono procedurę OGD i komórek kontrolnych, w obecności i nieobecności maślanu sodu. Materiał pobierano 24 h i 72 h po procedurze OGD. A – wyniki analizy dla IL-1 β , B – wyniki analizy dla TNF α , C – wyniki analizy dla CD86, D – wyniki analizy dla IL-4, E – wyniki analizy dla arginazy, F – wyniki analizy dla CD206. K – kontrola, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD), obliczone względem genu referencyjnego dla β -aktyny. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej n=3. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05.

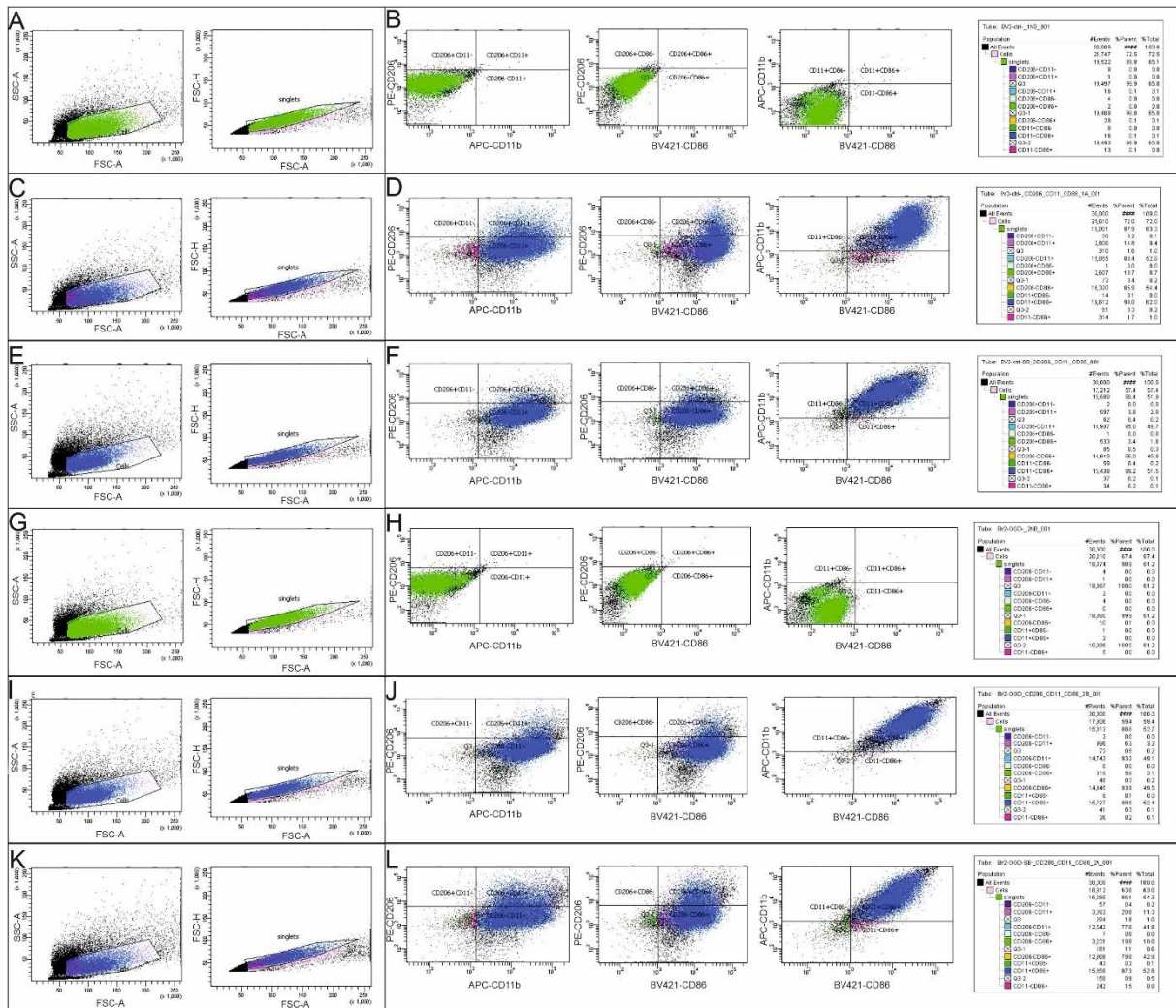
4.3.2. Wpływ maślanu sodu na polaryzację mikrogleju po procedurze OGD

W celu określenia działania maślanu sodu na polaryzację mikrogleju po procedurze OGD określono populacje fenotypów M1 i M2 mikrogleju metodą cytometrii przepływowej. Strategia bramkowania polegała na oddzieleniu komórek na podstawie rozpraszania światła na przednim detektorze optycznym (FSC) i bocznym (SSC), w celu usunięcia agregatów komórek i małych zanieczyszczeń. Parametr FSC wskazuje rozmiar komórki, a SSC wskazuje ziarnistość komórek. Populacja komórek była określana przez wykluczenie populacji

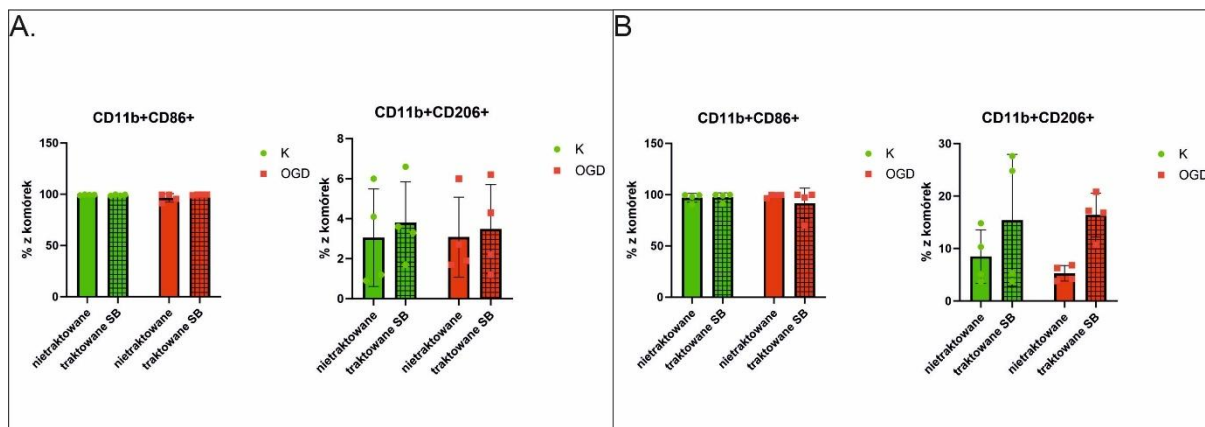
najbardziej wysuniętej na lewo (zanieczyszczenia i agregaty). Następnie skupiono się na bramkowaniu pojedynczych komórek na podstawie parametrów obszaru rozproszenia światła na przednim detektorze optycznym (FSC-A) i wysokości rozpraszania światła na przednim detektorze optycznym (FSC-H). Pojedyncze komórki określono jako najbardziej gęstą populację umieszczoną wzdłuż przekątnej wykresu obydwu parametrów (Ryc. 28A, C, E, G, I, K oraz Rycina 29A, C, E, G, I, K). Do poszczególnych subpopulacji komórki były kwalifikowane na podstawie względnej intensywności fluorescencji charakterystycznych markerów. Komórki mikrogleju były określane na podstawie ekspresji markera CD11b. Za komórki mikrogleju uznano populację CD11b⁺. Następnie fenotypy mikrogleju określano na podstawie intensywności fluorescencji przeciwciał skierowanych przeciwko markerowi CD86 lub markerowi CD206. Prozapalną populację mikrogleju M1 zdefiniowano jako CD11b⁺CD86⁺, a przeciwzapalną populację mikrogleju M2 jako CD11b⁺CD206⁺ (Ryc. 28B, D, F, H, J, L oraz Rycina 29B, D, F, H, J, L). Wykaz procentowego udziału poszczególnych populacji w analizowanych próbkach przedstawiono w Tabelach 16 i 17. Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że komórki kontrolne w obu analizowanych czasach wykazywały ekspresję markera CD86. Nie wykazano także różnic w wyrażaniu tego markera pomiędzy grupą, na której przeprowadzono OGD a grupą po OGD, która była traktowana SB (OGD vs. OGD+SB), w obu punktach czasowych (Ryc. 30A, B). Nie zauważono również różnic w udziale populacji określonej jako przeciwzapalna pomiędzy wszystkimi czterema badanymi grupami 24 godziny po OGD. 72 godziny po procedurze OGD odnotowano spadek populacji CD11b⁺CD206⁺ po OGD w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 30B). Podane maślanu sodu po OGD spowodowało wzrost udziału przeciwzapalnej populacji po 72 godzinach od deficytu tlenu i glukozy w analizowanych próbkach (OGD+SB) (Ryc. 30B). Po 72 godzinach zauważono również wzrost udziału populacji CD11b⁺CD206⁺ w grupie kontrolnej, która była traktowana SB w porównaniu do grupy kontrolnej, nie traktowanej inhibitorem. Jednakże żaden z opisanych wyników nie jest istotny statystycznie (Ryc. 30B). Warto zwrócić uwagę, że odnotowano znaczny odsetek komórek wyrażających oba markery (komórki CD86⁺CD206⁺), co może sugerować, że część mikrogleju jest w stanie "przejściowym" pomiędzy fenotypem pro- a przeciwzapalnym (Tabela 16 i 17). Specyficzność użytych przeciwciał sprawdzono poprzez dodanie do komórek kontrolnych odpowiednich kontroli izotypowych przeciwciał (Ryc. 31).



Rycina 28. Analiza subpopulacji komórek mikrogleju linii BV2 – 24 godziny po procedurze OGD. Przeprowadzono analizę metodą cytometrii przepływowej na materiale komórkowym w celu oceny liczebności populacji poszczególnych fenotypów mikrogleju po procedurze OGD i mikrogleju kontrolnym w obecności i bez maślanu sodu. Materiał zbierano 24 godziny po procedurze OGD. A, C, E, G, I, K – strategia bramkowania celem wyłonienia pojedynczych komórek, B, D, F, H, J, L – strategia bramkowania celem określenia poszczególnych populacji mikrogleju i wyniki tego bramkowania; A, B – mikroglej kontrolny niewyznakowany, C, D – mikroglej kontrolny wyznakowany, E, F – mikroglej kontrolny wyznakowany, traktowany maślanem sodu, G, H – mikroglej po OGD niewyznakowany, I, J – mikroglej po OGD wyznakowany, K, L – mikroglej po OGD wyznakowany, traktowany maślanem sodu. Komórki CD11b+CD86+ zdefiniowano jako fenotyp prozapalny (M1), a komórki CD11b+CD206+ jako przeciwzapalny (M2). Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej $n_1=4$. Liczba analizowanych zdarzeń w każdej grupie eksperymentalnej $n_2=30000$. Na panelu przedstawiono analizę dla jednego reprezentatywnego powtórzenia biologicznego.



Rycina 29. Analiza subpopulacji komórek mikrogleju linii BV2 – 72 godziny po procedurze OGD. Przeprowadzono analizę metodą cytometrii przepływowej na materiale komórkowym w celu oceny liczebności populacji poszczególnych fenotypów mikrogleju po procedurze OGD i mikrogleju kontrolnym w obecności i bez maślanu sodu. Materiał zbierano 72 godziny po procedurze OGD. A, C, E, G, I, K – strategia bramkowania celem wyłonienia pojedynczych żywych komórek, B, D, F, H, J, L – strategia bramkowania celem określenia poszczególnych populacji mikrogleju i wyniki tego bramkowania; A, B - mikroglej kontrolny niewyznakowany, C, D – mikroglej kontrolny wyznakowany, E, F – mikroglej kontrolny wyznakowany, traktowany maślanem sodu, G, H – mikroglej po OGD niewyznakowany, I, J – mikroglej po OGD wyznakowany, K, L – mikroglej po OGD wyznakowany, traktowany maślanem sodu. Komórki CD11b+CD86+ zdefiniowano jako fenotyp prozapalny, a komórki CD11b+CD206+ jako przeciwzapalny. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej $n_1=4$. Liczba analizowanych zdarzeń w każdej grupie eksperymentalnej $n_2=30000$. Na panelu przedstawiono analizę dla jednego reprezentatywnego powtórzenia biologicznego.



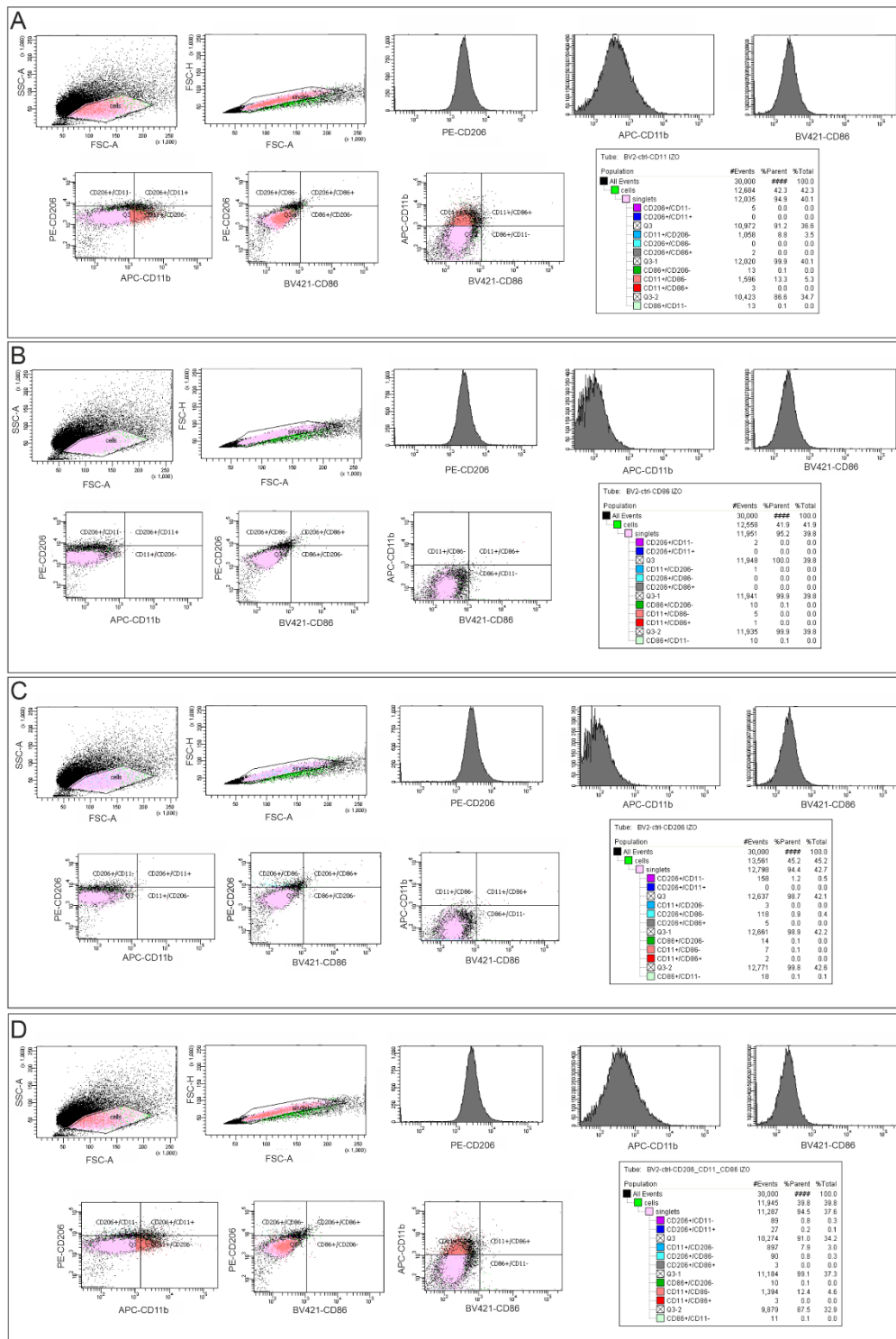
Rycina 30. Analiza subpopulacji komórek mikrogleju linii BV2. Wykresy przedstawiające obliczony odsetek komórek CD11b+CD86+, CD11b+CD206+ w populacji mikrogleju po procedurze OGD i mikrogleju kontrolnym, traktowanym i nie traktowanym maślanem sodu. Materiał zbierano 24 i 72 godziny po procedurze OGD. Komórki CD11b+CD86+ zdefiniowano jako fenotyp prozapalny, a komórki CD11b+CD206+ jako przeciwzapalny. A – wyniki analizy dla komórek zebranych 24 godziny po OGD, B – wyniki analizy dla komórek zebranych 72 godziny po OGD. K – komórki kontrolne, OGD – komórki po procedurze OGD. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej $n_1=4$. Liczba analizowanych zdarzeń w każdej grupie eksperymentalnej $n_2=30000$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego.

Tabela 16. Wykaz procentowego udziału poszczególnych populacji w analizowanych próbkach 24 godziny po OGD. Komórki CD11b+CD86+ zdefiniowano jako fenotyp prozapalny (kolor czerwony), komórki CD11b+CD206+ jako przeciwzapalny (kolor zielony), a komórki CD86+CD206+ jako mikroglej “przejściowy” (kolor żółty). K – komórki kontrolne, K+SB – komórki kontrolne traktowane maślanem sodu, OGD – komórki po procedurze OGD, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane maślanem sodu. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej $n_1=4$. Liczba analizowanych zdarzeń w każdej grupie eksperymentalnej $n_2=30000$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD).

	K	K+SB	OGD	OGD+SB
% pojedynczych komórek	82,875 \pm 21,591	81,2 \pm 22,190	84,7 \pm 18,131	82,3 \pm 20,446
% ze wszystkich zdarzeń	59,5 \pm 15,44	61,7 \pm 17,1401	67,65 \pm 14,884	63,48 \pm 16,026
	K	K+SB	OGD	OGD+SB
	% z pojedynczych komórek			
CD11b+CD86-	0,025 \pm 0,043	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
CD11b+CD206-	96,475 \pm 2,028	95,9 \pm 1,7161	95,275 \pm 1,366	96,225 \pm 1,814
CD11b+CD86+	99,4 \pm 0,324	99,2 \pm 0,561	96,45 \pm 3,545	99,525 \pm 0,303
CD11b+CD206+	3,05 \pm 2,112	3,8 \pm 1,771	3,075 \pm 1,7302	3,475 \pm 1,931
CD86+CD206+	2,4 \pm 1,987	2,775 \pm 1,871	2,45 \pm 1,847	2,725 \pm 1,865
CD86+CD206-	97,45 \pm 1,936	97,15 \pm 1,890	97,45 \pm 1,792	97,2 \pm 1,893
CD206+CD86-	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
CD11b-CD86+	0,525 \pm 0,349	0,5 \pm 0,520	3,45 \pm 3,545	0,375 \pm 0,303
CD11b-CD206+	0,025 \pm 0,043	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

Tabela 17. Wykaz procentowego udziału poszczególnych populacji w analizowanych próbkach 72 godziny po OGD. Komórki CD11b+CD86+ zdefiniowano jako fenotyp prozapalny (kolor czerwony), komórki CD11b+CD206+ jako przeciwzapalny (kolor zielony), a komórki CD86+CD206+ jako mikroglej “przejściowy” (kolor żółty). K – komórki kontrolne, K+SB – komórki kontrolne traktowane maślanem sodu, OGD – komórki po procedurze OGD, OGD+SB – komórki po procedurze OGD traktowane maślanem sodu. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej $n_1=4$. Liczba analizowanych zdarzeń w każdej grupie eksperymentalnej $n_2=30000$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD).

	K	K+SB	OGD	OGD+SB
% pojedynczych komórek	92,0 \pm 4,003	91,88 \pm 0,020	92,875 \pm 3,642	91,375 \pm 4,080
% ze wszystkich zdarzeń	74,1 \pm 9,881	59,025 \pm 24,533	69,45 \pm 16,31	70,55 \pm 27,12
	K	K+SB	OGD	OGD+SB
	% z pojedynczych komórek			
CD11b+CD86-	0,1 \pm 0,071	0,125 \pm 0,164	0,075 \pm 0,083	0,075 \pm 0,130
CD11b+CD206-	88,95 \pm 6,500	82,75 \pm 9,500	93,875 \pm 2,249	76,25 \pm 12,691
CD11b+CD86+	96,95 \pm 3,725	97,55 \pm 3,677	98,9 \pm 1,332	91,7 \pm 12,746
CD11b+CD206+	8,475 \pm 4,402	15,375 \pm 10,883	5,275 \pm 1,295	16,375 \pm 3,628
CD86+CD206+	7,9 \pm 4,294	14,075 \pm 9,944	4,775 \pm 1,295	16,725 \pm 5,007
CD86+CD206-	91,625 \pm 4,492	85,55 \pm 9,622	94,9 \pm 1,608	82,675 \pm 5,55
CD206+CD86-	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
CD11b-CD86+	2,6 \pm 3,348	2,1 \pm 3,407	0,75 \pm 0,955	7,625 \pm 12,356
CD11b-CD206+	0,3 \pm 0,354	0,125 \pm 0,164	0,025 \pm 0,043	1,825 \pm 2,935

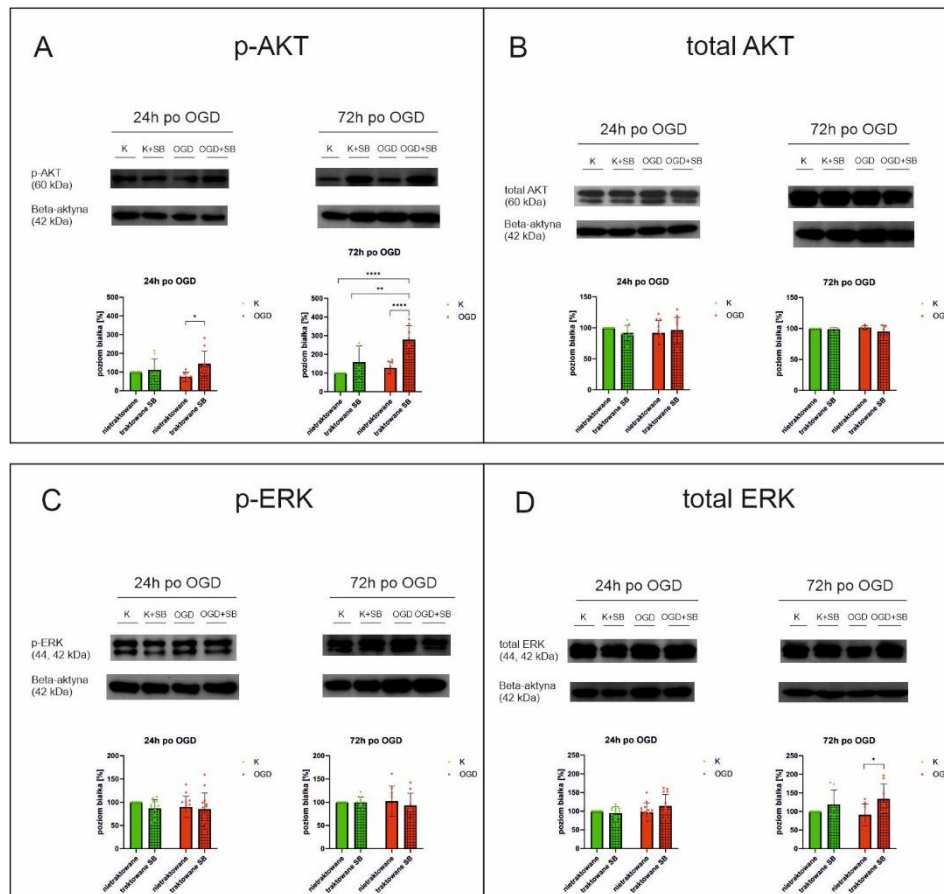


Rycina 31. Wykresy analizy przeprowadzone z użyciem kontroli izotypowych. Przeprowadzono analizę metodą cytometrii przepływowej na materiale komórkowym w celu sprawdzenia specyficzności używanych przeciwciał. Do analizy wykorzystano materiał kontrolny zbierany po 24 godzinach od momentu wysiania. A – kontrola dla przeciwciała sprzężonego z APC, B – kontrola dla przeciwciała sprzężonego z BV421, C – kontrola dla przeciwciała sprzężonego z PE, D – kontrola dla wszystkich przeciwciał łącznie. Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej $n_1=4$. Liczba analizowanych zdarzeń w każdej grupie eksperymentalnej $n_2=30000$. Na panelu przedstawiono analizę dla jednego reprezentatywnego powtórzenia biologicznego.

4.3.3. Wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe po procedurze OGD – analizy Western Blot

W kolejnym etapie skupiono się na określeniu wpływu maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe zaangażowane w aktywację mikrogleju. W tym celu wykonano analizę metodą Western Blot na lizatach komórkowych z hodowli mikrogleju BV2 poddanych procedurze OGD, w obecności SB i przy braku inhibitora oraz na hodowlach kontrolnych. Materiał zbierano 24 i 72 godziny od procedury OGD. Odnotowano niewielki spadek poziomu ufosforylowanej formy AKT (p-AKT) 24 godziny po procedurze OGD w porównaniu do hodowli kontrolnej, choć wynik ten nie był istotny statycznie. Podanie maślanu sodu po OGD spowodowało wzrost tej formy białka (OGD+SB vs. OGD) (Ryc. 32A). Po wydłużeniu czasu prowadzenia hodowli do 72 godzin zauważono, że zastosowanie SB po OGD także zwiększało poziom p-AKT w porównaniu do grupy po OGD nietraktowanej SB (OGD+SB vs. OGD) oraz w stosunku do hodowli kontrolnych (OGD+SB vs. K; OGD+SB vs. K+SB) (Ryc. 32A). Analiza całkowitego poziomu białka AKT (total AKT) nie wykazała żadnych istotnych zmian pomiędzy wszystkimi czterema badanymi grupami w obu analizowanych punktach czasowych (Ryc. 32B).

W przypadku kinazy ERK, nie zauważono żadnych istotnych statystycznie zmian zarówno w poziomie ufosforylowanej formy białka, jak i całkowitym poziomie ERK, pomiędzy badanymi grupami po 24 godzinach od przeprowadzenia procedury OGD (Ryc. 32C i 32D). Po 72 godzinach od deficytu tlenowo-glukozowego odnotowano wzrost całkowitego poziomu białka ERK po zastosowaniu SB (OGD+SB vs. OGD) (Ryc. 32D). Poziom p-ERK w tym punkcie czasowym nie ulegał żadnym istotnym zmianom pomiędzy grupami (Ryc. 32C).



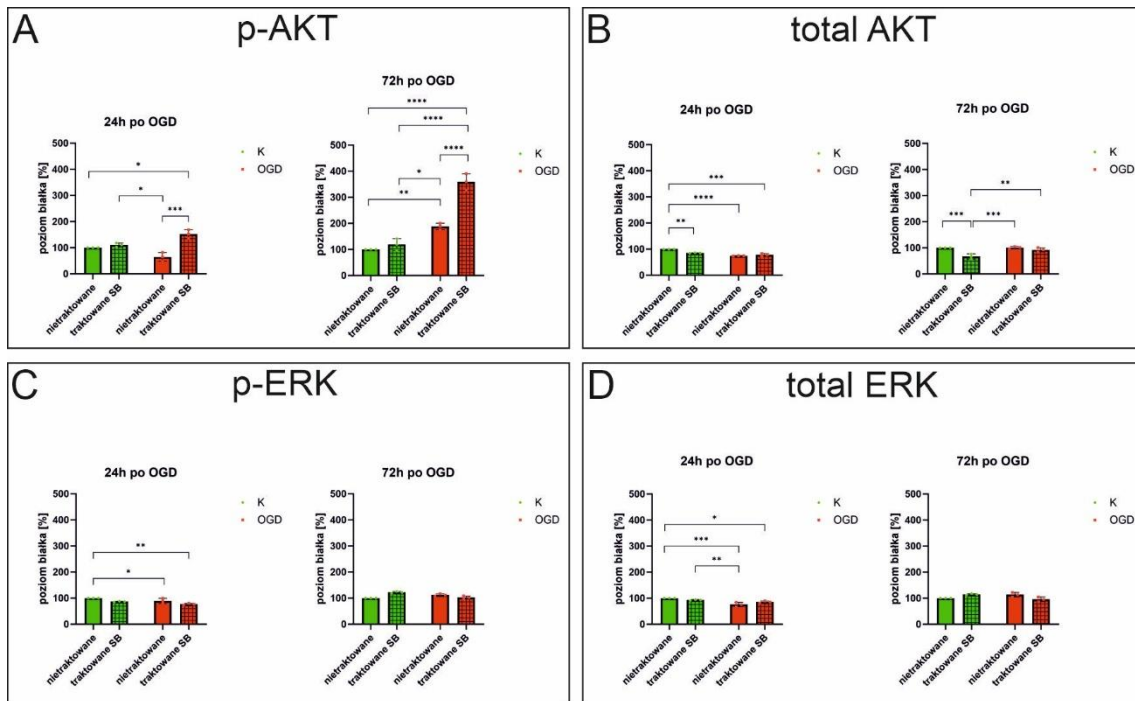
Rycina 32. Wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe po procedurze OGD – analiza Western Blot.

Przeprowadzono analizę Western Blot na materiale pochodzącym z hodowli komórek mikrogleju linii BV2, na których przeprowadzono procedurę OGD i komórek kontrolnych, w obecności i nieobecności maślanu sodu. Materiał uzyskano 24 h i 72 h po procedurze OGD. A – wyniki analizy dla p-AKT, B – wyniki analizy dla całkowitego poziomu AKT (total AKT), C – wyniki analizy dla p-ERK, D – wyniki analizy dla całkowitego poziomu ERK (total ERK). K – kontrola, K+SB – kontrola traktowana maślanem sodu, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy, OGD+SB – komórki poddane procedurze OGD traktowane maślanem sodu. Wyniki uzyskano za pomocą analizy densytometrycznej poziomów szarości prążków uzyskanych po rozdziale elektroforetycznym, wyrażonych jako procent stosunku gęstości optycznej (OD) prążków K+SB, OGD i OGD+SB w odniesieniu do K. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD). Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej n=3. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroni: ****p < 0,001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05.

4.3.4. Wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe po procedurze OGD – testy ELISA

W celu weryfikacji wyników określających wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe zaangażowane w aktywację mikrogleju, uzyskanych za pomocą analizy Western Blot, przeprowadzono dedykowane testy immunoenzymatyczne ELISA na lizatach komórkowych z hodowli mikrogleju BV2 poddanych procedurze OGD, w obecności SB i przy braku inhibitora oraz na hodowlach kontrolnych. Materiał zbierano 24 i 72 godziny od procedury OGD. Podobnie jak w przypadku analizy Western Blot, odnotowano niewielki spadek ufosforylowanej formy AKT (p-AKT) 24 godziny od procedury OGD w porównaniu do komórek kontrolnych, natomiast zastosowanie maślanu sodu po OGD spowodowało wzrost fosforylacji tego białka (Ryc. 33A). Również całkowity poziom białka AKT (total AKT) po procedurze OGD uległ niewielkiemu obniżeniu w porównaniu do hodowli kontrolnych, natomiast zastosowanie SB nie spowodowało żadnych istotnych statystycznie różnic w całkowitym poziomie tego białka, w porównaniu do komórek po procedurze OGD bez podawania inhibitora (OGD+SB vs. OGD) (Ryc. 33B). Przy wydłużeniu czasu prowadzenia hodowli komórek do 72 godzin, odnotowano wzrost poziomu p-AKT po OGD, a podanie maślanu sodu, podobnie jak w przypadku testów Western Blot, dodatkowo zwiększyło stopień fosforylacji tej kinazy (Ryc. 33A). W tym punkcie czasowym nie odnotowano istotnego wpływu maślanu sodu po OGD (OGD+SB vs. OGD) na całkowity poziom białka AKT (total AKT) (Ryc. 33B).

Po 24 godzinach od przeprowadzenia procedury OGD odnotowano niewielki spadek poziomu ufosforylowanej formy kinazy ERK (p-ERK) zarówno w hodowlach bez obecności SB (OGD) jak również w komórkach traktowanych tym inhibitorem (OGD+SB) w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 33C). Podobne wyniki otrzymaliśmy w przypadku pomiaru całkowitego poziomu ERK w tym punkcie czasowym. Obserwowaliśmy spadek całkowitego poziomu ERK w komórkach BV2 w grupach OGD i OGD+SB w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 33D). Nie odnotowano żadnych różnic w poziomie białka p-ERK i w całkowitym poziomie kinazy ERK w hodowlach poddanych procedurze OGD i traktowanych SB po wydłużeniu czasu hodowli do 72 godzin (Ryc. 33C i D).



Rycina 33. Wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe po procedurze OGD – testy ELISA.

Przeprowadzono analizę dedykowanymi testami immunoenzymatycznymi ELISA na materiale pochodzącym z hodowli komórek mikrogleju linii BV2, na których przeprowadzono procedurę OGD i komórkach kontrolnych, w obecności i nieobecności maślanu sodu. Materiał uzyskano 24 h i 72 h po procedurze OGD. A – wyniki analizy dla p-AKT, B – wyniki analizy dla całkowitego poziomu AKT (total AKT), C – wyniki analizy dla p-ERK, D – wyniki analizy dla całkowitego poziomu ERK (total ERK). K – kontrola, OGD – deficyt tlenowo-glukozowy. Wyniki stężeń białek wyrażono jako procent stężeń K+SB, OGD i OGD+SB w odniesieniu do K. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Liczba powtórzeń biologicznych w każdej grupie eksperymentalnej n=3. Analiza statystyczna: dwukierunkowa ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: ****p < 0,001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05.

5. Dyskusja

Reakcja zapalna jest jednym z kluczowych mechanizmów uszkodzenia neuronalnego po okołoporodowym niedokrwieniu-niedotlenieniu mózgu. Za indukcję odpowiedzi zapalnej odpowiadają obecne w mózgu aktywowane komórki mikrogleju oraz migrujące obwodowe makrofagi, które uwalniają szereg czynników prozapalnych (cytokiny, chemokiny, reaktywne formy tlenu i azotu) oraz fagocytują uszkodzone i nieuszkodzone neurony [45], [79], [80]. Niedawne badania wskazują na niezwykle istotną rolę układu dopełniacza jako mediatora odpowiedzi zapalnej prowadzącej do poischemicznego uszkodzenia tkanki nerwowej [81].

5.1. Wpływ maślanu sodu na aktywację układu dopełniacza w szczurzym modelu neonatalnej hipoksji-ischemii

Prowadzone przez nas badania wykazały, że białka dopełniacza (C3 i C5) kolokalizowały się z białkiem PSD-95 w korze mózgu, hipokampie i prążkowie po epizodzie niedotlenieniowo-niedokrwinnym. Wyniki te wskazują, że układ dopełniacza może być zaangażowany w poniedokrwinną degradację połączeń synaptycznych u niedojrzałych zwierząt.

Ponadto wykazaliśmy, że hipoksja-ischemia wywołana u szczurzych osesków indukowała ekspresję mRNA dla C1q, C3, C5 i C9 w ipsilateralnej (uszkodzonej) półkuli mózgu, chociaż wzór aktywacji poszczególnych białek dopełniacza różnił się. Ekspresja mRNA dla C1q i C3 silnie wzrastała 24 godziny po HI, a po tym czasie spadła do wartości obserwowanej u zwierząt kontrolnych. Wzrost ekspresji mRNA dla C5 i C9 po niedokrwieniu był znacznie słabszy i miał miejsce w późniejszych punktach czasowych po HI. Podawanie zwierzętom po HI maślanu sodu, w większości analizowanych przypadków, obniżało poziom ekspresji mRNA badanych białek układu dopełniacza, choć w jednym z badanych punktów czasowych (5 dni po HI) obserwowaliśmy przejściowy wzrost ekspresji C1q, C3 i C9 w grupie HI+SB. Niedotlenienie-niedokrwienie osesków szczura indukowało także ekspresję mRNA receptorów C3aR i C5aR. W zależności od czasu po indukcji niedotlenienia-niedokrwienia, efekt maślanu sodu był różny. W pierwszej fazie po uszkodzeniu (24 i 72 godziny) odnotowaliśmy wzrost ekspresji mRNA dla C3aR i C5aR po podaniu SB, a w późnej fazie uszkodzenia (5 i 14 dni po HI) obserwowaliśmy obniżenie poziomu mRNA obu receptorów.

Przeprowadzone analizy poziomów białek układu dopełniacza nie do końca korelują z wynikami uzyskanymi dla mRNA. Istotny statystycznie wzrost poziomu białka C3 w półkulach mózgow zwierząt wykazaliśmy wyłącznie w 5-tym dniu po uszkodzeniu

hipoksyjno-ischemicznym. Podanie maślanu sodu spowodowało obniżenie poziomu C3 w tym punkcie czasowym. Zwiększenie poziomu białka C5 w półkulach mózgow zwierząt po HI występowało wcześniej – już po 24 godzinach. Podanie maślanu sodu jedynie po 24 godzinach od HI spowodowało obniżenie poziomu C5, natomiast w późniejszych punktach czasowych (72 godziny oraz 5 dni), maślan sodu powodował wzrost poziomu tego białka.

Poniedokrwiennie zwiększenie ekspresji C1q i C3 zostało również zaobserwowane przez innych badaczy w modelach przejściowego MCAO u dorosłych zwierząt [90], [197], [198], oraz po eksperymentalnej okołoporodowej hipoksji-ischemii [104], [108], [109], [112], [199], [200]. Dane z badań przeprowadzonych *post mortem* na pacjentach, którzy zmarli w wyniku udaru mózgu, wykazały wyraźne odkładanie się komponentów dopełniacza C1q, C3c, C4d i C9 w mózgu dotkniętym niedokrwieniem [201]. Poziomy białek dopełniacza – C5a i C3a w surowicy pacjentów po udarze, były skorelowane ze stopniem ciężkości uszkodzenia mózgu [201], [202]. Dodatkowo, kilka dostępnych badań klinicznych przeprowadzonych na noworodkach dotkniętych HIE wskazało również na aktywację układu dopełniacza w ich mózgach i/lub płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) [105], [106]. Wyniki powyższych badań jednoznacznie wskazują, że układ dopełniacza odgrywa istotną rolę w patogenezie poischemicznego uszkodzenia mózgu. Aktywacja dopełniacza po niedokrwieniu odbywa się głównie za pośrednictwem przeciwciał (IgM), które wiążą się z antygenami wyrażanymi na powierzchni komórek śródbłonna narażonych na stres hipoksyjny [203]. Białka dopełniacza przechodzą przez uszkodzoną barierę krew-mózg do tkanki mózgu, chociaż mogą być także lokalnie produkowane w OUN, głównie przez komórki głojowe i razem z innymi czynnikami prozapalnymi przyczyniają się do wtórnego uszkodzenia po niedokrwieniu. Ponadto, aktywacja dopełniacza po niedokrwieniu promuje stres neuronalny, oznaczając żywe neurony do fagocytowania przez mikroglej i zmniejsza prawdopodobieństwo ich regeneracji, co przyczynia się do utraty połączeń synaptycznych [101]. Niedawne badania wskazują, że zahamowanie stanu zapalnego może wspomagać neuroprotekcję i ma potencjał do zastosowania w leczeniu klinicznym uszkodzeń mózgu spowodowanych niedokrwieniem-niedotlenieniem u noworodków [181], [182]. Jednakże, strategia terapeutyczna oparta na bezpośrednim hamowaniu aktywności dopełniacza w rozwijającym się mózgu może nie być skuteczna, ponieważ dopełniacz bierze udział nie tylko w procesach zapalnych, ale także w rozwoju mózgu i regeneracji tkanek. Być może dlatego wyniki badań dotyczących hamowania układu dopełniacza po okołoporodowym niedokrwieniu-niedotlenieniu są niejednoznaczne. Wyniki naszych eksperymentów wykazały, że hipoksja-ischemia silnie

zwiększyła poziom mRNA C1q i C3 w mózgach zwierząt, a podanie SB zmniejszyło ich ekspresję, co skutkowało neuroprotekcją. Nasze wyniki zgadzają się z badaniem przeprowadzonym przez Ten i wsp. (2005), które wykazało, że hamowanie klasycznej ścieżki aktywacji zależnej od C1q po HI miało efekt neuroprotektoryjny [108]. Warto zauważyć, że u osesków gryzoni, w przeciwieństwie do dorosłych zwierząt, aktywacja układu dopełniacza na drodze lektynowej i alternatywnej nie jest w pełni rozwinięta, dlatego dopełniacz jest w tym przypadku aktywowany głównie ścieżką klasyczną. Cytowane powyżej badanie ujawniło, że zablokowanie genu C1q u myszy zmniejszyło uszkodzenie mózgu wywołane okołoporodowym niedokrwieniem-niedotlenieniem i poprawiało zdolności poznawcze w porównaniu do myszy typu dzikiego (WT+HIE). Efekt neuroprotektoryjny usunięcia C1q był skorelowany ze zmniejszeniem liczby krążących neutrofilów, które były silnie aktywowane po HI u myszy WT [108]. Ponadto to samo badanie wykazało obniżenie poziomu białka C3 w niedokrwionych mózgach myszy C1q(-/-) w porównaniu z myszami WT, co może sugerować, że aktywacja C3 odgrywa istotną rolę w uszkodzeniu mózgu po okołoporodowym niedokrwieniu-niedotlenieniu. Korzystny efekt hamowania klasycznej ścieżki dopełniacza po neonatalnej HI był także podkreślany przez Shah i wsp. (2021) [203]. Autorzy pokazali, że efekt terapeutyczny leczenia hipotermią był skorelowany z obniżeniem ekspresji C1q i C3 w mózgach szczurów po HI, mniejszym odkładaniem się C3 i C9 na komórkach mikrogleju i neuronach oraz zmniejszonym wiązaniem C1q do powierzchni komórek apoptotycznych [203].

W literaturze naukowej istnieją doniesienia sugerujące, że receptor dla cząsteczki dopełniacza C3a (C3aR) może być obiecującym celem terapeutycznym po niedokrwieniu mózgu. Zwiększoną ekspresję C3aR w tkance mózgowej zaobserwowano w różnych mysich modelach przejściowego i trwałego MCAO [204], [205], [206]. Podanie antagonisty C3aR skutkowało zmniejszeniem rozmiaru uszkodzenia po udarze przez zahamowanie rekrutacji neutrofilów do niedokrwionej tkanki [207]. Z drugiej strony, wyniki przedstawione przez innych badaczy wykazały, że sygnalizacja przez C3aR ma efekt neuroprotektoryjny po niedotlenieniu/niedokrwieniu osesków myszy. Podanie donosowe C3a po hipoksji-ischemii zmniejszyło neurodegenerację i reaktywną glejozę w hipokampie oraz poprawiło funkcje poznawcze u myszy po HI [109], [110], [111]. Inne badanie pokazało, że niedobór receptora C3a u zwierząt C3aR(-/-) zmniejszał wzrost aksonów i plastyczność w korze mózgu w okolicach uszkodzenia (w tzw. penumbrze). Podanie donosowe C3a myszom typu dzikiego zdecydowanie zwiększyło gęstość synaps i niwelowało upośledzenie funkcjonalne po udarze. Dodatkowo, w nieuszkodzonej udarem półkuli mózgu, niedobór C3aR u myszy knock-out

wiazał się z obniżoną ekspresją synapsyny I, elementu strukturalnego presynaptycznych zakończeń i markera plastyczności synaptycznej, oraz VGLUT1, markera presynaptycznego większości synaps glutaminergicznych [208]. Inne badanie wykazało, że hipotermia terapeutyczna zwiększała poziom C3a i jego receptora – C3aR w mózgach szczurzych osesków po HI, co przyczyniało się do zmniejszenia stanu zapalnego i uszkodzeń tkanek, co sugeruje, że sygnalizacja C3a/C3aR może być jednym z mechanizmów neuroprotektoryjnego działania hipotermii [112]. Przedstawione powyżej wyniki wskazują, że zaburzenie sygnalizacji C3a/C3aR prowadzi do pogłębienia uszkodzenia po udarze. Ponadto podkreślają, że białka C3a i C3aR odgrywają ważną rolę w regeneracji tkanek po niedokrwieniu. W naszym badaniu przeanalizowaliśmy wpływ hipoksji-ischemii i podawania SB na receptor dopełniacza C3aR w mózgach noworodków szczurów. Wyniki tego eksperymentu wykazały zwiększoną ekspresję C3aR w prawie wszystkich badanych punktach czasowych po HI, jednak głównie bez statystycznej istotności. Efekt podania maślanu sodu był różny w zależności od długości czasu po wywołaniu uszkodzenia niedotlenieniowo-niedokrwiennego. Wyniki z wczesnych punktów czasowych po HI (24 h i 72 h) wykazały, że podanie maślanu sodu nieznacznie zwiększyło ekspresję C3aR, podczas gdy w późniejszych punktach czasowych (5 i 14 dni po HI) SB zmniejszał ekspresję mRNA tego receptora w ipsilateralnej półkuli w porównaniu do zwierząt po HI, które nie były traktowane inhibitorem. Taka dwufazowa odpowiedź na podanie maślanu sodu po neonatalnej hipoksji-ischemii sugeruje, że w fazie ostrej, zwiększona ekspresja C3aR po podaniu SB może mieć efekt neuroprotektoryjny, podczas gdy w późniejszej fazie po HI, zmniejszona ekspresja tego receptora może sprzyjać procesom neuroregeneracyjnym.

Kolejnym krokiem w aktywacji klasycznej drogi dopełniacza przez C1q jest cięcie C5, które generuje rozpuszczalny C5a oraz związany z błoną C5b. Prozapalny C5a, działający poprzez C5aR, przyczynia się do rekrutacji i aktywacji leukocytów oraz przyspiesza uszkodzenie mózgu po niedokrwieniu. Białko C5b razem z C9 inicjuje tworzenie kompleksu atakującego błonę (C5b-9, MAC), który może powodować bezpośrednią lizę komórek, ale może także stymulować komórki do uwalniania czynników zapalnych [81]. Wyniki naszego badania wykazały, że okołoporodowe uszkodzenie niedotlenieniowo-niedokrwienie zwiększało ekspresję mRNA białka C5 5 i 14 dni po HI w ipsilateralnej półkuli, a zastosowanie SB u zwierząt hipoksyjno-ischemicznych zapobiegało wzrostowi ekspresji C5. Maślan sodu powodował spadek poziomu białka C5 jedynie po 24 godzinach po HI. Dodatkowo, zaobserwowaliśmy zwiększoną ekspresję C5aR w każdym badanym punkcie czasowym po HI,

jednak bez statystycznej istotności. Efekt działania maślanu sodu miał charakter dwufazowy, 72 godziny po HI zaobserwowaliśmy zwiększoną ekspresję mRNA C5aR, a w późniejszej fazie po uszkodzeniu, podanie SB obniżało poziom tego receptora w ipsilateralnych półkulach (choć również były to wyniki nieistotne statystycznie). Funkcjonalna rola C5 w hipoksyjno-ischemicznym uszkodzeniu mózgu jest niejasna i zależy w dużej mierze od czasu i nasilenia urazu [82]. Mocco i wsp. (2006) raportowali, że w grupie myszy pozbawionych genu C5 nie obserwowano neuroprotekcji 24 godziny po ogniskowym niedokrwieniu mózgu [198]. Wyniki testów behawioralnych oraz stopień uszkodzenia mózgu u myszy C5(-/-) nie różniły się od myszy typu dzikiego, u których wywołano niedokrwienie. Z kolei eksperyment przeprowadzony przez Arumugam i wsp. (2007) wykazał, że 72 godziny po indukcji udaru MCAO, myszy C5(-/-) miały lepsze wyniki funkcjonalne i mniejszy rozmiar uszkodzenia mózgu w porównaniu do myszy WT [209]. Ponadto, zahamowanie powstawania kompleksu C5a-C5aR przy użyciu przeciwciała anti-C5 zmniejszyło uszkodzenie mózgu i poprawiło funkcje motoryczne w szczurzym modelu udaru [210], a zastosowanie antagonisty receptora C5a – PMX53 istotnie zmniejszyło apoptozę pierwotnych neuronów korowych poddanych deprivacji tlenu i glukozy [211]. Podwyższenie poziomu C5a i C5aR po neonatalnej hipoksyjno-ischemii zostało również zaobserwowane przez Shah i wsp. (2017), a leczenie hipotermią terapeutyczną zmniejszyło poziom obu białek, co prowadziło do neuroprotekcji [112]. Jak wspomniano wcześniej, aktywacja osi C5a-C5aR po niedokrwieniu nasila uszkodzenie mózgu przez zwiększenie uwalniania prozapalnych cytokin i chemokin z aktywowanych komórek mikrogleju i astrocytów, co indukuje chemotaksję i aktywację granulocytów oraz leukocytów, prowadząc do nasilenia procesu zapalnego [212]. Przedstawione powyżej badania w większości wykazały, że zahamowanie sygnalizacji C5a-C5aR w ostrej fazie uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu ma efekt neuroprotekcyny. Jednak brak sygnalizacji C5aR w późniejszym okresie może być szkodliwy dla procesu regeneracji. Badania przedstawione przez Brennan i wsp. (2015) wykazały, że długotrwałe przerwanie sygnalizacji C5aR po urazie rdzenia kręgowego prowadzi do zaburzenia formowania blizny gлевой, tworzącej barierę ochronną wokół uszkodzonej tkanki, co skutkowało większym rozmiarem uszkodzeń [213]. Zastosowanie maślanu sodu po HI w naszych eksperymentach spowodowało umiarkowany i statystycznie nieistotny spadek ekspresji C5aR w późniejszej fazie uszkodzenia niedotlenieniowo-niedokrwiennego, co sugeruje, że zmniejszenie poziomu tego receptora 5-14 dni po HI może mieć pozytywny efekt, co jest obserwacją niezgodną z wnioskami przedstawionymi przez grupę Brennana. Ta rozbieżność może wynikać z użycia różnych modeli zwierzęcych i różnych metod modulowania/zahamowania sygnalizacji C5aR.

Ostatnim składnikiem generowanym przez aktywację klasycznej drogi dopełniacza, który został przez nas zbadany, było białko C9. Analiza mRNA tego białka wykazała znaczący wzrost ekspresji w ipsilateralnej półkuli, ale tylko 72 godziny po indukcji hipoksji-ischemii. Zastosowanie SB zmniejszyło poziom mRNA białka C9 we wczesnej fazie po HI, jednak 5 dni po HI zaobserwowaliśmy wzrost jego ekspresji. Efekt działania SB na ekspresję C9 był podobny do efektu obserwowanego w przypadku C1q i C3. Składnik dopełniacza C9 jest głównym białkiem cytolitycznym, które współtworzy kompleks atakujący błonę MAC i prowadzi do zniszczenia docelowych komórek. Badania przeprowadzone przez Schultza i wsp. (2005) na mózгах pobranych pośmiertnie od noworodków, które cierpiały na encefalopatię niedotlenieniowo-niedokrwienną, wykazały, że komponent C9 obecny był na neuronach (głównie w hipokampie), które wykazywały morfologiczne cechy apoptozy (np. fragmentację jądra) [105]. Obecność białka C9 na neuronach apoptotycznych wskazuje, że są one oznaczane do usunięcia np. przez mikroglej. U szczurzych osesków poddanych eksperymentalnej hipoksji-ischemii, systemowe zahamowanie układu dopełniacza za pomocą czynnika jadu kobry zmniejszyło osadzanie się białka C9 na neuronach oraz zmniejszyło niedokrwiennie uszkodzenie mózgu [104]. W innych badaniach, podanie białka C9 szczurzym oseskom zwiększyło uszkodzenie mózgu wywołane hipoksją-ischemią [113]. Wyniki te jednoznacznie sugerują, że obniżenie poziomu białka C9 może mieć efekt korzystny po niedokrwieniu/niedotlenieniu mózgu. Zastosowanie SB w naszych eksperymentach zdaje się potwierdzać tę hipotezę, gdyż we wczesnych punktach czasowych po HI inhibitor ten obniżał ekspresję C9 w półkulach ipsilateralnych, co może korelować ze zmniejszeniem uszkodzenia tkanki opisywanym w naszych wcześniejszych badaniach [165], [173], [174], a także z wynikami prezentowanej rozprawy doktorskiej.

5.2. Wpływ maślanu sodu na utratę synaps w szczurzym modelu neonatalnej hipoksji-ischemii

Eksperymenty przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że zastosowanie SB przywróciło do wartości kontrolnych obniżony po hipoksji-ischemii poziom białek związanych z synapsami w ipsilateralnych półkulach. Synapsyna I i synaptofizyna to markery presynaptyczne. Białka te są zlokalizowane w błonach pęcherzyków synaptycznych i odgrywają kluczową rolę w rozwoju neuronów oraz uwalnianiu neuroprzekaźników [214], [215]. PSD-95 (białko gęstości postsynaptycznej 95) jest najważniejszym białkiem postsynaptycznym, które wpływa na stabilność i funkcjonowanie synaps. PSD-95 jest białkiem strukturalnym, które łączy inne białka, w tym receptory NMDA i kanały jonowe, w stabilną

strukturę w synapsie. Ponadto odgrywa ono kluczową rolę w procesach uczenia się poprzez regulację plastyczności synaptycznej [216], [217]. Ponieważ badane przez nas białka synaptyczne wpływają na formowanie i rekonstruowanie synaps, ich zwiększona ekspresja po podaniu SB zwierzętom po urazie niedotlenieniowo-niedokrwiennym może wskazywać na wzrost liczby połączeń synaptycznych i potwierdzać neuroprotektoryjny efekt SB. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw przebudowy synaptycznej po niedokrwieniu nie są w pełni zrozumiane, ale dostępne dane sugerują, że istotną rolę mogą odgrywać procesy zapalne.

Nasze badanie wykazało ponadto, że podawanie inhibitora deacetylaz histonów – maślanu sodu oseskom szczura po neonatalnej hipoksji-ischemii, zapewnia neuroprotekcję. Uszkodzenie tkanki nerwowej po niedokrwieniu, ze szczególnym uwzględnieniem degradacji synaps w ipsilateralnej półkuli, zostało zmniejszone po zastosowaniu SB i było skorelowane z modulacją odpowiedzi zapalnej i aktywności układu dopełniacza. Analiza ultrastrukturalna tkanki wykazała rozmyte struktury synaptyczne, cechy morfologiczne obrzęku zakończeń synaptycznych oraz umierające neurony w korze mózgowej i hipokampie po uszkodzeniu niedotlenieniowo-niedokrwiennym. Podawanie maślanu sodu zwierzętom po HI zwiększyło poziom białek synaptycznych, poprawiło ultrastrukturę tkanek i zmniejszyło degradację synaps. Nasze wyniki w ogólnym zarysie zgadzają się z wcześniejszymi doniesieniami, wskazującymi, że inhibitory deacetylaz histonów (VPA, TSA, SB) mają działanie neuroprotektoryjne w modelach uszkodzeń mózgu u dorosłych gryzoni [139], [159], [161]. Dane te potwierdzają również neuroprotektoryjny efekt maślanu sodu po neonatalnej hipoksji-ischemii u szczurów, opisany w naszych wcześniejszych publikacjach [165], [173], [174]. Zaobserwowaliśmy atrofię oraz około 50% deficyt wagi półkul ipsilateralnych w porównaniu do półkul kontralateralnych (nieuszkodzonych) 14 dni po eksperymentalnym HI. Podawanie maślanu sodu przez 5 dni po indukcji uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego zmniejszyło uszkodzenie mózgu, zapobiegając atrofii, choć nadal widoczna była niewielka asymetria [173]. Ponadto stosowanie SB chroniło przed utratą neuroblastów i prekursorów oligodendrocytów w dwóch obszarach neurogenicznym – strefie podziarnistej (SGZ) zębatych zakrętów hipokampa (DG) oraz strefie podkomorowej bocznych komór mózgu (SVZ) [173], [174].

5.3. Wpływ maślanu sodu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze po neonatalnej hipoksji-ischemii

Połączenia synaptyczne są niezbędne do transmisji sygnałów między neuronami i tworzą skomplikowaną sieć w mózgu [218]. Z uwagi na ich kluczową rolę w rozwijającym się układzie nerwowym, utrata synaps i dysfunkcja synaptyczna prowadzą do deficytów poznawczych, ruchowych, w uczeniu się i w uwadze [219], [220]. Przywrócenie komunikacji między komórkami neuronalnymi i rekonstruowanie sieci neuronalnych są kluczowe dla odzyskiwania funkcji neurologicznych. Proces ten zależy od przebudowy struktur synaptycznych, co przywraca funkcjonalność i aktywność neuronalną [221], [222].

W toku naszych badań założyliśmy, że neuroprotektoryjne działanie SB, stwierdzone w naszym badaniu, po HI indukowanym u szczurzych osesków będzie dalej przekładać się na poprawę funkcjonalną zwierząt. W tym celu przeprowadziliśmy ocenę reakcji na bodźce za pomocą wybranych testów behawioralnych oraz zmian w funkcjach motorycznych, sensorycznych i równowagi, za pomocą zmodyfikowanej skali nasilenia neurologicznego (mNSS) u zwierząt po urazie hipoksyjno-ischemicznym i po podaniu maślanu sodu. W żadnym z przeprowadzonych testów nie wykazaliśmy jednak różnic w wynikach pomiędzy analizowanymi grupami doświadczalnymi. Brak zmian w funkcjach poznawczych pomiędzy szczurami dotkniętymi HI a grupą kontrolną może sugerować, że uszkodzenie mózgu indukowane w naszym modelu badawczym jest na tyle łagodne, że pomimo obserwowanych histopatologicznych i ultrastrukturalnych uszkodzeń tkanki, nie wpływa ono istotnie na zachowanie zwierząt. Należy podkreślić, że w modelu eksperymentalnej hipoksji-ischemii uszkodzeniu ulega tylko jedna półkula mózgu i brak efektu HI może wynikać z kompensacji przez drugą, zdrową półkulę. Ponadto u osesków i młodych szczurów plastyczność neuronalna jest bardzo wysoka, dlatego też tworzenie nowych połączeń synaptycznych oraz reorganizacja kory mózgu i struktur podkorowych mogą maskować deficyty w testach behawioralnych [223], [224]. Podanie inhibitora HDAC po wystąpieniu urazu również nie miało wpływu na uzyskane wyniki we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych przez Zespół z Zakładu Neurobiologii Naprawczej. Wykazano, że tylko w dwóch testach indywidualnych (z pięciu przeprowadzonych): wodnym labiryncie Morrisa oraz rejestracji wokalizacji ultradźwiękowych były istotne deficyty behawioralne u szczurów hipoksyjno-ischemicznych w porównaniu do grupy kontrolnej [173]. Zastosowanie maślanu sodu u szczurów po HI nie udało znacząco przeciwdziałać uszkodzeniom funkcjonalnym mózgu spowodowanym niedokrwieniem-niedotlenieniem. Mimo to zaobserwowano tendencję do poprawy zdolności

uczenia się, na co wskazują wyniki uzyskane w teście z wodnym labiryntem Morrisa [173]. Brak zaburzenia funkcji poznawczych obserwowany w pozostałych testach potwierdza wyniki naszych obecnych badań i wskazują, że szczury poddane działaniu neonatalnej HI wykazują pewien stopień regeneracji tkanki. Pomimo niespodziewanego braku efektu niedokrwienia-niedotlenienia oraz zastosowania maślanu sodu w przeprowadzonych przez nas testach behawioralnych wyniki innych badaczy wskazują, że efekt neuroprotekcyny po zastosowaniu inhibitorów HDACs był skorelowany z poprawą neurobehawioralną zwierząt. W badaniach na szczurzym modelu tMCAO podanie inhibitora HDAC – SAHA 4 godziny po rozpoczęciu reperfuzji spowodowało poprawę funkcjonalną zwierząt oraz między innymi zmniejszyło objętość uszkodzenia i obrzęk, a także osłabiło aktywację mikrogleju [225]. W modelach uszkodzenia mózgu u dorosłych gryzoni leczonych HDACis, poprawa funkcjonalna korelowała ze zwiększoną neurogenezą i zmniejszonym nasileniem urazu neurologicznego [139], [152], [161], [226]. Autorzy tych badań podkreślali fakt, że eksperymentalne ograniczenie neurogenezy u dorosłych gryzoni upośledza formowanie pamięci w hipokampie, natomiast stymulowana neurogeneza wydaje się być jedną z metod wspomagających regenerację funkcji poznawczych. Z drugiej strony, istnieją sprzeczne doniesienia, które nie wykazały wpływu redukcji neurogenezy w mózgu dorosłych zwierząt na procesy formowania pamięci, mimo że wcześniej silnie sugerowano istotną rolę nowo powstających neuronów [227], [228], [229]. W świetle tych niespójnych danych, niemożliwe jest jednoznaczne wskazanie czy efekt neuroprotekcyny HDAC jest na tyle silny, że przekłada się na poprawę funkcjonalną zwierząt.

5.4. Wpływ maślanu sodu na aktywację układu dopełniacza w szczurzym modelu *in vitro* neonatalnej hipoksji-ischemii

W dalszych częściach pracy sprawdzono, czy mikroglej oraz białka dopełniacza znajdują się w pobliżu wypustek neuronów oraz czy deficyt tlenowo-glukozowy i podawanie maślanu sodu wpływa na ich lokalizację w modelu *in vitro* neonatalnej hipoksji-ischemii.

Komórki mikrogleju oraz białko C3 układu dopełniacza było obecne w sąsiedztwie wypustek neuronów we wszystkich badanych grupach zarówno 24, jak i 72 godziny po procedurze OGD. Potwierdza się więc, to o czym donoszą coraz liczniejsze badania prowadzone na różnych modelach uszkodzenia mózgu i chorób neurodegeneracyjnych – układ dopełniacza przy udziale mikrogleju jest zaangażowany w przycinanie synaps/zakończeń nerwowych. W mysich modelach choroby Alzheimera wykazano, że brak C1q i C3 zmniejsza

aktywność fagocytarną mikrogleju, co skutkuje mniejszą utratą synaps oraz działa neuroprotekcynie [230], [231], [232], [233]. W eksperymentalnym modelu HI u noworodków myszy odnotowano, że odkładanie się C1q w obrębie uszkodzonej tkanki było skorelowane z obszarami, w których obserwowano utratę synaps [200]. W szczurzym modelu okołooperacyjnego zaburzenia poznawczego (PND, z ang. *perioperative neurocognitive disorders*) grupa Liu i współpracowników (2025) badała wpływ leczenia inhibitorem deacetylaz histonów z grupy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs, z ang. *short chain fatty acids*). Badacze wykazali, że podawanie SCFAs może łagodzić objawy PND, a mechanizmy tego działania mogą być powiązane z regulacją szlaku dopełniacza C1q i eliminacją synaps zależną od mikrogleju [234]. Niemniej jednak, w naszych badaniach nie udało się stwierdzić, czy OGD lub SB wpływają na lokalizację mikrogleju i białek dopełniacza w mieszanej hodowli pierwotnych komórek mikrogleju i neuronów.

5.5. Wpływ maślanu sodu na ochronę neuronów w szczurzym modelu *in vitro* neonatalnej hipoksji-ischemii

W kolejnym etapie, posługując się analizą Sholla, potwierdziliśmy neuroprotekcynny wpływ maślanu sodu w modelu hipoksji-ischemii *in vitro*. Neurony poddane procedurze OGD, hodowane w obecności maślanu sodu wykazywały bardziej złożoną budowę, posiadały dłuższe i bardziej rozgałęzione wypustki w porównaniu do komórek, które nie otrzymywały maślanu sodu. Choć bez wątplenia niedotlenienie-niedokrwienie powoduje utratę neuronów w obszarze urazu, a podawanie inhibitorów HDAC ma udowodnione działanie neuroprotekcynne w licznych modelach urazów mózgu i chorób neurodegeneracyjnych, cytowanych wyżej w dyskusji, według naszej wiedzy mało doniesień literaturowych dotyczy morfologii i stopnia skomplikowania budowy neuronów po HI i po leczeniu HDACis. W szczurzym modelu MCAO badacze wykazali spadek ekspresji białka MAP2 w półkulach mózgow dotkniętych ischemią, podczas gdy po podawaniu zwierzętom maślanu sodu efekt utraty tego białka był znoszony [172]. Badacze z grupy Liu i współpracownicy (2012), wskazywali na neuroprotekcynne działanie VPA poprzez zwiększenie przeżywalności oligodendrocytów i promowanie różnicowania progenitorów oligodendrocytów do dojrzałych komórek oraz zwiększonej gęstości aksonów w obszarze bezpośrednio otaczającym ognisko niedokrwienne po zastosowaniu inhibitora deacetylaz histonów – kwasu walproinowego (VPA) w szczurzym modelu MCAO [152]. W innych badaniach skupionych na wpływie inhibitorów HDAC – VPA i TSA na długość i gęstość neurytów po ischemii *in vitro* wykazano, iż neurony po procedurze OGD, które hodowano w obecności HDACi posiadały znacznie dłuższe wypustki od neuronów

nie poddanych leczeniu [235]. Badania z zastosowaniem MC1568 – inhibitora HDAC specyficznego dla klasy IIa, wykazały, że promuje on wzrost i rozwój neurytów oraz chroni neuryty przed uszkodzeniem neurotoksycznym. Ponadto wykazano, że hamowanie aktywności HDAC przy pomocy inhibitorów specyficznych dla klasy IIa skutkuje aktywacją szlaku sygnałowego Smad, o którym wiadomo, że promuje przeżycie i wzrost neuronów dopaminergicznych śródmózgowia [236]. Kolejna grupa badawcza skupiła się na hb-HDACis – inhibitorach deacetylaz histonów opartych na kwasie hydroksamowym. Udowodnili potencjał neurogeny kilku związków, wraz z ich zdolnością do zwiększania ekspresji BDNF [237].

5.6. Wpływ maślanu sodu na stan zapalny i polaryzację mikrogleju w modelu *in vitro* neonatalnej hipoksji-ischemii

W prezentowanej pracy doktorskiej zbadaliśmy także wpływ inhibitora deacetylaz histonów – maślanu sodu – na polaryzację mikrogleju w hodowli *in vitro* po deprywacji tlenu i glukozy (OGD). Czasowe ograniczenie dopływu tlenu i glukozy dobrze odzwierciedla warunki, jakim poddawany jest mózg podczas epizodów niedotlenienia-niedokrwienia. Główną rolę w inicjowaniu reakcji zapalnej odgrywają aktywowane komórki mikrogleju obecne w ośrodkowym układzie nerwowym. Aktywacja i polaryzacja mikrogleju ma kluczowe znaczenie w rozwoju stanu zapalnego po niedokrwieniu mózgu oraz w poischemicznej naprawie tkanek. Opisane w niniejszej dysertacji badania wykazały wyraźną aktywację mikrogleju linii BV2 w odpowiedzi na niedobór tlenu i glukozy. Po urazie ischemicznym, mikroglej zaczyna intensywnie produkować szereg czynników prozapalnych – takich jak cytokiny, chemokiny, syntazę tlenku azotu (NOS) czy reaktywne formy tlenu (ROS) – które przyczyniają się do zaburzeń funkcjonowania neuronów, a w konsekwencji do ich obumierania [54], [238]. Podobne wyniki uzyskano również w niektórych badaniach *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnego mikrogleju i modelu OGD. Zhang i Zhao wykazali zwiększoną ekspresję cytokin prozapalnych TNF- α , IL-1 β i IL-6 w komórkach pierwotnego mikrogleju myszy 24 godziny po OGD [239]. Co więcej, poziomy mRNA IL-1 β , IL-6 i TNF- α w mysich komórkach linii BV2 były znacznie zwiększone po OGD [240]. Dommergues wraz z zespołem (2003) udowodnili, że zmniejszenie aktywacji mikrogleju u myszy jest związane ze zmniejszonym uszkodzeniem mózgu [241]. Należy jednak podkreślić, że odpowiedź zapalna stanowi istotny element wrodzonej obrony organizmu, uczestnicząc zarówno w eliminacji patogenów, jak i w procesach regeneracyjnych po niedokrwicznym uszkodzeniu mózgu. Z tego

względem całkowite zahamowanie aktywności mikrogleju może paradoksalnie prowadzić do nasilenia uszkodzeń mózgu po epizodzie niedotlenieniowo-niedokrwiennym [52], [61].

W zależności od sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska, komórki mikrogleju mogą przyjmować różne fenotypy, charakteryzujące się odmiennymi stanami aktywacji oraz sposobami działania. Klasyfikacji tych fenotypów dokonał Colton w 2009 roku wyróżniając prozapalny fenotyp mikrogleju M1 i przeciwzapalny fenotyp M2 [179]. W badaniach przeprowadzonych przez Wanga i współpracowników (2015) z wykorzystaniem modelu mechanicznego urazu mózgu (TBI, z ang. *traumatic brain injury*) wykazano, że Scriptaid – inhibitor deacetylaz histonów – łagodzi reakcję zapalną, obniżając ekspresję markerów charakterystycznych dla mikrogleju o fenotypie M1 oraz zwiększając liczbę komórek o fenotypie M2 [180]. Z kolei w modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego u szczurów (SCI, z ang. *spinal cord injury*) zastosowanie kwasu walproinowego (VPA) doprowadziło do zmniejszenia stanu zapalnego poprzez promowanie przeciwzapalnego fenotypu M2 mikrogleju. Efekt ten osiągnięto dzięki zahamowaniu aktywności HDAC3 i modulacji acetylacji szlaku NF- κ B za pośrednictwem białka STAT1 [242].

Wiele danych konsekwentnie pokazuje, że niektóre inhibitory HDAC zmniejszają stan zapalny w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu [139], [172]. Niektóre badania *in vivo* wykazały, że HDACi wpływają na aktywację i polaryzację mikrogleju po urazie niedotlenieniowo-niedokrwiennym. U szczurzych osesków, u których wywołano taki rodzaj uszkodzenia mózgu, mikroglej pod wpływem leczenia HDACi zmienia swój fenotyp z prozapalnego M1 na przeciwzapalny M2 [243]. Taka zmiana polaryzacji sprzyja uruchomieniu sygnalizacji neuroprotektoryjnej i przeciwzapalnej, co może przyczynić się do ograniczenia uszkodzeń mózgu. Podawanie tych związków w szczurzym modelu udaru mózgu u zwierząt dorosłych spowodowało znaczne zmniejszenie liczby mikrogleju, zahamowanie jego aktywacji i obniżenie poziomu innych markerów stanu zapalnego [161]. Patnala i współpracownicy (2017) wykazali, że neuroprotektoryjny efekt SB w mysim modelu udaru niedokrwienego był związany z immunosupresją mediatorów prozapalnych (TNF α i NOS2) przez specyficzne działanie HDACi oraz z podwyższeniem poziomu genu przeciwzapalnego IL-10 i aktywacją szlaku sygnalizacyjnego STAT3 w mikrogleju [172]. Ponadto, inhibicja HDAC przez maślan sodu wyraźnie zmieniła transkryptom mikrogleju, wpływając na szlaki biologiczne związane z neurozapaleniem, neuroprotekcją i fagocytozą, a także zmieniła morfologię mikrogleju, promując przesunięcie w kierunku naprawczych, neurotroficznych fenotypów w obrębie niedokrwionej penumbry w modelu myszy MCAO

[244]. Także wyniki badań immunohistochemicznych otrzymane przez Zespół z Zakładu Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN wskazują, podobnie jak praca Wanga i współpracowników (2015), że obecność inhibitora deacetylaz histonów, w tym wypadku maślanu sodu, zwiększa liczebność komórek mikrogleju/makrofagów o fenotypie M2 i redukuje liczbę komórek o fenotypie M1 oraz obniża stężenie cytokiny prozapalnej IL-1 β w półkuli ipsilateralnej (uszkodzonej) w modelu neonatalnej hipoksji ischemii u szczura [165], [173], [174].

Wyniki niektórych badań *in vitro* wskazują, że inhibitory deacetylaz histonów wykazują działanie przeciwzapalne wobec komórek BV2 oraz pierwotnych komórek mikrogleju aktywowanych przez LPS lub OGD. Efekt ten przejawia się poprzez obniżenie poziomu ekspresji wybranych cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6 i TNF- α [245], [246], [247], [248]. Dodatkowo, badania na pierwotnych hodowlach mikrogleju, aktywowanych lipopolisacharydem (LPS) w celu uzyskania prozapalnego fenotypu M1, wykazały, że obecność inhibitorów HDAC, takich jak TSA i SAHA, prowadzi do zmniejszenia ekspresji prozapalnych cytokin (IL-6, TNF α , IL-1 β) oraz syntazy tlenu azotu [249]. W badaniu *in vitro* na szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej, przeprowadzonym przez Zespół z Zakładu Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN, wykazano, że maślan sodu wpływa na zmianę polaryzacji pierwotnych komórek mikrogleju. Deprywacja tlenu i glukozy spowodowała znaczny wzrost ekspresji markerów mikrogleju prozapalnego M1, takich jak CD86 i IL-1 β 24 godziny po procedurze OGD, a jednocześnie obniżyła poziom markerów fenotypu przeciwzapalnego M2, tj. CD200 i arginazy. Podanie SB odwróciło niekorzystną polaryzację mikrogleju po OGD, co objawiło się znacznym zmniejszeniem poziomów prozapalnych markerów IL-1 β i CD86 oraz zwiększeniem ekspresji markerów CD200 i arginazy [175].

W niniejszym badaniu stwierdzono wzrost ekspresji mRNA wszystkich badanych genów prozapalnych (dla IL-1 β , TNF α i CD86) po zastosowaniu procedury OGD w komórkach mikrogleju linii BV2, w porównaniu do próbek kontrolnych. Podanie maślanu sodu po OGD istotnie obniżyło poziom mRNA tych genów. Analiza ekspresji markerów przeciwzapalnych wykazała mniej wyraźny wpływ OGD na poziom mRNA tych białek, natomiast zastosowanie SB istotnie podwyższało poziom mRNA IL-4, arginazy i CD206 we wczesnym czasie po OGD.

IL-1 β jest powszechnie identyfikowana jako istotny regulator zarówno fazy wczesnej, jak i późniejszych etapów poischemicznego uszkodzenia mózgu, które charakteryzują się

aktywacją procesów zapalnych [46], [250], [251]. Kilka badań wykazuje, że niedotlenienie i niedokrwienie noworodków powoduje szybki i trwały wzrost ekspresji mRNA i białka IL-1 β [165], [175], [252], [253]. Podwyższony poziom IL-1 β obserwowano również po dłuższym czasie reperfuzy (6 i 14 dni). Taka opóźniona odpowiedź sugeruje utrzymujący się stan zapalny, który może prowadzić do trwałego uszkodzenia neuronów [254]. Jak nadmieniono wcześniej, szereg prac wskazuje na hamujący efekt inhibitorów HDACs, w tym maślanu sodu, na ekspresję IL-1 β w komórkach mikrogleju [173], [174], [175], [249].

Aktywowany mikroglej produkuje także TNF α , który stymuluje apoptozę komórek, zwłaszcza oligodendrocytów, prowadząc do zaburzeń mielinizacji neuronów [46]. Liczne badania wskazują na patogenny wpływ TNF α indukowanego niedokrwieniem mózgu. W modelu HIE u osesków szczurzych stwierdzono istotny wzrost poziomu TNF α zarówno w surowicy, jak i w uszkodzonych obszarach mózgu już 4 godziny po urazie [255], [256]. W związku z tym, TNF α może pełnić patogenną rolę w początkowej fazie odpowiedzi zapalnej po niedotlenieniu-niedokrwieniu u noworodków. W zwierzęcym modelu uszkodzenia siatkówki spowodowanego niedokrwieniem/reperfuzyą wykazano, że TSA ma działanie neuroprotecyjne poprzez redukcję ekspresji prozapalnych mediatorów, w tym TNF α oraz jednoczesne zwiększanie poziomu BDNF w linii komórek siatkówki 661W [257]. W niedawno opublikowanej pracy wykazano neuroprotekcję poprzez redukcję ekspresji TNF α w mysim modelu przejściowej okluzji tętnicy środkowej mózgu po zastosowaniu HDACi – SAHA [258].

Jak wspomniano wyżej mikroglej M1 wydziela białka prozapalne, w tym marker powierzchniowy CD86 [259]. Stymulacja mikrogleju LPS-em w badaniach zespołu Kannan (2013) skutkowałą zwiększoną ekspresją markera CD86 na powierzchni komórek, która została zahamowana przez zastosowanie TSA [249]. W cytowanej wyżej pracy zespołu Li z 2019 roku również wykazano, że zastosowanie inhibitora HDAC – SAHA zmniejsza ekspresję białka CD86 w aktywowanym ischemią mikrogleju [258]. Nasze wcześniejsze badania nad efektem maślanu sodu na pierwotnych komórkach mikrogleju poddanych procedurze OGD wykazały wzrost ekspresji mRNA markera CD86 24 godziny po OGD, podczas gdy podanie SB zmniejszało poziom ekspresji tego markera do wartości porównywalnej dla komórek kontrolnych [175].

Mikroglej o fenotypie M2 wydziela czynniki troficzne i cytokiny przeciwzapalne, takie jak interleukina 4, która zmniejsza liczbę makrofagów w uszkodzonej tkance mózgu oraz wspomaga aktywację procesów naprawczych [61]. W badaniach przedstawionych w niniejszej

rozprawie doktorskiej odnotowaliśmy spadek poziomu interleukiny 4 jedynie 72 godziny po OGD. Jak dotąd nie ma dostępnych badań nad wpływem HDACis na ekspresję IL-4 po ischemii. W badaniach Zespołu Neurobiologii Naprawczej nad szczurzym modelem asfiksji okołoporodowej nie wykazano wpływu stosowania inhibitora HDAC – Givinostatu/ITF2357 po urazie hipoksyjno-ischemicznym na ekspresję IL-4. Co więcej, w tym badaniu wykazano wzrost ekspresji tej interleukiny w mózgach zwierząt po HI niepoddanych leczeniu inhibitorem [260]. Wyniki z cytowanej publikacji oraz wyniki z niniejszej dysertacji, mogą wskazywać na endogenną obronę komórek w odpowiedzi na uszkodzenie, która jednak jest niewystarczająca do zmniejszenia stanu zapalnego po niedotlenieniu-niedokrwieniu.

Mikroglej o fenotypie M2 prezentuje charakterystyczne markery takie jak arginaza 1 i CD206 [59]. Badania przeprowadzone przez Kannana i współpracowników (2013) wykazały spadek ekspresji arginazy po zastosowaniu inhibitora HDAC – TSA, co sugeruje, że małowczątkowe inhibitory HDAC mogą tłumić zarówno prozapalną, jak i przeciwzapalną aktywację mikrogleju [249]. Wyniki te są jednak sprzeczne z obserwacjami zespołu Li (2019), w których wykazano, że w mysim modelu przejściowej okluzji tętnicy środkowej mózgu traktowanie mikrogleju inhibitorem HDAC – SAHA prowadzi do zwiększenia ekspresji arginazy 1 [258]. W naszych wcześniejszych badaniach dotyczących wpływu maślanu sodu na pierwotne komórki mikrogleju poddane procedurze OGD zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA arginazy 1 24 godziny po OGD, natomiast zastosowanie SB przywracało ekspresję tego markera do poziomu porównywalnego z hodowlami kontrolnymi [175].

Jak wspomniano wyżej mikroglej o fenotypie M2 prezentuje charakterystyczny marker CD206 (antygen różnicowania komórkowego 206) [59]. Wyniki cytowanej uprzednio pracy zespołu Li (2019), wykazały, że traktowanie mikrogleju SAHA również zwiększa ekspresję CD206 w mikrogleju aktywowanym ischemią [258].

Wyniki naszych badań przeprowadzonych metodą cytometrii przepływową wykazały, że w modelu asfiksji okołoporodowej *in vitro* z użyciem linii BV2 komórki kontrolne w obu analizowanych czasach (24 h i 72 h) wykazywały ekspresję markera CD86. Nie odnotowano również różnic w ekspresji tego markera pomiędzy grupami, w obu punktach czasowych po OGD. Nie zauważono również różnic w udziale populacji określonej jako przeciwzapalna (CD11b+CD206+) pomiędzy grupami 24 godziny po OGD. 72 godziny po procedurze OGD odnotowano spadek liczebności populacji CD11b+CD206+ po OGD w porównaniu do grupy kontrolnej. Podane maślanu sodu po OGD spowodowało wzrost udziału przeciwzapalnej

populacji w analizowanych próbkach, choć wyniki nie były istotne statystycznie. Co ciekawe odnotowano także spory odsetek populacji komórek CD86+CD206+, co może sugerować, że dotychczasowy podział na mikroglej M1 i M2 jest niewystarczający. W 2023 Zhang i współpracownicy wykazali w swoich badaniach na dwóch różnych mysich modelach zwyrodnienia siatkówki obecność mikrogleju wykazującego ekspresję zarówno markera CD86 i CD206, który zaangażowany jest w fagocytozę, a nie rozwój stanu zapalnego [261].

Brak spójności wyników uzyskiwanych przez różnych badaczy, a niekiedy nawet sprzeczne wyniki związane z odpowiedzią mikrogleju na obecność HDACi i jego konwersją z fenotypu prozapalnego do przeciwzapalnego, może wskazywać na specyficzność działania różnych inhibitorów deacetylaz histonów na polaryzację tych komórek. Ponadto, istnieje wiele doniesień podkreślających fakt, że mikroglej wykazuje szerokie spektrum stanów aktywacji i zgodnie z twierdzeniem niektórych badaczy, nie da się ich precyzyjnie określić przy użyciu uproszczonej klasyfikacji M1/M2 [53], [262], [263].

5.7. Wpływ maślanu sodu na wybrane ścieżki sygnałowe aktywowane w mikrogleju w modelu *in vitro* neonatalnej hipoksji-ischemii

Niniejsze badanie wykazało, że inhibitor deacetylaz histonów, maślan sodu wywiera korzystne efekty na polaryzację mikrogleju po niedoborze tlenu i glukozy (OGD), czyli w modelu hipoksji-ischemii *in vitro*. Wykazaliśmy, że maślan sodu istotnie zmniejsza poziom prozapalnych markerów IL-1 β , TNF α oraz CD86 w komórkach BV2 po OGD.

Aby lepiej zrozumieć mechanizm przeciwzapalny działania HDACi, zbadaliśmy również wpływ SB na ekspresję i fosforylację kinaz ERK i AKT w komórkach mikrogleju poddanych hipoksji-ischemii *in vitro*. Wyniki badań wykonanych metodą Western Blot i ELISA pokazały, że SB zwiększał poziom fosforylowanego AKT (p-AKT) 24 i 72 godziny po OGD, w porównaniu z komórkami BV2 nietraktowanymi SB. W związku z tym założyliśmy, że SB może hamować stan zapalny indukowany przez mikroglej po urazie hipoksji-ischemii prawdopodobnie poprzez aktywację szlaku sygnalizacji komórkowej PI3K/AKT.

Kinaza serynowo-treoninowa AKT pełni kluczową rolę w regulacji aktywności i funkcji mikrogleju. AKT jest głównym enzymem szlaku sygnalizacyjnego PI3K/AKT, który zostaje aktywowany w mikrogleju po uruchomieniu receptorów, takich jak CSF-1R, TREM2, CX3CR1 oraz receptory toll-podobne (TLR) [65], [66]. Aktywowany AKT fosforyluje

różnorodne substraty, takie jak GSK3 β , mTOR, czynniki transkrypcyjne FOXO i NF- κ B, koordynując różne procesy komórkowe, w tym przeżycie komórek, metabolizm, ruchliwość oraz reakcje immunologiczne [67].

Badania wykazują, że aktywność AKT w mikrogleju jest ściśle związana z polaryzacją fenotypową. Zwiększenie sygnalizacji AKT sprzyja neuroprotekcjnemu, przeciwzapalnemu fenotypowi M2, który cechuje się wyższą ekspresją interleukiny 10, antagonisty receptora IL-1 oraz interferonu β . Z kolei blokada sygnalizacji AKT powoduje przesunięcie mikrogleju w stronę prozapalnego fenotypu M1, co prowadzi do wzrostu produkcji tlenu azotu, TNF- α , IL-1 β , IL-6 i innych mediatorów zapalnych [68], [69], [70].

Wpływ inhibitorów HDAC na polaryzację mikrogleju poprzez aktywację tego szlaku nie został jeszcze jednoznacznie określony. Większość dostępnych danych wskazuje, że stosowanie inhibitorów HDAC aktywuje szlaki sygnałowe PI3K/AKT w komórkach mikrogleju, redukuje stan zapalny i zwiększa ekspresję markerów związanych z polaryzacją M2 [139], [180], [264]. Huang i współpracownicy (2018) badali wpływ hamowania HDAC za pomocą kwasu walproinowego i TSA na morfologię i polaryzację mikrogleju i wykazali, że oba inhibitory zwiększały poziom fosforylacji AKT w pierwotnych hodowlach mikrogleju, co korelowało z indukcją alternatywnej polaryzacji (M2) [264]. Podobnie inny inhibitor HDAC, Scriptaid, wzmacniał fosforylację/aktywację AKT i przesuwał polaryzację mikrogleju w kierunku fenotypu ochronnego M2 w hodowli mikrogleju pierwotnego traktowanego LPS [180]. Autorzy wykazali, że ochronna rola hamowania HDAC w leczeniu uszkodzeń istoty białej indukowanych urazem mózgu jest powiązana z modulacją aktywności mikrogleju/makrofagów przez szlak PI3K/AKT. Szlak ten bierze również udział w rozwoju uszkodzeń mózgu po niedokrwieniu [265]. Kim i współpracownicy (2007) wykazali, że poziom fosforylowanego AKT był obniżony w mózgach szczurów po niedokrwieniu (model pMCAO, z ang. *permanent middle cerebral artery occlusion*). Leczenie inhibitorami HDAC (TSA lub SB) przywracało poziom p-AKT do wartości obserwowanych u zwierząt kontrolnych [139]. Neuroprotekcjne efekty inhibitorów HDAC w uszkodzeniach mózgu wywołanych niedokrwieniem prawdopodobnie obejmują wiele mechanizmów, w tym aktywację szlaku PI3K/AKT oraz hamowanie stanu zapalnego po niedokrwieniu.

W przeciwieństwie do wzrostu fosforylacji/aktywacji kinazy AKT po zastosowaniu SB, kinaza ERK1/2 (w formie całkowitej i fosforylowanej) utrzymywała się na poziomie kontrolnym przez cały czas trwania badania. Wydaje się więc, że nie uczestniczy ona

w modulacji fenotypu komórek mikrogleju w warunkach hipoksyjno-ischemicznych. Kinazy ERK1 i ERK2 pełnią kluczową rolę jako efekторы w szlaku sygnalizacyjnym MAPK. Po aktywacji (fosforylacji) ERK1/2, przenoszą się do jądra komórkowego, gdzie oddziałują z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi, regulując ekspresję genów i wpływając na wiele funkcji komórkowych, co prowadzi do uruchomienia procesów naprawczych lub indukcji śmierci komórki [76].

ERK1/2 wykazuje nieprawidłową ekspresję w różnych modelach niedokrwienia mózgu, jednak efekty sygnalizacji ERK1/2 oraz mechanizmy ich działania różnią się w zależności od konkretnego modelu eksperymentalnego [73], [74], [75]. Aktywacja ERK w mikrogleju wpływa na modulację sygnalizacji zapalnej, aktywność fagocytarną oraz ekspresję cytokin, przyczyniając się zarówno do progresji uszkodzenia, jak i jego zmniejszenia. W badaniach niedokrwienia mózgu u gryzoni fosforylacja ERK1/2 jest szybko indukowana w rdzeniu niedokrwienia oraz w obszarze penumbry. Farmakologiczne zahamowanie ERK, przy użyciu inhibitorów MEK (kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami, z ang. *mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)*), takich jak U0126, znacząco zmniejszała objętość ogniska niedokrwienego oraz hamowała ekspresję mRNA IL-1 β . Ponadto zależna od ERK aktywacja czynnika transkrypcyjnego Elk-1 (czynnik transkrypcyjny ETS podobny 1, z ang. *ETS like-1*), zwiększała produkcję prozapalnych cytokin przez mikroglej i makrofagi [266].

Mikroglej jest jednym z pierwszych elementów, które reagują na uraz niedokrwienno, a fosforylowany ERK (p-ERK) gromadzi się głównie w komórkach mikrogleju i makrofagów wyznakowanych markerem Iba1 (cząsteczka pośrednicząca w wiązaniu zjonizowanego wapnia-1, z ang. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*, marker charakterystyczny dla mikrogleju/makrofagów) już w ciągu kilku godzin po urazie (< 4 h). Co istotne, leczenie inhibitorem U0126 nie tylko tłumi sygnalizację ERK, ale także znacząco zmniejsza aktywację i proliferację mikrogleju, oraz tworzenie blizny glejowej. Podkreśla to znaczenie ERK w modulacji odpowiedzi neurozapalnej i procesie glejocy, które towarzyszą uszkodzeniu mózgu [267].

Dodatkowo, istnieją doniesienia wskazujące na istotną rolę ERK w regulacji fagocytozy przez mikroglej. W modelu udaru niedokrwienno mózgu aktywacja kanałów potasowych BK prowadzi do zwiększenia ekspresji p-ERK1/2 w mikrogleju, co wspomaga proces usuwania obumarłych neuronów [77]. Najnowsze badania wskazują również, że ERK moduluje

polaryzację mikrogleju. Aktywacja ERK może blokować translokację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B do jądra komórkowego, co hamuje prozapalną polaryzację M1, a jednocześnie przesuwa mikroglej ku fenotypowi przeciwzapalnemu M2, który wspomaga regenerację tkanek [78].

Co ciekawe, hamowanie deacetylaz histonów kwasem walproinowym lub maślanem sodu nie wpływało istotnie na aktywację szlaków MAPK, w tym ERK1/2, p38 (klasa kinaz MAPK) czy JNK (N-końcowe kinazy c-Jun, z ang. *c-Jun N-terminal kinases*; Jun – nazwa czynnika transkrypcyjnego) w pierwotnych kulturach mikrogleju stymulowanych lipopolisacharydem [176]. Sugeruje to, że przeciwzapalne działanie inhibitorów HDAC może wynikać z modulacji epigenetycznej – np. poprzez zwiększoną acetylację histonów i regulację transkrypcji genów związanych z zapaleniem – a nie przez bezpośredni wpływ na kaskady sygnalizacyjne MAPK. Jak wspomniano wcześniej, ERK1/2 wpływa na aktywację i polaryzację mikrogleju w różnych stanach neurozapalnych i niedokrwiennych, jednak zmiany fenotypu z prozapalnego (M1) do przeciwzapalnego (M2) związane z obecnością inhibitorów HDAC wydają się zachodzić niezależnie od modulacji kinazy ERK [172], [268].

6. Podsumowanie i wnioski

- Poziom ekspresji genów składników dopełniacza w mózgu wzrastał po hipoksji-ischemii. Było to szczególnie widoczne po upływie 24 h od HI dla pierwszych białek kaskady (C1q, C3) i po upływie 72 h i 5 d dla kolejnych białek kaskady (odpowiednio C9 i C5). Po zastosowaniu SB poziom ekspresji mRNA badanych składników dopełniacza w większości przypadków obniżał się we wczesnych punktach czasowych po HI, a w późniejszym czasie (5 d po HI) wzrastał.
- Poziom ekspresji receptorów dla białek dopełniacza był wysoki we wszystkich analizowanych czasach po HI. Po leczeniu SB poziom ten wzrósł jeszcze bardziej w pierwszej fazie po uszkodzeniu (24 i 72 godziny) i zmniejszył się w późnej fazie uszkodzenia (5 i 14 dni po HI). W ostrej fazie po niedokrwieniu/niedotlenieniu mózgu zwiększona ekspresja receptorów po zastosowaniu SB prawdopodobnie może wpływać na procesy związane z neuroprotekcją, podczas gdy w późniejszej fazie po HI ich zmniejszona ekspresja może promować procesy naprawcze tkanki nerwowej.
- Odnotowano wzrost poziomu białka C3 po 5 dniach oraz białka C5 po 24 godzinach od wywołania HI, a podawanie maślanu sodu powodowało istotny spadek poziomu tych białek.
- Składniki układu dopełniacza znajdowały się w OUN w bliskim sąsiedztwie neuronów zarówno w warunkach fizjologicznych jak i po HI. Liczne kolokalizacje C5 i C3 z białkami synaptycznymi – synaptofizyną i PSD-95 potwierdzają, że są one zlokalizowane w pobliżu synaps. Nie udało się wykazać wpływu SB na kolokalizacje składników dopełniacza z białkami synaptycznymi w mózgach zwierząt po HI.
- Po wywołaniu hipoksji-ischemii, w większości analizowanych punktów czasowych, odnotowano spadek poziomu PSD-95 i synapsyny I w mózgach zwierząt. Wskazuje to na utratę połączeń synaptycznych wywołanych niedokrwieniem/niedotlenieniem. Efekt ten w większości przypadków został zniesiony przez podawanie SB.
- W ultrastrukturze tkanki mózgu, w materiale pochodzącym od zwierząt poddanych zabiegowi HI, zaobserwowano cechy związane z degradacją tkanki mózgu: obrzęk tkanki nerwowej, „ciemne neurony”, obrzęk okołonaczyniowy, wypustki śródbłonka w świetle naczyń krwionośnych, rozwarstwioną, degradującą mielinę, zatarte struktury synaptyczne oraz obrzęk zakończeń nerwowych. Degradacja tkanki była znacznie mniejsza w mózgach zwierząt po HI, którym podano SB.

- W wykonanych testach behawioralnych nie wykazano efektu HI ani maślanu sodu na funkcje lokomotoryczne i poznawcze u szczurzych osesków. Brak zmian może wynikać z kompensacji przez drugą, zdrową półkulę oraz wysoką plastyczność neuronalną młodych osobników.
- W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem współhodowli pierwotnych neuronów i mikrogleju składniki układu dopełniacza są odnajdywane w bliskim sąsiedztwie wypustek neuronów zarówno w warunkach fizjologicznych jak i po OGD. Zauważono także mikroglej lokalizujący się w pobliżu dendrytów, zarówno w hodowlach kontrolnych, jak i poddanych procedurze OGD. Podobnie jak w badaniach *in vivo*, nie wykazaliśmy efektu HI oraz SB na lokalizację białek dopełniacza oraz mikrogleju we współhodowlach.
- W modelu *in vitro* wykazano ochronny wpływ maślanu sodu na neurony po procedurze OGD. Odnotowano większy stopień złożoności i rozgałęzienia neuronów w grupie OGD+SB, a same wypustki komórek były dłuższe, w stosunku do grupy, która nie otrzymywała inhibitora.
- W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem linii BV2 komórek mikrogleju wykazano zwiększoną ekspresję mRNA wszystkich genów prozapalnych 24 h po procedurze OGD w porównaniu do próbek kontrolnych (bez OGD). Zastosowanie maślanu sodu po OGD znacząco obniżyło poziom mRNA IL-1 β , TNF α i CD86 w komórkach BV2 w większości przypadków, do poziomu obserwowanego w hodowlach kontrolnych.
- OGD nie miało wpływu na ekspresję markerów przeciwzapalnych (IL-4, arginazy i CD206) w komórkach BV2 24 godziny po OGD w porównaniu do hodowli kontrolnej. Zastosowanie SB znacznie zwiększyło ekspresję analizowanych markerów przeciwzapalnych. 72 godziny po OGD zaobserwowano niewielkie, ale statystycznie istotne zmniejszenie ekspresji wszystkich badanych markerów przeciwzapalnych w komórkach BV2 poddanych OGD. Nie zauważono jednak wpływu podania SB w tym punkcie czasowym.
- W badaniach prowadzonych metodą cytometrii przepływowej wykazano, że komórki kontrolne linii BV2 (bez OGD) w obu analizowanych czasach (24 h i 72 h) wyrażały marker CD86.
- Nie zauważono różnic w udziale populacji komórek mikrogleju M2 (CD11b+CD206+) pomiędzy badanymi grupami 24 godziny po OGD. 72 godziny po procedurze OGD odnotowano spadek populacji CD11b+CD206+ po OGD w porównaniu do grupy

kontrolnej. Podane maślanu sodu po OGD spowodowało wzrost udziału przeciwzapalnej populacji komórek M2 w analizowanych próbkach.

- Odnotowano znaczny odsetek komórek wyrażających oba markery (komórki CD86+CD206+), co może sugerować, że część mikrogleju jest w stanie "przejściowym" pomiędzy fenotypem pro- a przeciwzapalnym.
- W modelu *in vitro* z wykorzystaniem linii BV2 odnotowano spadek ufosforylowanej formy AKT po 24 h w grupie poddanej OGD; poziom ufosforylowania/aktywacji kinazy AKT rośnie po zastosowaniu SB.
- Poziom ufosforylowanej formy ERK był podobny we wszystkich badanych grupach w obu rozpatrywanych czasach.

Badania te potwierdziły przeciwzapalny wpływ maślanu sodu w modelu okołoporodowej hipoksji-ischemii, poprzez modulację aktywacji składników układu dopełniacza oraz obniżenie ekspresji markerów prozapalnych i podwyższenie ekspresji markerów przeciwzapalnych produkowanych przez mikroglej. Ponadto potwierdziło się również neuroprotektoryjne działanie SB poprzez zmniejszenie eliminacji białek synaptycznych w modelu *in vivo* neonatalnej hipoksji-ischemii, a także ochronę wypustek neuronów w modelu *in vitro*. Wydaje się, że maślan sodu jest obiecującym związkiem, który może być rozważany jako potencjalny lek stosowany w celu zmniejszenia uszkodzeń mózgu w przypadkach asfiksji okołoporodowej.

Bibliografia

- [1] A. Dobrzańska, M. Gołkowska, D. Gruszczyński, i J. Czech-Kowalska, „Advances in therapy in newborns”, *Przewodnik Lekarza/Guide for GPs*, t. 12, nr 1, Art. nr 1, 2009.
- [2] C. F. Loidl *i in.*, „Hypothermia during or after severe perinatal asphyxia prevents increase in cyclic GMP-related nitric oxide levels in the newborn rat striatum”, *Brain Research*, t. 791, nr 1, Art. nr 1, kwi. 1998, doi: 10.1016/S0006-8993(98)00195-4.
- [3] J. E. Lawn, S. Cousens, i J. Zupan, „4 million neonatal deaths: When? Where? Why?”, *The Lancet*, t. 365, nr 9462, s. 891–900, mar. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)71048-5.
- [4] „Newborn mortality”, Światowa Organizacja Zdrowia, WHO.int, 14 mar. 2024 [Online]. Dostępne na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/newborn-mortality>. Dostęp: 20 marzec 2025.
- [5] P. Shah, S. Riphagen, J. Beyene, i M. Perlman, „Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxic-ischaemic encephalopathy”, *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, t. 89, nr 2, Art. nr 2, mar. 2004, doi: 10.1136/adc.2002.023093.
- [6] H. Muniraman *i in.*, „Biomarkers of hepatic injury and function in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy and with therapeutic hypothermia”, *Eur J Pediatr*, t. 176, nr 10, Art. nr 10, paź. 2017, doi: 10.1007/s00431-017-2956-2.
- [7] J. J. Volpe, „Neonatal encephalopathy: An inadequate term for hypoxic–ischemic encephalopathy”, *Annals of Neurology*, t. 72, nr 2, Art. nr 2, 2012, doi: 10.1002/ana.23647.
- [8] D. R. M. G. Ophelders *i in.*, „Preterm Brain Injury, Antenatal Triggers, and Therapeutics: Timing Is Key”, *Cells*, t. 9, nr 8, Art. nr 8, sie. 2020, doi: 10.3390/cells9081871.
- [9] H. J. Romijn, A. W. J. W. Janszen, M. J. D. van Voorst, R. M. Buijs, R. Balázs, i D. F. Swaab, „Perinatal hypoxic ischemic encephalopathy affects the proportion of GABA-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of the rat”, *Brain Research*, t. 592, nr 1, Art. nr 1, paź. 1992, doi: 10.1016/0006-8993(92)91653-V.

- [10] S. P. Miller *i in.*, „Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy”, *The Journal of Pediatrics*, t. 146, nr 4, Art. nr 4, kwi. 2005, doi: 10.1016/j.jpeds.2004.12.026.
- [11] A. Barnett *i in.*, „Neurological and Perceptual-Motor Outcome at 5 - 6 Years of Age in Children with Neonatal Encephalopathy: Relationship with Neonatal Brain MRI”, *Neuropediatrics*, t. 33, s. 242–248, sty. 2003, doi: 10.1055/s-2002-36737.
- [12] B. J. M. van Kooij, M. van Handel, R. A. J. Nivelstein, F. Groenendaal, M. J. Jongmans, i L. S. de Vries, „Serial MRI and Neurodevelopmental Outcome in 9- to 10-Year-Old Children with Neonatal Encephalopathy”, *The Journal of Pediatrics*, t. 157, nr 2, Art. nr 2, sie. 2010, doi: 10.1016/j.jpeds.2010.02.016.
- [13] J. M. Rennie, C. F. Hagmann, i N. J. Robertson, „Outcome after intrapartum hypoxic ischaemia at term”, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, t. 12, nr 5, Art. nr 5, paź. 2007, doi: 10.1016/j.siny.2007.07.006.
- [14] Q. Xu *i in.*, „Pattern of Brain Injury Predicts Long-Term Epilepsy Following Neonatal Encephalopathy”, *Journal of Child Neurology*, sty. 2019, doi: 10.1177/0883073818822361.
- [15] J. J. Volpe i J. F. Pasternak, „Parasagittal Cerebral Injury in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Clinical and Neuroradiologic Features”, *Pediatr Res*, t. 11, nr 4, Art. nr 4, kwi. 1977, doi: 10.1203/00006450-197704000-01177.
- [16] A. Perez *i in.*, „Long-Term Neurodevelopmental Outcome with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy”, *The Journal of Pediatrics*, t. 163, nr 2, Art. nr 2, sie. 2013, doi: 10.1016/j.jpeds.2013.02.003.
- [17] B. Karabulut i B. Sahbudak, „Autism Spectrum Disorder Screening at 18–36 Months in Infants with Moderate and Severe Neonatal Encephalopathy: Is Routine Screening Required?”, *Psychopharmacol Bull*, t. 50, nr 3, Art. nr 3, lip. 2020.
- [18] E. V. Wachtel i K. D. Hendricks-Muñoz, „Current Management of the Infant Who Presents with Neonatal Encephalopathy”, *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, t. 41, nr 5, Art. nr 5, maj 2011, doi: 10.1016/j.cppeds.2010.12.002.

- [19] N. Badawi *i in.*, „Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study”, *BMJ*, t. 317, nr 7172, Art. nr 7172, grudz. 1998, doi: 10.1136/bmj.317.7172.1554.
- [20] J. K. Grether i K. B. Nelson, „Maternal Infection and Cerebral Palsy in Infants of Normal Birth Weight”, *JAMA*, t. 278, nr 3, Art. nr 3, lip. 1997, doi: 10.1001/jama.1997.03550030047032.
- [21] S. J. Adamson, L. M. Alessandri, N. Badawi, P. R. Burton, P. J. Pemberton, i F. Stanley, „Predictors of neonatal encephalopathy in full term infants”, *BMJ*, t. 311, nr 7005, Art. nr 7005, wrz. 1995, doi: 10.1136/bmj.311.7005.598.
- [22] C. Lundgren, Brudin, Lars, Wanby, Anna-Stina, i M. and Blomberg, „Ante- and intrapartum risk factors for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy”, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, t. 31, nr 12, Art. nr 12, cze. 2018, doi: 10.1080/14767058.2017.1321628.
- [23] B. A. Itoo, Z. M. Al-Hawsawi, i A. H. Khan, „Hypoxic ischemic encephalopathy. Incidence and risk factors in North Western Saudi Arabia”, *Neurosciences Journal*, t. 8, nr 2, Art. nr 2, kwi. 2003.
- [24] M. Troszyński, „Płód i Noworodek”, w *Położnictwo - ćwiczenia. Podręcznik dla studentów medycyny*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2009, s. 76–88.
- [25] E. P. Yıldıız, B. Ekici, i B. Tatlı, „Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment”, *Expert Review of Neurotherapeutics*, t. 17, nr 5, s. 449–459, maj 2017, doi: 10.1080/14737175.2017.1259567.
- [26] P. Greco *i in.*, „Pathophysiology of hypoxic–ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future”, *Acta Neurol Belg*, t. 120, nr 2, Art. nr 2, kwi. 2020, doi: 10.1007/s13760-020-01308-3.
- [27] W.-X. Zong i C. B. Thompson, „Necrotic death as a cell fate”, *Genes Dev.*, t. 20, nr 1, s. 1–15, sty. 2006, doi: 10.1101/gad.1376506.

- [28] B. Li, K. Concepcion, X. Meng, i L. Zhang, „Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury”, *Progress in Neurobiology*, t. 159, s. 50–68, grudz. 2017, doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.10.006.
- [29] J. Bielewicz, J. Kurzepa, M. Łagowska-Lenard, i H. Bartosik-Psujek, „[The novel views on the patomechanism of ischemic stroke]”, *Wiad Lek*, t. 63, nr 3, Art. nr 3, sty. 2010.
- [30] C. A. Dorrepaal *i in.*, „Oxidative Stress during Post-Hypoxic-Ischemic Reperfusion in the Newborn Lamb: The Effect of Nitric Oxide Synthesis Inhibition”, *Pediatr Res*, t. 41, nr 3, Art. nr 3, mar. 1997, doi: 10.1203/00006450-199703000-00003.
- [31] T. N. Raju, „Okoloporodowa encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna”, w *Neonatologia*, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, 2000.
- [32] A. L. Solevåg, G. M. Schmölder, i P.-Y. Cheung, „Novel interventions to reduce oxidative-stress related brain injury in neonatal asphyxia”, *Free Radical Biology and Medicine*, t. 142, s. 113–122, paź. 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.028.
- [33] T. Zalewska, J. Jaworska, i M. Ziemka-Nalecz, „Current and Experimental Pharmacological Approaches in Neonatal Hypoxic- Ischemic Encephalopathy”, *Current Pharmaceutical Design*, t. 21, nr 11, Art. nr 11, kwi. 2015.
- [34] X. Shi *i in.*, „Stroke subtype-dependent synapse elimination by reactive gliosis in mice”, *Nat Commun*, t. 12, nr 1, s. 6943, lis. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-27248-x.
- [35] E.-A. Ling i W.-C. Wong, „The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: A historical review and current concepts”, *Glia*, t. 7, nr 1, Art. nr 1, 1993, doi: 10.1002/glia.440070105.
- [36] F. Ginhoux i M. Prinz, „Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, t. 7, nr 8, Art. nr 8, sty. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a020537.
- [37] T. L. Tay, J. C. Savage, C. W. Hui, K. Bisht, i M.-È. Tremblay, „Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition”, *The Journal of Physiology*, t. 595, nr 6, Art. nr 6, 2017, doi: 10.1113/JP272134.

- [38] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, i F. Helmchen, „Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo”, *Science*, t. 308, nr 5726, Art. nr 5726, maj 2005, doi: 10.1126/science.1110647.
- [39] Y. Fan, Z. Chen, J. L. Pathak, A. M. D. Carneiro, i C. Y. Chung, „Differential Regulation of Adhesion and Phagocytosis of Resting and Activated Microglia by Dopamine”, *Front. Cell. Neurosci.*, t. 12, wrz. 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00309.
- [40] J. K. Olson i S. D. Miller, „Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs1”, *The Journal of Immunology*, t. 173, nr 6, Art. nr 6, wrz. 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3916.
- [41] C. Marinelli *i in.*, „Ligand engagement of Toll-like receptors regulates their expression in cortical microglia and astrocytes”, *J Neuroinflammation*, t. 12, nr 1, Art. nr 1, grudz. 2015, doi: 10.1186/s12974-015-0458-6.
- [42] B. L. Fiebich, C. R. A. Batista, S. W. Saliba, N. M. Yousif, i A. C. P. de Oliveira, „Role of Microglia TLRs in Neurodegeneration”, *Front. Cell. Neurosci.*, t. 12, paź. 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00329.
- [43] M. Hedtjärn, C. Mallard, P. Arvidsson, i H. Hagberg, „White matter injury in the immature brain: role of interleukin-18”, *Neuroscience Letters*, t. 373, nr 1, Art. nr 1, grudz. 2004, doi: 10.1016/j.neulet.2004.09.062.
- [44] S. M. Allan, P. J. Tyrrell, i N. J. Rothwell, „Interleukin-1 and neuronal injury”, *Nat Rev Immunol*, t. 5, nr 8, Art. nr 8, sie. 2005, doi: 10.1038/nri1664.
- [45] H. Hagberg *i in.*, „Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats”, *Pediatr Res*, t. 40, nr 4, s. 603–609, paź. 1996, doi: 10.1203/00006450-199610000-00015.
- [46] Y. Deng, J. Lu, V. Sivakumar, E. A. Ling, i C. Kaur, „Amoeboid Microglia in the Periventricular White Matter Induce Oligodendrocyte Damage through Expression of Proinflammatory Cytokines via MAP Kinase Signaling Pathway in Hypoxic Neonatal Rats”, *Brain Pathology*, t. 18, nr 3, Art. nr 3, 2008, doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00138.x.

- [47] Y. Y. Deng, J. Lu, E.-A. Ling, i C. Kaur, „Microglia-Derived Macrophage Colony Stimulating Factor Promotes Generation of Proinflammatory Cytokines by Astrocytes in the Periventricular White Matter in the Hypoxic Neonatal Brain”, *Brain Pathology*, t. 20, nr 5, Art. nr 5, 2010, doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00387.x.
- [48] D. M. Ferriero, D. M. Holtzman, S. M. Black, i R. A. Sheldon, „Neonatal Mice Lacking Neuronal Nitric Oxide Synthase Are Less Vulnerable to Hypoxic–Ischemic Injury”, *Neurobiology of Disease*, t. 3, nr 1, Art. nr 1, luty 1996, doi: 10.1006/nbdi.1996.0006.
- [49] C. Iadecola, „Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury”, *Trends Neurosci*, t. 20, nr 3, s. 132–139, mar. 1997, doi: 10.1016/s0166-2236(96)10074-6.
- [50] D. Doens i P. L. Fernández, „Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer’s disease pathogenesis”, *J Neuroinflammation*, t. 11, nr 1, Art. nr 1, mar. 2014, doi: 10.1186/1742-2094-11-48.
- [51] D. Stempak, J. Gammon, J. Klein, G. Koren, i S. Baruchel, „Single-dose and steady-state pharmacokinetics of celecoxib in children”, *Clin Pharmacol Ther*, t. 72, nr 5, s. 490–497, lis. 2002, doi: 10.1067/mcp.2002.129322.
- [52] J. V. Faustino *i in.*, „Microglial Cells Contribute to Endogenous Brain Defenses after Acute Neonatal Focal Stroke”, *J. Neurosci.*, t. 31, nr 36, Art. nr 36, wrz. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2102-11.2011.
- [53] R. M. Ransohoff, „A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?”, *Nat Neurosci*, t. 19, nr 8, Art. nr 8, sie. 2016, doi: 10.1038/nn.4338.
- [54] X. Hu *i in.*, „Microglia/Macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion After Focal Cerebral Ischemia”, *Stroke*, t. 43, nr 11, s. 3063–3070, lis. 2012, doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659656.
- [55] X. Hu *i in.*, „Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair”, *Nat Rev Neurol*, t. 11, nr 1, s. 56–64, sty. 2015, doi: 10.1038/nrneuro.2014.207.

- [56] E. Traiffort, A. Kassoussi, A. Zahaf, i Y. Laouarem, „Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions”, *Front Cell Neurosci*, t. 14, s. 79, kwi. 2020, doi: 10.3389/fncel.2020.00079.
- [57] I. H. Hernández, M. Villa-González, G. Martín, M. Soto, i M. J. Pérez-Álvarez, „Glial Cells as Therapeutic Approaches in Brain Ischemia-Reperfusion Injury”, *Cells*, t. 10, nr 7, s. 1639, cze. 2021, doi: 10.3390/cells10071639.
- [58] R. Shao, D. Sun, Y. Hu, i D. Cui, „White matter injury in the neonatal hypoxic-ischemic brain and potential therapies targeting microglia”, *Journal of Neuroscience Research*, t. 99, nr 4, s. 991–1008, 2021, doi: 10.1002/jnr.24761.
- [59] J. Li i in., „Microglial Phenotypic Transition: Signaling Pathways and Influencing Modulators Involved in Regulation in Central Nervous System Diseases”, *Front. Cell. Neurosci.*, t. 15, wrz. 2021, doi: 10.3389/fncel.2021.736310.
- [60] H. Li i in., „Distinct Polarization Dynamics of Microglia and Infiltrating Macrophages: A Novel Mechanism of Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury”, *JIR*, t. Volume 14, s. 5227–5239, paź. 2021, doi: 10.2147/JIR.S335382.
- [61] M. Lalancette-Hébert, G. Gowing, A. Simard, Y. C. Weng, i J. Kriz, „Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain”, *J Neurosci*, t. 27, nr 10, s. 2596–2605, mar. 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5360-06.2007.
- [62] S. Guo, H. Wang, i Y. Yin, „Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases”, *Front Aging Neurosci*, t. 14, s. 815347, 2022, doi: 10.3389/fnagi.2022.815347.
- [63] R. Orihuela, C. A. McPherson, i G. J. Harry, „Microglial M1/M2 polarization and metabolic states”, *British Journal of Pharmacology*, t. 173, nr 4, Art. nr 4, 2016, doi: 10.1111/bph.13139.
- [64] Y. Tang i W. Le, „Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases”, *Mol Neurobiol*, t. 53, nr 2, Art. nr 2, mar. 2016, doi: 10.1007/s12035-014-9070-5.

- [65] A. Cianciulli, R. Calvello, C. Porro, T. Trotta, R. Salvatore, i M. A. Panaro, „PI3k/Akt signalling pathway plays a crucial role in the anti-inflammatory effects of curcumin in LPS-activated microglia”, *Int Immunopharmacol*, t. 36, s. 282–290, lip. 2016, doi: 10.1016/j.intimp.2016.05.007.
- [66] E. Chu, R. Mychasiuk, M. L. Hibbs, i B. D. Semple, „Dysregulated phosphoinositide 3-kinase signaling in microglia: shaping chronic neuroinflammation”, *J Neuroinflammation*, t. 18, nr 1, s. 276, lis. 2021, doi: 10.1186/s12974-021-02325-6.
- [67] B. D. Manning i L. C. Cantley, „AKT/PKB signaling: navigating downstream”, *Cell*, t. 129, nr 7, s. 1261–1274, cze. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- [68] N. K. El-Deeb, D. M. El-Tanbouly, M. A. Khattab, M. F. El-Yamany, i A. F. Mohamed, „Crosstalk between PI3K/AKT/KLF4 signaling and microglia M1/M2 polarization as a novel mechanistic approach towards flibanserin repositioning in parkinson’s disease”, *Int Immunopharmacol*, t. 112, s. 109191, lis. 2022, doi: 10.1016/j.intimp.2022.109191.
- [69] K. Li, M. Lu, M. Cui, X. Wang, i Y. Zheng, „The Notch pathway regulates autophagy after hypoxic–ischemic injury and affects synaptic plasticity”, *Brain Struct Funct*, t. 228, nr 3, s. 985–996, maj 2023, doi: 10.1007/s00429-023-02639-6.
- [70] Y. Hu, P. Zhang, i X. Wang, „Berberine Exerts Neuroprotective Effects in Alzheimer’s Disease by Switching Microglia M1/M2 Polarization Through PI3K-AKT Signaling”, *Physiol Res*, t. 74, nr 1, s. 129–140, mar. 2025, doi: 10.33549/physiolres.935410.
- [71] Y. D. Shaul i R. Seger, „The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, t. 1773, nr 8, s. 1213–1226, sie. 2007, doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.10.005.
- [72] Y. Keshet i R. Seger, „The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions”, *Methods Mol Biol*, t. 661, s. 3–38, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-795-2_1.
- [73] L. Minutoli *i in.*, „Evidence for a role of mitogen-activated protein kinase 3/mitogen-activated protein kinase in the development of testicular ischemia-reperfusion injury”, *Biol Reprod*, t. 73, nr 4, s. 730–736, paź. 2005, doi: 10.1095/biolreprod.105.040741.

- [74] L. Wang *i in.*, „Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration”, *J Neurosci*, t. 26, nr 22, s. 5996–6003, maj 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5380-05.2006.
- [75] Z. Zuo, Y. Wang, i Y. Huang, „Isoflurane preconditioning protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against in vitro simulated ischemia-reperfusion through the activation of extracellular signal-regulated kinases pathway”, *Eur J Pharmacol*, t. 542, nr 1–3, s. 84–91, sie. 2006, doi: 10.1016/j.ejphar.2006.05.027.
- [76] T. Kong, M. Liu, B. Ji, B. Bai, B. Cheng, i C. Wang, „Role of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway in Ischemia-Reperfusion Injury”, *Front. Physiol.*, t. 10, sie. 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.01038.
- [77] S. Huang *i in.*, „BK Channel-Mediated Microglial Phagocytosis Alleviates Neurological Deficit After Ischemic Stroke”, *Front. Cell. Neurosci.*, t. 15, lip. 2021, doi: 10.3389/fncel.2021.683769.
- [78] Z. Yu *i in.*, „Icaritin inhibits neuroinflammation in a rat cerebral ischemia model by regulating microglial polarization through the GPER–ERK–NF- κ B signaling pathway”, *Molecular Medicine*, t. 28, nr 1, s. 142, lis. 2022, doi: 10.1186/s10020-022-00573-7.
- [79] A. McRae, E. Gilland, E. Bona, i H. Hagberg, „Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia”, *Developmental Brain Research*, t. 84, nr 2, s. 245–252, luty 1995, doi: 10.1016/0165-3806(94)00177-2.
- [80] F. Liu i L. D. McCullough, „Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy”, *Acta Pharmacol Sin*, t. 34, nr 9, s. 1121–1130, wrz. 2013, doi: 10.1038/aps.2013.89.
- [81] A. Alawieh, A. Elvington, i S. Tomlinson, „Complement in the Homeostatic and Ischemic Brain”, *Front Immunol*, t. 6, s. 417, sie. 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00417.
- [82] F. Orsini, D. De Blasio, R. Zangari, E. R. Zanier, i M.-G. De Simoni, „Versatility of the complement system in neuroinflammation, neurodegeneration and brain homeostasis”, *Front. Cell. Neurosci.*, t. 8, lis. 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00380.

- [83] P. L. McGeer, M. Lee, i E. G. McGeer, „A review of human diseases caused or exacerbated by aberrant complement activation”, *Neurobiology of Aging*, t. 52, s. 12–22, kwi. 2017, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.017.
- [84] C. L. Harris, R. B. Pouw, D. Kavanagh, R. Sun, i D. Ricklin, „Developments in anti-complement therapy; from disease to clinical trial”, *Molecular Immunology*, t. 102, s. 89–119, paź. 2018, doi: 10.1016/j.molimm.2018.06.008.
- [85] H. Rus, C. Cudrici, S. David, i F. Niculescu, „The complement system in central nervous system diseases”, *Autoimmunity*, t. 39, nr 5, s. 395–402, sty. 2006, doi: 10.1080/08916930600739605.
- [86] A. Thomas, P. Gasque, D. Vaudry, B. Gonzalez, i M. Fontaine, „Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro”, *International Immunology*, t. 12, nr 7, Art. nr 7, lip. 2000, doi: 10.1093/intimm/12.7.1015.
- [87] R. Veerhuis, H. M. Nielsen, i A. J. Tenner, „Complement in the brain”, *Molecular Immunology*, t. 48, nr 14, s. 1592–1603, sie. 2011, doi: 10.1016/j.molimm.2011.04.003.
- [88] R. Veerhuis, I. Janssen, C. J. A. De Groot, F. L. Van Muiswinkel, C. E. Hack, i P. Eikelenboom, „Cytokines Associated with Amyloid Plaques in Alzheimer’s Disease Brain Stimulate Human Glial and Neuronal Cell Cultures to Secrete Early Complement Proteins, But Not C1-Inhibitor”, *Experimental Neurology*, t. 160, nr 1, s. 289–299, lis. 1999, doi: 10.1006/exnr.1999.7199.
- [89] M. R. W. Ehlers, „CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity”, *Microbes and Infection*, t. 2, nr 3, s. 289–294, mar. 2000, doi: 10.1016/S1286-4579(00)00299-9.
- [90] M. K.-H. Schäfer *i in.*, „Complement C1q Is Dramatically Up-Regulated in Brain Microglia in Response to Transient Global Cerebral Ischemia1 2”, *The Journal of Immunology*, t. 164, nr 10, s. 5446–5452, maj 2000, doi: 10.4049/jimmunol.164.10.5446.
- [91] M. Pekny, U. Wilhelmsson, Y. R. Bogestål, i M. Pekna, „The Role of Astrocytes and Complement System in Neural Plasticity”, w *International Review of Neurobiology*, t.

- 82, w *Neuroinflammation in Neuronal Death and Repair*, vol. 82. , Academic Press, 2007, s. 95–111. doi: 10.1016/S0074-7742(07)82005-8.
- [92] D. G. Walker, S. U. Kim, i P. L. McGeer, „Expression of complement C4 and C9 genes by human astrocytes”, *Brain Research*, t. 809, nr 1, s. 31–38, paź. 1998, doi: 10.1016/S0006-8993(98)00811-7.
- [93] Y. Shen, R. Li, E. G. McGeer, i P. L. McGeer, „Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain”, *Brain Research*, t. 769, nr 2, s. 391–395, wrz. 1997, doi: 10.1016/S0006-8993(97)00850-0.
- [94] N. Davoust, J. Jones, P. F. Stahel, R. S. Ames, i S. R. Barnum, „Receptor for the C3a anaphylatoxin is expressed by neurons and glial cells”, *Glia*, t. 26, nr 3, s. 201–211, maj 1999, doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199905)26:3<201::aid-glia2>3.0.co;2-m.
- [95] S. A. O’Barr *i in.*, „Neuronal Expression of a Functional Receptor for the C5a Complement Activation Fragment1”, *The Journal of Immunology*, t. 166, nr 6, s. 4154–4162, mar. 2001, doi: 10.4049/jimmunol.166.6.4154.
- [96] L. G. Coulthard, O. A. Hawksworth, i T. M. Woodruff, „Complement: The Emerging Architect of the Developing Brain”, *Trends in Neurosciences*, t. 41, nr 6, s. 373–384, cze. 2018, doi: 10.1016/j.tins.2018.03.009.
- [97] J. D. Lee, L. G. Coulthard, i T. M. Woodruff, „Complement dysregulation in the central nervous system during development and disease”, *Seminars in Immunology*, t. 45, s. 101340, paź. 2019, doi: 10.1016/j.smim.2019.101340.
- [98] R. Paolicelli i C. Gross, „Microglia in development: Linking brain wiring to brain environment”, *Neuron glia biology*, t. 7, s. 77–83, luty 2011, doi: 10.1017/S1740925X12000105.
- [99] I. Michailidou *i in.*, „Systemic inhibition of the membrane attack complex impedes neuroinflammation in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Acta Neuropathol Commun*, t. 6, s. 36, maj 2018, doi: 10.1186/s40478-018-0536-y.
- [100] T. R. Hammond, S. E. Marsh, i B. Stevens, „Immune Signaling in Neurodegeneration”, *Immunity*, t. 50, nr 4, s. 955–974, kwi. 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.016.

- [101] A. Alawieh, E. F. Langley, i S. Tomlinson, „Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice”, *Sci Transl Med*, t. 10, nr 441, s. eaao6459, maj 2018, doi: 10.1126/scitranslmed.aa06459.
- [102] A. M. Alawieh, E. F. Langley, W. Feng, A. M. Spiotta, i S. Tomlinson, „Complement-Dependent Synaptic Uptake and Cognitive Decline after Stroke and Reperfusion Therapy”, *J. Neurosci.*, t. 40, nr 20, s. 4042–4058, maj 2020, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2462-19.2020.
- [103] D. Ricklin i R. B. Pouw, „Complement & disease: out of the shadow into the spotlight”, *Semin Immunopathol*, t. 43, nr 6, s. 755–756, 2021, doi: 10.1007/s00281-021-00897-2.
- [104] R. M. Cowell, J. M. Plane, i F. S. Silverstein, „Complement Activation Contributes to Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats”, *J Neurosci*, t. 23, nr 28, s. 9459–9468, paź. 2003, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-28-09459.2003.
- [105] S. J. Schultz *i in.*, „Complement component 9 activation, consumption, and neuronal deposition in the post-hypoxic–ischemic central nervous system of human newborn infants”, *Neuroscience Letters*, t. 378, nr 1, s. 1–6, kwi. 2005, doi: 10.1016/j.neulet.2004.12.008.
- [106] H. Aly *i in.*, „The Role of Complement in Neurodevelopmental Impairment following Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy”, *Am J Perinatol*, t. 26, nr 09, s. 659–665, paź. 2009, doi: 10.1055/s-0029-1220793.
- [107] E. Figueroa, L. E. Gordon, P. W. Feldhoff, i H. A. Lassiter, „The administration of cobra venom factor reduces post-ischemic cerebral injury in adult and neonatal rats”, *Neurosci Lett*, t. 380, nr 1–2, s. 48–53, maj 2005, doi: 10.1016/j.neulet.2005.01.027.
- [108] V. S. Ten *i in.*, „C1q-Deficiency Is Neuroprotective Against Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Mice”, *Stroke*, t. 36, nr 10, s. 2244–2250, paź. 2005, doi: 10.1161/01.STR.0000182237.20807.d0.
- [109] K. Järlestedt *i in.*, „Receptor for complement peptide C3a: a therapeutic target for neonatal hypoxic-ischemic brain injury”, *The FASEB Journal*, t. 27, nr 9, s. 3797–3804, 2013, doi: 10.1096/fj.13-230011.

- [110] J. Morán, A. Stokowska, F. R. Walker, C. Mallard, H. Hagberg, i M. Pekna, „Intranasal C3a treatment ameliorates cognitive impairment in a mouse model of neonatal hypoxic–ischemic brain injury”, *Experimental Neurology*, t. 290, s. 74–84, kwi. 2017, doi: 10.1016/j.expneurol.2017.01.001.
- [111] A. Pozo-Rodrigálvarez *i in.*, „C3a Receptor Signaling Inhibits Neurodegeneration Induced by Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury”, *Front Immunol*, t. 12, s. 768198, grudz. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.768198.
- [112] T. A. Shah *i in.*, „Therapeutic hypothermia modulates complement factor C3a and C5a levels in a rat model of hypoxic ischemic encephalopathy”, *Pediatr Res*, t. 81, nr 4, s. 654–662, kwi. 2017, doi: 10.1038/pr.2016.271.
- [113] M. D. Imm, P. W. Feldhoff, R. C. Feldhoff, i H. A. Lassiter, „The administration of complement component C9 augments post-ischemic cerebral infarction volume in neonatal rats”, *Neuroscience Letters*, t. 325, nr 3, s. 175–178, cze. 2002, doi: 10.1016/S0304-3940(02)00271-9.
- [114] K. Ziabska, M. Gewartowska, M. Frontczak-Baniewicz, J. Sypecka, i M. Ziemka-Nalecz, „The Impact of the Histone Deacetylase Inhibitor-Sodium Butyrate on Complement-Mediated Synapse Loss in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia”, *Mol Neurobiol*, t. 62, nr 4, Art. nr 4, kwi. 2025, doi: 10.1007/s12035-024-04591-w.
- [115] M. M. Laughon *i in.*, „Drug Labeling and Exposure in Neonates”, *JAMA Pediatrics*, t. 168, nr 2, Art. nr 2, luty 2014, doi: 10.1001/jamapediatrics.2013.4208.
- [116] R. Bracci, S. Perrone, i G. Buonocore, „The Timing of Neonatal Brain Damage”, *Biology of the Neonate*, t. 90, nr 3, Art. nr 3, wrz. 2006, doi: 10.1159/000092517.
- [117] P. P. Drury, E. R. Gunn, L. Bennet, i A. J. Gunn, „Mechanisms of Hypothermic Neuroprotection”, *Clinics in Perinatology*, t. 41, nr 1, Art. nr 1, mar. 2014, doi: 10.1016/j.clp.2013.10.005.
- [118] P. D. Gluckman *i in.*, „Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial”, *The Lancet*, t. 365, nr 9460, Art. nr 9460, luty 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)17946-X.

- [119] S. Shankaran *i in.*, „Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic–Ischemic Encephalopathy”, *New England Journal of Medicine*, t. 353, nr 15, Art. nr 15, paź. 2005, doi: 10.1056/NEJMcps050929.
- [120] M. Thoresen *i in.*, „Mild Hypothermia after Severe Transient Hypoxia-Ischemia Ameliorates Delayed Cerebral Energy Failure in the Newborn Piglet”, *Pediatr Res*, t. 37, nr 5, Art. nr 5, maj 1995, doi: 10.1203/00006450-199505000-00019.
- [121] A. J. Gunn, T. R. Gunn, H. H. de Haan, C. E. Williams, i P. D. Gluckman, „Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs.”, *J Clin Invest*, t. 99, nr 2, Art. nr 2, sty. 1997, doi: 10.1172/JCI119153.
- [122] E. Bona, H. Hagberg, E. M. Løberg, R. Bågenholm, i M. Thoresen, „Protective Effects of Moderate Hypothermia after Neonatal Hypoxia-Ischemia: Short- and Long-Term Outcome”, *Pediatr Res*, t. 43, nr 6, Art. nr 6, cze. 1998, doi: 10.1203/00006450-199806000-00005.
- [123] A. J. Gunn, L. Bennet, M. I. Gunning, P. D. Gluckman, i T. R. Gunn, „Cerebral Hypothermia Is Not Neuroprotective When Started after Postischemic Seizures in Fetal Sheep”, *Pediatr Res*, t. 46, nr 3, Art. nr 3, wrz. 1999, doi: 10.1203/00006450-199909000-00005.
- [124] J. R. Tooley, S. Satas, H. Porter, I. A. Silver, i M. Thoresen, „Head cooling with mild systemic hypothermia in anesthetized piglets is neuroprotective”, *Annals of Neurology*, t. 53, nr 1, Art. nr 1, 2003, doi: 10.1002/ana.10402.
- [125] B. Grass *i in.*, „Therapeutic hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy after perinatal sentinel events: less brain injury on MRI and improved neurodevelopmental outcome at 18–36 months”, *J Perinatol*, t. 40, nr 4, Art. nr 4, kwi. 2020, doi: 10.1038/s41372-020-0602-8.
- [126] A. D. Edwards *i in.*, „Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data”, *BMJ*, t. 340, s. c363, luty 2010, doi: 10.1136/bmj.c363.
- [127] A. G. Demtse *i in.*, „Hypothermia in Preterm Newborns: Impact on Survival”, *Global Pediatric Health*, wrz. 2020, doi: 10.1177/2333794X20957655.

- [128] K. V. Annink *i in.*, „Mammillary body atrophy and other MRI correlates of school-age outcome following neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy”, *Sci Rep*, t. 11, nr 1, Art. nr 1, mar. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83982-8.
- [129] „Search for: Hypoxic-Ischemic Encephalopathy | List Results | ClinicalTrials.gov”. [Online]. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/search?cond=Hypoxic-Ischemic%20Encephalopathy&viewType=Table#classicRedirect>. Dostęp: 27 marzec 2025.
- [130] Y.-J. Min, E.-A. Ling, i F. Li, „Immunomodulatory Mechanism and Potential Therapies for Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage”, *Front. Pharmacol.*, t. 11, grudz. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.580428.
- [131] J. Janowska i J. Sypecka, „Therapeutic Strategies for Leukodystrophic Disorders Resulting from Perinatal Asphyxia: Focus on Myelinating Oligodendrocytes”, *Mol Neurobiol*, t. 55, nr 5, s. 4388–4402, maj 2018, doi: 10.1007/s12035-017-0647-7.
- [132] J. Nair i V. H. S. Kumar, „Current and Emerging Therapies in the Management of Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates”, *Children (Basel)*, t. 5, nr 7, s. 99, lip. 2018, doi: 10.3390/children5070099.
- [133] J. Paprocka, M. Kijonka, B. Rzepka, i M. Sokół, „Melatonin in Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Term and Preterm Babies”, *International Journal of Endocrinology*, t. 2019, nr 1, s. 9626715, 2019, doi: 10.1155/2019/9626715.
- [134] A. Frajewicki *i in.*, „Perinatal hypoxic-ischemic damage: review of the current treatment possibilities”, *Physiol Res*, t. 69, nr Suppl 3, s. S379–S401, grudz. 2020, doi: 10.33549/physiolres.934595.
- [135] S. G. Kersin i E. Özek, „Breast milk stem cells: Are they magic bullets in neonatology?”, *Turk Arch Pediatr*, t. 56, nr 3, Art. nr 3, maj 2021, doi: 10.5152/TurkArchPediatr.2021.21006.
- [136] V. Donega, C. H. Nijboer, G. van Tilborg, R. M. Dijkhuizen, A. Kavelaars, i C. J. Heijnen, „Intranasally administered mesenchymal stem cells promote a regenerative niche for repair of neonatal ischemic brain injury”, *Experimental Neurology*, t. 261, s. 53–64, lis. 2014, doi: 10.1016/j.expneurol.2014.06.009.

- [137] C. A. McDonald *i in.*, „Effects of umbilical cord blood cells, and subtypes, to reduce neuroinflammation following perinatal hypoxic-ischemic brain injury”, *J Neuroinflammation*, t. 15, nr 1, Art. nr 1, luty 2018, doi: 10.1186/s12974-018-1089-5.
- [138] I. Serrenho *i in.*, „Stem Cell Therapy for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Systematic Review of Preclinical Studies”, *International Journal of Molecular Sciences*, t. 22, nr 6, Art. nr 6, sty. 2021, doi: 10.3390/ijms22063142.
- [139] H. J. Kim, M. Rowe, M. Ren, J.-S. Hong, P.-S. Chen, i D.-M. Chuang, „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*, t. 321, nr 3, s. 892–901, cze. 2007, doi: 10.1124/jpet.107.120188.
- [140] B. Fleiss, M. K. Nilsson, K. Blomgren, i C. Mallard, „Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitised neonatal hypoxic-ischaemic brain injury”, *J Neuroinflammation*, t. 9, nr 1, Art. nr 1, kwi. 2012, doi: 10.1186/1742-2094-9-70.
- [141] B. Kim *i in.*, „Evaluation of class I HDAC isoform selectivity of largazole analogues”, *Bioorg Med Chem Lett*, t. 24, nr 16, s. 3728–3731, sie. 2014, doi: 10.1016/j.bmcl.2014.07.006.
- [142] R. J. Ferrante *i in.*, „Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington’s disease mice”, *J Neurosci*, t. 23, nr 28, s. 9418–9427, paź. 2003, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-28-09418.2003.
- [143] G. Du i R. and Jiao, „To prevent neurodegeneration: HDAC6 uses different strategies for different challenges”, *Communicative & Integrative Biology*, t. 4, nr 2, Art. nr 2, mar. 2011, doi: 10.4161/cib.4.2.14272.
- [144] J. Gräff *i in.*, „An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain”, *Nature*, t. 483, nr 7388, Art. nr 7388, mar. 2012, doi: 10.1038/nature10849.
- [145] A. Mai *i in.*, „Exploring the connection unit in the HDAC inhibitor pharmacophore model: Novel uracil-based hydroxamates”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, t. 15, nr 21, Art. nr 21, lis. 2005, doi: 10.1016/j.bmcl.2005.07.081.

- [146] R. Singh *i in.*, „HAT and HDAC: Enzyme with Contradictory Action in Neurodegenerative Diseases”, *Mol Neurobiol*, t. 61, nr 11, Art. nr 11, lis. 2024, doi: 10.1007/s12035-024-04115-6.
- [147] R. H. Goodman i S. Smolik, „CBP/p300 in cell growth, transformation, and development”, *Genes Dev.*, t. 14, nr 13, s. 1553–1577, sty. 2000, doi: 10.1101/gad.14.13.1553.
- [148] A. J. M. de Ruijter, A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp, i A. B. P. van Kuilenburg, „Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family”, *Biochem J*, t. 370, nr Pt 3, s. 737–749, mar. 2003, doi: 10.1042/BJ20021321.
- [149] C. Mercurio, S. Minucci, i P. G. Pelicci, „Histone deacetylases and epigenetic therapies of hematological malignancies”, *Pharmacol Res*, t. 62, nr 1, s. 18–34, lip. 2010, doi: 10.1016/j.phrs.2010.02.010.
- [150] J. A. Baur, Z. Ungvari, R. K. Minor, D. G. Le Couteur, i R. de Cabo, „Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan?”, *Nat Rev Drug Discov*, t. 11, nr 6, s. 443–461, cze. 2012, doi: 10.1038/nrd3738.
- [151] M. W. Akhtar *i in.*, „Histone Deacetylases 1 and 2 Form a Developmental Switch That Controls Excitatory Synapse Maturation and Function”, *J Neurosci*, t. 29, nr 25, s. 8288–8297, cze. 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0097-09.2009.
- [152] X. S. Liu *i in.*, „Valproic acid increases white matter repair and neurogenesis after stroke”, *Neuroscience*, t. 220, s. 313–321, wrz. 2012, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.012.
- [153] O. H. Krämer, M. Göttlicher, i T. Heinzel, „Histone deacetylase as a therapeutic target”, *Trends Endocrinol Metab*, t. 12, nr 7, s. 294–300, wrz. 2001, doi: 10.1016/s1043-2760(01)00438-6.
- [154] W. S. Xu, R. B. Parmigiani, i P. A. Marks, „Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action”, *Oncogene*, t. 26, nr 37, s. 5541–5552, sie. 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210620.

- [155] B. Langley *i in.*, „Pulse inhibition of histone deacetylases induces complete resistance to oxidative death in cortical neurons without toxicity and reveals a role for cytoplasmic p21(waf1/cip1) in cell cycle-independent neuroprotection”, *J Neurosci*, t. 28, nr 1, s. 163–176, sty. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3200-07.2008.
- [156] S. P. Murphy *i in.*, „MS-275, a class I histone deacetylase inhibitor, protects the p53-deficient mouse against ischemic injury”, *J Neurochem*, t. 129, nr 3, s. 509–515, maj 2014, doi: 10.1111/jnc.12498.
- [157] S. Y. Archer i R. A. Hodin, „Histone acetylation and cancer”, *Curr Opin Genet Dev*, t. 9, nr 2, s. 171–174, kwi. 1999, doi: 10.1016/s0959-437x(99)80026-4.
- [158] T. Chen *i in.*, „Histone acetylation is involved in hsp70 gene transcription regulation in *Drosophila melanogaster*”, *Arch Biochem Biophys*, t. 408, nr 2, s. 171–176, grudz. 2002, doi: 10.1016/s0003-9861(02)00564-7.
- [159] M. Ren, Y. Leng, M. Jeong, P. R. Leeds, i D.-M. Chuang, „Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction”, *Journal of Neurochemistry*, t. 89, nr 6, s. 1358–1367, 2004, doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02406.x.
- [160] H. M. Emrich, D. v. Zerssen, W. Kissling, H.-J. Möller, i A. Windorfer, „Effect of sodium valproate on mania”, *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, t. 229, nr 1, s. 1–16, paź. 1980, doi: 10.1007/BF00343800.
- [161] H. J. Kim, P. Leeds, i D.-M. Chuang, „The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain”, *J Neurochem*, t. 110, nr 4, s. 1226–1240, sie. 2009, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06212.x.
- [162] Z. Wang *i in.*, „Chronic Valproate Treatment Enhances Post-ischemic Angiogenesis and Promotes Functional Recovery in a Rat Model of Ischemic Stroke”, *Stroke*, t. 43, nr 9, s. 2430–2436, wrz. 2012, doi: 10.1161/STROKEAHA.112.652545.
- [163] Z. Zheng i M. A. Yenari, „Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications”, *Neurol Res*, t. 26, nr 8, s. 884–892, grudz. 2004, doi: 10.1179/016164104X2357.

- [164] A. Liesz *i in.*, „Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke”, *J Neurosci*, t. 33, nr 44, s. 17350–17362, paź. 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4901-12.2013.
- [165] J. Jaworska, M. Ziemka-Nalecz, J. Sypecka, i T. Zalewska, „The potential neuroprotective role of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, after neonatal hypoxia-ischemia”, *J Neuroinflammation*, t. 14, s. 34, luty 2017, doi: 10.1186/s12974-017-0807-8.
- [166] G. Faraco *i in.*, „Histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response in vitro and in vivo”, *Neurobiol Dis*, t. 36, nr 2, s. 269–279, lis. 2009, doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.019.
- [167] A. Martín-Montalvo, J. M. Villalba, P. Navas, i R. de Cabo, „NRF2, cancer and calorie restriction”, *Oncogene*, t. 30, nr 5, s. 505–520, luty 2011, doi: 10.1038/onc.2010.492.
- [168] L.-Y. Zhang, S.-Y. Zhang, R. Wen, T.-N. Zhang, i N. Yang, „Role of histone deacetylases and their inhibitors in neurological diseases”, *Pharmacol Res*, t. 208, s. 107410, paź. 2024, doi: 10.1016/j.phrs.2024.107410.
- [169] J. Sun *i in.*, „Neuroprotective Effect of Sodium Butyrate against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice”, *Biomed Res Int*, t. 2015, s. 395895, 2015, doi: 10.1155/2015/395895.
- [170] Z. Zhou *i in.*, „Sodium butyrate attenuated neuronal apoptosis via GPR41/Gβγ/PI3K/Akt pathway after MCAO in rats”, *J Cereb Blood Flow Metab*, t. 41, nr 2, s. 267–281, luty 2021, doi: 10.1177/0271678X20910533.
- [171] B. Langley, C. Brochier, i M. A. Riviuccio, „Targeting Histone Deacetylases as a Multifaceted Approach to Treat the Diverse Outcomes of Stroke”, *Stroke*, t. 40, nr 8, s. 2899–2905, sie. 2009, doi: 10.1161/STROKEAHA.108.540229.
- [172] R. Patnala, T. V. Arumugam, N. Gupta, i S. T. Dheen, „HDAC Inhibitor Sodium Butyrate-Mediated Epigenetic Regulation Enhances Neuroprotective Function of Microglia During Ischemic Stroke”, *Mol Neurobiol*, t. 54, nr 8, s. 6391–6411, paź. 2017, doi: 10.1007/s12035-016-0149-z.

- [173] M. Ziemka-Nalecz, J. Jaworska, J. Sypecka, R. Polowy, R. K. Filipkowski, i T. Zalewska, „Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Exhibits Neuroprotective/Neurogenic Effects in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia”, *Mol Neurobiol*, t. 54, nr 7, s. 5300–5318, 2017, doi: 10.1007/s12035-016-0049-2.
- [174] J. Jaworska, T. Zalewska, J. Sypecka, i M. Ziemka-Nalecz, „Effect of the HDAC Inhibitor, Sodium Butyrate, on Neurogenesis in a Rat Model of Neonatal Hypoxia–Ischemia: Potential Mechanism of Action”, *Mol Neurobiol*, t. 56, nr 9, s. 6341–6370, 2019, doi: 10.1007/s12035-019-1518-1.
- [175] K. Ziabska, J. Gargas, J. Sypecka, i M. Ziemka-Nalecz, „The impact of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate on microglial polarization after oxygen and glucose deprivation”, *Pharmacol. Rep*, t. 74, nr 5, s. 909–919, paź. 2022, doi: 10.1007/s43440-022-00384-x.
- [176] V. Singh, H. S. Bhatia, A. Kumar, A. C. P. de Oliveira, i B. L. Fiebich, „Histone deacetylase inhibitors valproic acid and sodium butyrate enhance prostaglandins release in lipopolysaccharide-activated primary microglia”, *Neuroscience*, t. 265, s. 147–157, kwi. 2014, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.037.
- [177] D. Boche, V. H. Perry, i J. a. R. Nicoll, „Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain”, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, t. 39, nr 1, s. 3–18, 2013, doi: 10.1111/nan.12011.
- [178] C. Capone *i in.*, „Neurosphere-Derived Cells Exert a Neuroprotective Action by Changing the Ischemic Microenvironment”, *PLoS ONE*, t. 2, nr 4, s. e373, kwi. 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000373.
- [179] C. A. Colton, „Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain”, *J Neuroimmune Pharmacol*, t. 4, nr 4, s. 399–418, 2009, doi: 10.1007/s11481-009-9164-4.
- [180] G. Wang *i in.*, „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*, t. 112, nr 9, s. 2853–2858, mar. 2015, doi: 10.1073/pnas.1501441112.

- [181] F. van Bel i F. Groenendaal, „Drugs for neuroprotection after birth asphyxia: Pharmacologic adjuncts to hypothermia”, *Seminars in Perinatology*, t. 40, nr 3, s. 152–159, kwi. 2016, doi: 10.1053/j.semperi.2015.12.003.
- [182] K. H. Cho, J. O. Davidson, J. M. Dean, L. Bennet, i A. J. Gunn, „Cooling and immunomodulation for treating hypoxic-ischemic brain injury”, *Pediatrics International*, t. 62, nr 7, s. 770–778, 2020, doi: 10.1111/ped.14215.
- [183] J. E. Rice, R. C. Vannucci, i J. B. Brierley, „The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat”, *Annals of Neurology*, t. 9, nr 2, s. 131–141, 1981, doi: 10.1002/ana.410090206.
- [184] H. Lui *i in.*, „Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation”, *Cell*, t. 165, nr 4, s. 921–935, maj 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.001.
- [185] A. Vaslin, J. Puyal, T. Borsello, i P. G. H. Clarke, „Excitotoxicity-related endocytosis in cortical neurons”, *Journal of Neurochemistry*, t. 102, nr 3, s. 789–800, 2007, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04564.x.
- [186] V. Ginet *i in.*, „Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death”, *Autophagy*, t. 10, nr 5, s. 846–860, maj 2014, doi: 10.4161/auto.28264.
- [187] K. Ji, G. Akgul, L. P. Wollmuth, i S. E. Tsirka, „Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses”, *PLoS ONE*, t. 8, nr 2, s. e56293, luty 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0056293.
- [188] Y. Chen *i in.*, „Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells”, *Nat Protoc*, t. 2, nr 5, s. 1044–1051, maj 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.149.
- [189] J. Sypecka i A. Sarnowska, „The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells”, *Mol Neurobiol*, t. 49, nr 2, s. 685–701, kwi. 2014, doi: 10.1007/s12035-013-8549-9.
- [190] J. Gargas, J. Janowska, K. Ziabska, M. Ziemka-Nalecz, i J. Sypecka, „Neonatal Rat Glia Cultured in Physiological Normoxia for Modeling Neuropathological Conditions

- In Vitro”, *International Journal of Molecular Sciences*, t. 23, nr 11, Art. nr 11, sty. 2022, doi: 10.3390/ijms23116000.
- [191] M. Erecińska i I. A. Silver, „Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia”, *Respir Physiol*, t. 128, nr 3, s. 263–276, lis. 2001, doi: 10.1016/s0034-5687(01)00306-1.
- [192] D. Fernández-López *i in.*, „Immature rat brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy”, *J Neurosci Methods*, t. 145, nr 1–2, s. 205–212, cze. 2005, doi: 10.1016/j.jneumeth.2005.01.005.
- [193] K. J. Livak i T. D. Schmittgen, „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method”, *Methods*, t. 25, nr 4, s. 402–408, grudz. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [194] H. Lyu *i in.*, „A new Hypoxic Ischemic Encephalopathy model in neonatal rats”, *Heliyon*, t. 7, nr 12, s. e08646, grudz. 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08646.
- [195] X. Chen *i in.*, „Inter-alpha Inhibitor Proteins Ameliorate Brain Injury and Improve Behavioral Outcomes in a Sex-Dependent Manner After Exposure to Neonatal Hypoxia Ischemia in Newborn and Young Adult Rats”, *Neurotherapeutics*, t. 19, nr 2, s. 528–549, mar. 2022, doi: 10.1007/s13311-022-01217-8.
- [196] H. Qiu, T. Qian, T. Wu, T. Gao, Q. Xing, i L. Wang, „Src Family Kinases Inhibition Ameliorates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Immature Rats”, *Front. Cell. Neurosci.*, t. 15, grudz. 2021, doi: 10.3389/fncel.2021.746130.
- [197] W. J. Mack *i in.*, „Temporal pattern of C1q deposition after transient focal cerebral ischemia”, *Journal of Neuroscience Research*, t. 83, nr 5, s. 883–889, 2006, doi: 10.1002/jnr.20775.
- [198] J. Mocco *i in.*, „Complement Component C3 Mediates Inflammatory Injury Following Focal Cerebral Ischemia”, *Circulation Research*, t. 99, nr 2, s. 209–217, lip. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000232544.90675.42.

- [199] L. A. Devlin, M.-D. T. Nguyen, E. Figueroa, L. E. Gordon, P. W. Feldhoff, i H. A. Lassiter, „Effects of endotoxin administration and cerebral hypoxia-ischemia on complement activity and local transcriptional regulation in neonatal rats”, *Neuroscience Letters*, t. 390, nr 2, s. 109–113, grudz. 2005, doi: 10.1016/j.neulet.2005.08.005.
- [200] X. Chu *i in.*, „Hydrogen-rich saline promotes microglia M2 polarization and complement-mediated synapse loss to restore behavioral deficits following hypoxia-ischemic in neonatal mice via AMPK activation”, *J Neuroinflammation*, t. 16, s. 104, maj 2019, doi: 10.1186/s12974-019-1488-2.
- [201] E. D. Pedersen, U, C. A. VEDELER, G. AAMODT, i T. E. MOLLNES, „Systemic complement activation following human acute ischaemic stroke”, *Clin Exp Immunol*, t. 137, nr 1, s. 117–122, lip. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02489.x.
- [202] G. Széplaki *i in.*, „Strong complement activation after acute ischemic stroke is associated with unfavorable outcomes”, *Atherosclerosis*, t. 204, nr 1, Art. nr 1, maj 2009, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.044.
- [203] T. Shah, H. Pallera, C. Kaszowski, W. Bass, i F. Lattanzio, „Therapeutic Hypothermia Inhibits the Classical Complement Pathway in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy”, *Frontiers in Neuroscience*, t. 15, s. 616734, luty 2021, doi: 10.3389/fnins.2021.616734.
- [204] J. Van Beek *i in.*, „Expression of Receptors for Complement Anaphylatoxins C3a and C5a Following Permanent Focal Cerebral Ischemia in the Mouse”, *Experimental Neurology*, t. 161, nr 1, s. 373–382, sty. 2000, doi: 10.1006/exnr.1999.7273.
- [205] S. R. Barnum *i in.*, „Expression of the complement C3a and C5a receptors after permanent focal ischemia: An alternative interpretation”, *Glia*, t. 38, nr 2, s. 169–173, 2002, doi: 10.1002/glia.10069.
- [206] S. Ahmad, K. Bhatia, A. Kindelin, i A. F. Ducruet, „The Role of Complement C3a Receptor in Stroke”, *Neuromol Med*, t. 21, nr 4, s. 467–473, grudz. 2019, doi: 10.1007/s12017-019-08545-7.

- [207] A. F. Ducruet *i in.*, „C3a Receptor Modulation of Granulocyte Infiltration after Murine Focal Cerebral Ischemia is Reperfusion Dependent”, *J Cereb Blood Flow Metab*, t. 28, nr 5, s. 1048–1058, maj 2008, doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600608.
- [208] A. Stokowska *i in.*, „Complement peptide C3a stimulates neural plasticity after experimental brain ischaemia”, *Brain: a journal of neurology*, t. 140, nr 2, s. 353–369, luty 2017, doi: 10.1093/brain/aww314.
- [209] T. V. Arumugam *i in.*, „Intravenous immunoglobulin (IVIg) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 104, nr 35, s. 14104–14109, sie. 2007, doi: 10.1073/pnas.0700506104.
- [210] C. Costa *i in.*, „Role of complement component C5 in cerebral ischemia/reperfusion injury”, *Brain Research*, t. 1100, nr 1, s. 142–151, lip. 2006, doi: 10.1016/j.brainres.2006.05.029.
- [211] D. Pavlovski, J. Thundyil, P. N. Monk, R. A. Wetsel, S. M. Taylor, i T. M. Woodruff, „Generation of complement component C5a by ischemic neurons promotes neuronal apoptosis”, *The FASEB Journal*, t. 26, nr 9, s. 3680–3690, 2012, doi: 10.1096/fj.11-202382.
- [212] S. O’Barr i N. R. Cooper, „The C5a complement activation peptide increases IL-1 β and IL-6 release from amyloid- β primed human monocytes: implications for Alzheimer’s disease”, *Journal of Neuroimmunology*, t. 109, nr 2, s. 87–94, wrz. 2000, doi: 10.1016/S0165-5728(00)00291-5.
- [213] F. H. Brennan *i in.*, „The Complement Receptor C5aR Controls Acute Inflammation and Astroglia following Spinal Cord Injury”, *J Neurosci*, t. 35, nr 16, s. 6517–6531, kwi. 2015, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5218-14.2015.
- [214] F. Valtorta, M. Pennuto, D. Bonanomi, i F. Benfenati, „Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis?”, *BioEssays*, t. 26, nr 4, s. 445–453, 2004, doi: 10.1002/bies.20012.
- [215] F. Longhena, G. Faustini, V. Brembati, M. Pizzi, F. Benfenati, i A. Bellucci, „An updated reappraisal of synapsins: structure, function and role in neurological and

- psychiatric disorders”, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, t. 130, s. 33–60, lis. 2021, doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.08.011.
- [216] A. E. El-Husseini, E. Schnell, D. M. Chetkovich, R. A. Nicoll, i D. S. Brecht, „PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses”, *Science*, t. 290, nr 5495, s. 1364–1368, lis. 2000.
- [217] G. M. Elias, L. Funke, V. Stein, S. G. Grant, D. S. Brecht, i R. A. Nicoll, „Synapse-Specific and Developmentally Regulated Targeting of AMPA Receptors by a Family of MAGUK Scaffolding Proteins”, *Neuron*, t. 52, nr 2, s. 307–320, paź. 2006, doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.012.
- [218] T. J. Ryan i S. G. N. Grant, „The origin and evolution of synapses”, *Nat Rev Neurosci*, t. 10, nr 10, s. 701–712, paź. 2009, doi: 10.1038/nrn2717.
- [219] A. Mottahedin, M. Ardalan, T. Chumak, I. Riebe, J. Ek, i C. Mallard, „Effect of Neuroinflammation on Synaptic Organization and Function in the Developing Brain: Implications for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders”, *Front Cell Neurosci*, t. 11, s. 190, lip. 2017, doi: 10.3389/fncel.2017.00190.
- [220] N. Liu, X. Tong, W. Huang, J. Fu, i X. Xue, „Synaptic Injury in the Thalamus Accompanies White Matter Injury in Hypoxia/Ischemia-Mediated Brain Injury in Neonatal Rats”, *Biomed Res Int*, t. 2019, s. 5249675, paź. 2019, doi: 10.1155/2019/5249675.
- [221] Y. K. Dhuriya i D. Sharma, „Neuronal Plasticity: Neuronal Organization is Associated with Neurological Disorders”, *J Mol Neurosci*, t. 70, nr 11, s. 1684–1701, lis. 2020, doi: 10.1007/s12031-020-01555-2.
- [222] M. K. Hogan, G. F. Hamilton, i P. J. Horner, „Neural Stimulation and Molecular Mechanisms of Plasticity and Regeneration: A Review”, *Front. Cell. Neurosci.*, t. 14, paź. 2020, doi: 10.3389/fncel.2020.00271.
- [223] A. Lubics *i in.*, „Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic–ischemic injury”, *Behavioural Brain Research*, t. 157, nr 1, Art. nr 1, luty 2005, doi: 10.1016/j.bbr.2004.06.019.

- [224] P. Kiss *i in.*, „Environmental Enrichment Decreases Asphyxia-Induced Neurobehavioral Developmental Delay in Neonatal Rats”, *Int J Mol Sci*, t. 14, nr 11, Art. nr 11, lis. 2013, doi: 10.3390/ijms141122258.
- [225] A. Díaz-Pérez *i in.*, „Histone deacetylase inhibition by suberoylanilide hydroxamic acid during reperfusion promotes multifaceted brain and vascular protection in spontaneously hypertensive rats with transient ischaemic stroke”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, t. 172, s. 116287, mar. 2024, doi: 10.1016/j.biopha.2024.116287.
- [226] D.-I. Sinn *i in.*, „Valproic acid-mediated neuroprotection in intracerebral hemorrhage via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation”, *Neurobiology of Disease*, t. 26, nr 2, Art. nr 2, maj 2007, doi: 10.1016/j.nbd.2007.02.006.
- [227] P. Jaholkowski *i in.*, „New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning”, *Learn. Mem.*, t. 16, nr 7, Art. nr 7, sty. 2009, doi: 10.1101/lm.1459709.
- [228] A. Urbach, I. Robakiewicz, E. Baum, L. Kaczmarek, O. W. Witte, i R. K. Filipkowski, „Cyclin D2 knockout mice with depleted adult neurogenesis learn Barnes maze task”, *Behavioral Neuroscience*, t. 127, nr 1, Art. nr 1, 2013, doi: 10.1037/a0031222.
- [229] S. Hersman, V. Rodriguez Barrera, i M. Fanselow, „Assigning Function to Adult-Born Neurons: A Theoretical Framework for Characterizing Neural Manipulation of Learning”, *Front. Syst. Neurosci.*, t. 9, sty. 2016, doi: 10.3389/fnsys.2015.00182.
- [230] M. I. Fonseca, J. Zhou, M. Botto, i A. J. Tenner, „Absence of C1q Leads to Less Neuropathology in Transgenic Mouse Models of Alzheimer’s Disease”, *J Neurosci*, t. 24, nr 29, Art. nr 29, lip. 2004, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0901-04.2004.
- [231] E. Panayiotou, E. Fella, R. Papacharalambous, S. Malas, M. J. Saraiva, i T. Kyriakides, „C1q ablation exacerbates amyloid deposition: A study in a transgenic mouse model of ATTRV30M amyloid neuropathy”, *PLoS One*, t. 12, nr 4, Art. nr 4, kwi. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0175767.
- [232] Q. Shi *i in.*, „Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice”, *Sci Transl Med*, t. 9, nr 392, Art. nr 392, maj 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6295.

- [233] E. Czirr *i in.*, „Microglial complement receptor 3 regulates brain A β levels through secreted proteolytic activity”, *J Exp Med*, t. 214, nr 4, Art. nr 4, kwi. 2017, doi: 10.1084/jem.20162011.
- [234] X. Liu, X. Tan, Y. Yu, J. Niu, B. Zhao, i Q. Wang, „Short chain fatty acids mediates complement C1q pathway alleviation of perioperative neurocognitive disorders”, *Neuropharmacology*, t. 265, s. 110266, mar. 2025, doi: 10.1016/j.neuropharm.2024.110266.
- [235] M. R. Hasan *i in.*, „Effect of HDAC Inhibitors on Neuroprotection and Neurite Outgrowth in Primary Rat Cortical Neurons Following Ischemic Insult”, *Neurochem Res*, t. 38, nr 9, s. 1921–1934, wrz. 2013, doi: 10.1007/s11064-013-1098-9.
- [236] L. M. Collins, L. J. Adriaanse, S. D. Theratile, S. V. Hegarty, A. M. Sullivan, i G. W. O’Keeffe, „Class-IIa Histone Deacetylase Inhibition Promotes the Growth of Neural Processes and Protects Them Against Neurotoxic Insult”, *Mol Neurobiol*, t. 51, nr 3, Art. nr 3, cze. 2015, doi: 10.1007/s12035-014-8820-8.
- [237] A. Bagheri *i in.*, „HDAC Inhibitors Induce BDNF Expression and Promote Neurite Outgrowth in Human Neural Progenitor Cells-Derived Neurons”, *International Journal of Molecular Sciences*, t. 20, nr 5, Art. nr 5, sty. 2019, doi: 10.3390/ijms20051109.
- [238] H. Hagberg *i in.*, „The role of inflammation in perinatal brain injury”, *Nat Rev Neurol*, t. 11, nr 4, s. 192–208, kwi. 2015, doi: 10.1038/nrneurol.2015.13.
- [239] H. Zhang i W. Zhao, „Resveratrol Alleviates Ischemic Brain Injury by Inhibiting the Activation of Pro-Inflammatory Microglia Via the CD147/MMP-9 Pathway”, *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, t. 31, nr 4, kwi. 2022, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106307.
- [240] J. Liu *i in.*, „Salidroside inhibits NLRP3 inflammasome activation and apoptosis in microglia induced by cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway”, *Annals of Translational Medicine*, t. 9, nr 22, Art. nr 22, lis. 2021, doi: 10.21037/atm-21-5752.
- [241] M.-A. Dommergues, F. Plaisant, C. Verney, i P. Gressens, „Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: a potential target for

- neuroprotection”, *Neuroscience*, t. 121, nr 3, s. 619–628, 2003, doi: 10.1016/s0306-4522(03)00558-x.
- [242] S. Chen *i in.*, „Valproic acid attenuates traumatic spinal cord injury-induced inflammation via STAT1 and NF- κ B pathway dependent of HDAC3”, *Journal of Neuroinflammation*, t. 15, nr 1, s. 150, maj 2018, doi: 10.1186/s12974-018-1193-6.
- [243] Q. Meng, G. Yang, Y. Yang, F. Ding, i F. Hu, „Protective effects of histone deacetylase inhibition by Scriptaid on brain injury in neonatal rat models of cerebral ischemia and hypoxia”, *Int J Clin Exp Pathol*, t. 13, nr 2, s. 179–191, luty 2020.
- [244] K. Jayaraj, R. Kumar, S. Shyamasundar, T. V. Arumugam, J. S. Polepalli, i S. T. Dheen, „Spatial Transcriptomic Analysis Reveals HDAC Inhibition Modulates Microglial Dynamics to Protect Against Ischemic Stroke in Mice”, *Glia*, t. 73, nr 9, s. 1817–1840, wrz. 2025, doi: 10.1002/glia.70035.
- [245] C.-H. Hsing *i in.*, „Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Ameliorated Endotoxin-Induced Neuroinflammation and Cognitive Dysfunction”, *Mediators of Inflammation*, t. 2015, nr 1, s. 163140, 2015, doi: 10.1155/2015/163140.
- [246] B. S. Durham, R. Grigg, i I. C. Wood, „Inhibition of histone deacetylase 1 or 2 reduces induced cytokine expression in microglia through a protein synthesis independent mechanism”, *Journal of Neurochemistry*, t. 143, nr 2, s. 214–224, 2017, doi: 10.1111/jnc.14144.
- [247] F.-Z. Jiao, Y. Wang, H.-Y. Zhang, W. Zhang, L.-W. Wang, i Z.-J. Gong, „Histone Deacetylase 2 Inhibitor CAY10683 Alleviates Lipopolysaccharide Induced Neuroinflammation Through Attenuating TLR4/NF- κ B Signaling Pathway”, *Neurochem Res*, t. 43, nr 6, s. 1161–1170, cze. 2018, doi: 10.1007/s11064-018-2532-9.
- [248] M. Mota *i in.*, „Neuroprotective epi-drugs quench the inflammatory response and microglial/macrophage activation in a mouse model of permanent brain ischemia”, *Journal of Neuroinflammation*, t. 17, nr 1, s. 361, lis. 2020, doi: 10.1186/s12974-020-02028-4.
- [249] V. Kannan, N. Brouwer, U.-K. Hanisch, T. Regen, B. J. L. Eggen, i H. W. G. M. Boddeke, „Histone deacetylase inhibitors suppress immune activation in primary

- mouse microglia”, *Journal of Neuroscience Research*, t. 91, nr 9, s. 1133–1142, wrz. 2013, doi: 10.1002/jnr.23221.
- [250] Y. Yamasaki, N. Matsuura, H. Shozuhara, H. Onodera, Y. Itoyama, i K. Kogure, „Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats”, *Stroke*, t. 26, nr 4, s. 676–680; discussion 681, kwi. 1995, doi: 10.1161/01.str.26.4.676.
- [251] C. M. Long-Smith, L. Collins, A. Toulouse, A. M. Sullivan, i Y. M. Nolan, „Interleukin-1 β contributes to dopaminergic neuronal death induced by lipopolysaccharide-stimulated rat glia in vitro”, *J Neuroimmunol*, t. 226, nr 1–2, s. 20–26, wrz. 2010, doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.030.
- [252] H. J. C. Bonestroo *i in.*, „Cerebral and hepatic inflammatory response after neonatal hypoxia-ischemia in newborn rats”, *Dev Neurosci*, t. 35, nr 2–3, s. 197–211, 2013, doi: 10.1159/000346685.
- [253] M. Ziemka-Nalecz i T. Zalewska, „Neuroprotective effects of histone deacetylase inhibitors in brain ischemia”, *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, t. 74, nr 4, s. 383–395, 2014, doi: 10.55782/ane-2014-2001.
- [254] Y. Sun, J. W. Calvert, i J. H. Zhang, „Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration”, *Stroke*, t. 36, nr 8, s. 1672–1678, sie. 2005, doi: 10.1161/01.STR.0000173406.04891.8c.
- [255] J. Szaflarski, D. Burtrum, i F. S. Silverstein, „Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats”, *Stroke*, t. 26, nr 6, s. 1093–1100, cze. 1995, doi: 10.1161/01.str.26.6.1093.
- [256] S.-J. Li *i in.*, „The role of TNF- α , IL-6, IL-10, and GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy”, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, t. 18, nr 6, s. 905–909, 2014.
- [257] C. Zhou *i in.*, „Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 (Nrf2) Contributes to the Neuroprotective Effects of Histone Deacetylase Inhibitors In Retinal Ischemia-Reperfusion Injury”, *Neuroscience*, t. 418, s. 25–36, paź. 2019, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.08.027.

- [258] S. Li *i in.*, „Early Histone Deacetylase Inhibition Mitigates Ischemia/Reperfusion Brain Injury by Reducing Microglia Activation and Modulating Their Phenotype”, *Front Neurol*, t. 10, s. 893, 2019, doi: 10.3389/fneur.2019.00893.
- [259] K. Kobayashi *i in.*, „Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia”, *Cell Death Dis*, t. 4, nr 3, s. e525, mar. 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.54.
- [260] P. Pawelec, J. Sypecka, T. Zalewska, i M. Ziemka-Nalecz, „Analysis of Givinostat/ITF2357 Treatment in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage”, *Int J Mol Sci*, t. 23, nr 15, s. 8287, lip. 2022, doi: 10.3390/ijms23158287.
- [261] Y. Zhang, Y. S. Park, i I.-B. Kim, „A Distinct Microglial Cell Population Expressing Both CD86 and CD206 Constitutes a Dominant Type and Executes Phagocytosis in Two Mouse Models of Retinal Degeneration”, *Int J Mol Sci*, t. 24, nr 18, s. 14236, wrz. 2023, doi: 10.3390/ijms241814236.
- [262] M. Prinz i J. Priller, „Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease”, *Nat Rev Neurosci*, t. 15, nr 5, s. 300–312, maj 2014, doi: 10.1038/nrn3722.
- [263] M. Colonna i O. Butovsky, „Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration”, *Annu Rev Immunol*, t. 35, s. 441–468, kwi. 2017, doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052358.
- [264] C. Huang *i in.*, „The ketone body metabolite β -hydroxybutyrate induces an antidepressant-associated ramification of microglia via HDACs inhibition-triggered Akt-small RhoGTPase activation”, *Glia*, t. 66, nr 2, s. 256–278, luty 2018, doi: 10.1002/glia.23241.
- [265] T. Liu *i in.*, „PI3K/AKT signaling and neuroprotection in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic perspectives”, *Neural Regen Res*, t. 20, nr 10, s. 2758–2775, paź. 2025, doi: 10.4103/NRR.NRR-D-24-00568.
- [266] A. Maddahi i L. Edvinsson, „Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway”, *Journal of Neuroinflammation*, t. 7, nr 1, s. 14, luty 2010, doi: 10.1186/1742-2094-7-14.

- [267] D. Li *i in.*, „Regulation and role of ERK phosphorylation in glial cells following a nigrostriatal pathway injury”, *Brain Res*, t. 1648, nr Pt A, s. 90–100, paź. 2016, doi: 10.1016/j.brainres.2016.07.008.
- [268] M. Qiu, E. Xu, i L. Zhan, „Epigenetic Regulations of Microglia/Macrophage Polarization in Ischemic Stroke”, *Front. Mol. Neurosci.*, t. 14, paź. 2021, doi: 10.3389/fnmol.2021.697416.