



*Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum  
Wydział Farmaceutyczny  
Katedra Farmakobiologii*

**„Rola czynnika transkrypcyjnego MeCP2 w depresji ”**

*Paulina Misztak*

Rozprawa doktorska  
wykonana pod opieką promotora  
**Prof. dr. hab. Gabriela Nowaka** oraz  
promotora pomocniczego  
**dr Magdaleny Sowa-Kućma**

**Kraków 2019**

## ***Podziękowania***

*Składam najserdeczniejsze podziękowania mojemu Promotorowi **Panu prof. Gabrielowi Nowakowi** za udzielenie cennych wskazówek przy pisaniu tej rozprawy oraz koordynowanie wszystkich prowadzonych badań.*

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania mojej Promotor pomocniczej, **Pani dr Magdalenie Sowie-Kućmie** za wkład naukowy, zaangażowanie, poświęcony czas i cierpliwość w powstawaniu pracy.*

*Dziękuję*

*Serdeczne podziękowania również dla całego Zakładu Neurobiologii Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, a szczególnie **Pani dr hab. Bernadecie Szewczyk** i **dr Bartłomiejowi Pochwat** za pomoc w wykonaniu pracy i wsparcie emocjonalne .*

***Moim Rodzicom**, za wychowanie i wsparcie w realizacji moich marzeń.*

**Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach realizacji projektu  
pt.: „Czynnik transkrypcyjny MeCP2 jako wewnątrzkomórkowy obiekt badań nad  
mechanizmem depresji i jako cel potencjalnej farmakoterapii tej choroby”  
finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki: SONATA 5, DEC-  
2013/09/D/NZ7/02520**



# SPIS TREŚCI

|   |           |
|---|-----------|
| <b>WSTĘP:</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1. Depresja</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1. Teorie depresji  | 7         |
| 1.1.1. Teoria monoaminergiczna i zmian adaptacyjnych  | 8         |
| 2.1.1. Teoria neurotroficzna  | 9         |
| 3.1.1. Teoria uwzględniająca rolę stresu oraz interleukin w patomechanizmie depresji  | 10        |
| 4.1.1. Teoria glutaminianergiczna   | 11        |
| 2.1. Diagnostyka i leczenie   | 12        |
| <b>2. Epigenetyka</b>   | <b>14</b> |
| 2.1.1. Metylacja/demetylacja DNA  | 14        |
| 2.1.2. Acetylacja/deacetylacja oraz metylacja histonów  | 15        |
| 2.1.3. Epigenetyka nowe podejście w patomechanizmie depresji  | 15        |
| <b>3. MeCP2</b>   | <b>18</b> |
| 3.1. Ogólna charakterystyka MeCP2   | 18        |
| 3.2. Fosforylacja MeCP2 S421 oraz interakcja miR-132/212  | 19        |
| 3.3. Wpływ MeCP2 na poziom genu bdnf  | 20        |
| 3.4. Zaburzenia MeCP2, a choroby człowieka  | 21        |
| 3.4.1. MeCP2 w chorobach o podłożu neurologicznym   | 21        |
| 3.4.2. Uzależnienia   | 23        |
| 3.4.3. Rola MeCP2 w depresji  | 24        |
| <b>CEL PRACY:</b>   | <b>26</b> |
| <b>MATERIAŁY I METODY:</b>  | <b>27</b> |
| 2.1. Zwierzęce modele depresji  | 29        |
| 2.1.1. Model przewlekłego łagodnego stresu (ang. Chronic Mild Stress, CMS)  | 29        |
| 2.1.2. Model Usunięcia Opuszek Węchowych (OB)   | 30        |
| 2.2. Substancje podawane zwierzętom oraz ich dawkowanie   | 31        |
| 2.3. Testy behawioralne   | 33        |
| 2.3.1. Test Spożycia 1% roztworu sacharozy (SPT)  | 33        |
| 2.3.2. Test wolnego pola (ang. Open Field Test, OFT)  | 33        |
| 2.3.3. Pobieranie i przechowywanie tkanek zwierzęcych   | 34        |
| 3.1. Analiza białek metodą Western blot   | 35        |
| 3.2. Analiza genów metodą Real-Time PCR   | 36        |
| <b>WYNIKI:</b>  | <b>38</b> |
| 1.2. Zmiany poziomu białka MeCP2 i jego ufosforylowanej formy p-S421-MeCP2 oraz białka BDNF w hipokampie i korze czołowej   | 38        |
| 1.3. Poziom wybranych czynników epigenetycznych hipokampie i korze czołowej   | 40        |
| 2.1. Wpływ Przewlekłego Łagodnego Stresu oraz leków przeciwdepresyjnych na spożycie 1% roztworu sacharozy   | 45        |
| 2.2. Wpływ przewlekłego łagodnego stresu oraz leków na ekspresję genu mecp2 oraz bdnf.  | 47        |
| 2.3. Wpływ przewlekłego łagodnego stresu oraz leków na ekspresję miR-132*/212*  | 50        |
| 2.3.1. Poziom ekspresji miR-132*/212* oznaczono przy użyciu techniki Real-Time PCR.   | 50        |
| 2.4. Wpływ przewlekłego łagodnego stresu oraz leków na poziom białka MeCP2 i jego ufosforylowanej formy p-S421-MeCP2 oraz białka BDNF w hipokampie i korze czołowej | 53        |
| 2.5. Wpływ przewlekłego łagodnego stresu oraz leków na poziom wybranych czynników epigenetycznych w hipokampie i korze czołowej                                     | 57        |
| 3.1. Behawioralne działanie Usunięcia Opuszek Węchowych w Teście Wolnego Pola   | 63        |
| 3.2. Poziom ekspresji genu BDNF oraz MeCP2 w hipokampie i korze czołowej w modelu OB.   | 63        |
| 3.3. Wpływ usunięcia opuszek węchowych oraz leków na ekspresję miRNA 132*; miRNA 212* w korze czołowej i hipokampie   | 67        |
| 3.4. Wpływ usunięcia opuszek węchowych na poziom białek BDNF, MeCP2 oraz p-S421-MeCP2 w korze czołowej i hipokampie.  | 70        |
| 3.5. Wpływ usunięcia opuszek węchowych na poziom białek wybranych czynników epigenetycznych w korze czołowej i hipokampie   | 73        |

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| <b>DYSKUSJA:</b>      | <b>84</b>  |
| <b>PODSUMOWANIE:</b>  | <b>92</b>  |
| <b>WYKAZ SKRUTÓW:</b> | <b>95</b>  |
| <b>STRESZCZENIE:</b>  | <b>100</b> |
| <b>SUMMARY:</b>       | <b>102</b> |
| <b>SPIS RYCIN:</b>    | <b>104</b> |
| <b>SPIS TABEL:</b>    | <b>109</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA:</b>  | <b>111</b> |

## Wstęp:

### 1. Depresja

Zgodnie z oświadczeniem Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) depresja jest najczęściej występującym zaburzeniem wśród chorób psychicznych zdiagnozowanym u około 300 milionów ludzi na całym świecie co stanowi około 3.4% całej populacji. Depresja występuje znacznie częściej w krajach rozwiniętych i rozwijających się (*Number of people with depression, by region - Our World in Data*, 2018). Wśród chorych na depresję dwa razy częściej diagnozuje się ją u kobiet niż u mężczyzn. Według WHO każdego roku choroby o podłożu psychicznym produkują \$1 trylionowe straty, a depresja uplasowuje się na pierwszym miejscu listy tych chorób. Pomiędzy 2005 a 2015 rokiem odsetek chorych na depresję zwiększył się o 18%, a diagnostyka w Stanach Zjednoczonych wzrosła o 33% od roku 2013. Według Blue Cross Blue Shield (BCBS) w Stanach Zjednoczonych depresja dotyka 9 milionów Amerykanów objętych ubezpieczeniem zdrowotnym. Według badań przeprowadzonych w Wielkiej Brytanii w 2017 roku powyżej 300.000 Brytyjczyków straciło pracę z powodu zachorowalności na choroby o podłożu psychicznym co spowodowało straty o wartości £74-£99 milionów (*Depression is the no. 1 cause of ill health and disability worldwide | World Economic Forum*, 2018). W Polsce 1.5 miliona ludzi cierpi na depresję co stanowi 4% ludności Polski, a około 80% to osoby w wieku 30-59 lat. W Polsce tak jak i na świecie występowanie zaburzeń depresyjnych diagnozowane jest częściej u kobiet niż mężczyzn, jednakże u mężczyzn rozpowszechnienie depresji we wszystkich grupach wiekowych pozostaje na równym poziomie to u kobiet wskaźniki rosną wraz z wiekiem od 2.5% w wieku 18-29 lat do 5% w wieku >50 lat (<https://www.gov.pl/web/zdrowie/programy-polityki-zdrowotnej1>). Według badań przeprowadzonych przez Instytut Zarządzania w Ochronie Zdrowia (IZWOZ) z 2014 roku w ciągu roku depresja przynosi PLN1-2.6 miliardowe straty (*Depresja - analiza kosztów ekonomicznych i społecznych*, 2014).

Według DSM-5 (ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5<sup>th</sup> Edition) osoba cierpiąca na depresję powinna doświadczyć 5 lub więcej objawów określanych jako (przez co najmniej 2 tygodnie):

- obniżony nastrój każdego dnia, zmniejszenie zainteresowania czymkolwiek co było dla niej ważne w życiu,
- utrata wagi ciała lub jego przyrost,
- utrata energii lub notoryczne zmęczenie,
- zmniejszenie koncentracji,
- niezdecydowanie i utrata logicznego myślenia,
- uczucie winy i bezwartościowości,
- powracające myśli samobójcze lub jego próby (Tolentino and Schmidt, 2018).

Według DSM-4 choroby depresyjne dzieliły się na: depresję dwubiegunową (BD II), jednobiegunową (BD I), ciężkie zaburzenia depresyjne (MDD), atypową depresję, depresję melancholiczną, niewielkie zaburzenia depresyjne oraz wyróżnione zostały zaburzenia typu dystymia i sezonowe zaburzenia depresyjne (Benazzi, 2006). W DSM-5 w kryteriach dotyczących MDD nie wprowadzono wielkich zmian, lecz dodano: specyfikator mieszanych cech (objawy maniakalne u pacjentów niespełniających kryteriów epizodu maniakalnego) oraz specyfikator lęku. Oprócz MDD, BDI oraz BDII jak i zaburzeń sezonowych do chorób powodujących zaburzenia nastroju w DSM-5 dodano również zaburzenia cyklotymiczne, dysregulacyjne zaburzenia nastroju (ang. Disruptive mood dysregulation disorder), trwałe zaburzenia nastroju (ang. Persistent depressive disorder), zaburzenia dysmorficzne przedmiesiączkowe (ang. Premenstrual dysphoric disorder) (Herbel and Stelmach, 2007) ([https://www.psychiatry.org/File%20Library/Psychiatrists/Practice/DSM/APA\\_DSM\\_Changes\\_from\\_DSM-IV-TR\\_to\\_DSM-5.pdf](https://www.psychiatry.org/File%20Library/Psychiatrists/Practice/DSM/APA_DSM_Changes_from_DSM-IV-TR_to_DSM-5.pdf)). Wśród pacjentów depresyjnych występuje duży odsetek samobójstw (800 000 ludzi rocznie), który powoduje że depresja jest śmiertelną chorobą i osiągnie drugą pozycję na liście WHO obliczanej wskaźnikiem DALY (ang. Disability-Adjusted Life Year) wśród chorób takich jak rak czy choroby sercowo-naczyniowe (Grosse *et al.*, 2009; Reddy, 2010).

W psychiatrii ogólnej do diagnozowania zaburzeń depresyjnych stosowane są liczne kwestionariusze między innymi skala Hamiltona (HAMD) czy skala depresji Becka. Skala Hamiltona zawiera serie 21 lub 17 punktów, a opracowany kwestionariusz z Kanady 7 (HAMD-7). Skala depresji Becka również zawiera zestaw opisu zachowań charakterystycznych dla depresji.

Ponadto wśród licznych prac naukowych dotyczących depresji (około 180 tysięcy) jak dotąd nie udało się jednoznacznie określić patomechanizmu zespołu chorób typu depresyjnego tak jak i skutecznego sposobu ich leczenia. Sugeruje się że około 50% pacjentów poddanych leczeniu odpowiada na zastosowaną terapię lekami przeciwdepresyjnymi, a 40% z nich osiąga stan remisji (Bennabi *et al.*, 2015). Szacuje się iż koszt leczenia depresji w Stanach Zjednoczonych wynoszą 44-60 miliardów dolarów rocznie. W porównaniu do innych chorób jak choroby serca – 43 mld dolarów, AIDS – 66 mld dolarów czy choroby nowotworowe 164 mld dolarów depresja jest jednym z najpoważniejszych problemów medycznych odzwierciedlającym się w statystykach ekonomicznych. W Polsce koszty poniesione z tytułu absencji chorobowej spowodowanej zapadalnością na depresję w 2013 roku wyniosły 762 miliona złotych, a leczenie w jednostkach szpitalnych i opiece specjalistycznej 167 miliona złotych. Co więcej według danych szacunkowych tylko jedna na pięć osób cierpiących na depresję wybiera skorzystanie z pomocy specjalistycznej, a jeden na dwudziestu chorych leczy się w szpitalach psychiatrycznych (*Depresja - analiza kosztów ekonomicznych i społecznych*, 2014).

Do najskuteczniejszych i najczęściej stosowanych antydepresantów zalicza się Selektywne Inhibitory Wychwytu Zwrotnego Serotoniny (ang. *Selective serotonin reuptake inhibitors* SSRI) pomimo, że tylko 1/3 pacjentów osiąga stan remisji podczas ich przyjmowania (Bennabi *et al.*, 2015; Caldarone, Zachariou and King, 2015). Obecnie, prócz SSRI, również leki z grupy inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (ang. *Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor*; SNRI) oraz Inhibitory Wychwytu Zwrotnego Noradrenaliny i Dopaminy (ang. *Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor*, NDRI) należą do leków pierwszego wyboru w leczeniu depresji (*Antidepressants: Options, Advantages, and Precautions*, 2018; Koenig and Thase, 2009 a) .

### 1.1. Teorie depresji

Depresja jest chorobą heterogenną, której rozwojowi sprzyjają różne czynniki (biologiczne, społeczne, genetyczne, psychiczne oraz somatyczne). Spośród nich, to jednak czynniki biologiczne wydają się zasługiwać na szczególną uwagę. Na przestrzeni lat powstało wiele teorii patogenezy depresji, jednak uważa się, że nie ma jednego uniwersalnego mechanizmu leżącego u podstaw rozwoju tej choroby.

Pierwsze wzmianki na temat dane dotyczące depresji pojawiły się już w dziełach Hipokratesa w V wieku p.n.e. i dotyczyły umiejscowienia melancholii inaczej „czarnej żółci” w mózgu. W 1621 roku Robert Burton opublikował „*Anatomy of Melancholy*”, w której opisał psychologiczne i socjalne skutki depresji. Wiek XIX a szczególnie XX skutkowało wieloma badaniami nad depresją i nowymi opisaniem nowych form terapii. Niemiecki psychiatra Emil Krapelin jako pierwszy wyróżnił depresję maniacką jako oddzielną jednostkę chorobową. Leczenie chorób umysłowych (w tym deresji) w tych czasach opierało się głównie na stosowaniu lobotomii (polegała na przzerwaniu włókien nerwowych pomiędzy płatem czołowym a międzymózgowiem za pomocą narzędzi chirurgicznych). W 1938 roku do leczenia depresji po raz pierwszy użyto kontrolowanego elektrowstrząsu, a w 1958 odkryto iż imipramina (Trójpierścieniowy lek przeciwdepresyjny hamujący wychwyty zwrotne noradrenaliny i serotoniny ze szczeliny synaptycznej) działa przeciwdepresyjnie. Lata 50- i 60-te XX wieku skutkowało pojawieniem się pierwszej klasyfikacji depresji w której to wyróżniono endogenną depresję. Kolejną ważną datą dla formułowania się badań nad depresją był rok 1987 w którym to fluoksetyna (Prozac) jako pierwszy SSRI został wprowadzony do leczenia (*Historical Understandings of Depression*, 2012). Wprowadzenie nowych form farmakoterapii depresji nie przyczyniło się jednak do wyjaśnienia patomechanizmu tej choroby.

Badania szczególnie z ostatnich kilkudziesięciu lat dowodzą, iż etiologia zaburzeń depresyjnych jest bardzo złożona. Prawdopodobnie uczestniczą w niej wszystkie układy neurotransmisyjne, jednakże wciąż nie są znane dokładne mechanizmy jej rozwoju. W związku z tym, obecna farmakoterapia depresji jak również obszary poszukiwań nowych, skuteczniejszych



form jej leczenia opiera się na założeniach najbardziej aktualnych i prawdopodobnych teorii, tj.: monoaminergicznej, zmian adaptacyjnych, neurotroficznej, zaburzenia funkcjonowania osi podwzgórze-prysadka-nadnercza, czy glutaminianergicznej.

### 1.1.1. Teoria monoaminergiczna i zmian adaptacyjnych

Lata 60-te zaowocowały licznymi badaniami nad inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny oraz noradrenaliny oraz inhibitorami monoaminooksydazy, które przyczyniły się do powstania powszechnie akceptowanej monoaminergicznej teorii depresji, zakładającej, że jej objawy są wynikiem zaburzeń metabolizmu amin biogennych w strukturach mózgu odpowiedzialnych za procesy poznawcze i emocjonalne (Montoya *et al.*, 2016). Na takich założeniach opierały się m.in.: noradrenergiczna oraz serotoninerгіczna teoria depresji.

Jak się okazało, samo zmniejszenie poziomu serotoniny nie powoduje depresji u zdrowych ochotników, co podważa pierwszeństwo tej teorii nad innymi. Ponadto leki przeciwdepresyjne z grupy SSRI oraz SNRI charakteryzują się opóźnionym efektem działania (kilka tygodni), co sugeruje, że ich skuteczność przeciwdepresyjna nie jest związana z ich krótkotrwałym wpływem na przewodnictwo monoaminergiczne, ale raczej pojawiającą się adaptacją receptorów monoamin na długotrwałe stosowanie leków (Massart, Mongeau and Lanfumey, 2012). Obserwacje te dały początek teorii zmian adaptacyjnych, która zakłada, iż długoterminowe podania leków przeciwdepresyjnych zwiększają lub zmniejszają wrażliwość receptorów układów neuroprzewodzących. Obserwacje te dały początek teorii zmian adaptacyjnych, która zakłada iż długoterminowe podania leków przeciwdepresyjnych polegają na zwiększeniu lub zmniejszeniu wrażliwości receptorów układów neuroprzewodzących.

Niestety liczne badania w tym kierunku nie pozwalają w satysfakcjonujący sposób stwierdzić, czy któraś z opisanych zmian wtórnych ma bezpośredni wpływ na wystąpienie efektu leczniczego leków przeciwdepresyjnych. Najnowsze badania sugerują szczególne znaczenie receptora 5-HT<sub>1A</sub> w odpowiedzi na leki przeciwdepresyjne (Szewczyk *et al.*, 2014). Wykazano również, że gen HTR1A wykazuje możliwą epistazę genu BDNF (Kautzky *et al.*, 2019). Jak dotąd nie dowiedziono, iż polimorfizm 5-HT<sub>1A</sub> odgrywa jakąkolwiek rolę u pacjentów MDD, jednakże badania nad pacjentami schizofrenicznymi wykazały korelację SNP re6295 z symptomami negatywnymi w tej chorobie (Takekita *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Wykazano również, że leki z grupy SSRI (np. citalopram) zwiększają pozakomórkowy poziom 5-HT oraz zmniejszają poziom mRNA dla 5-HT<sub>1A</sub> u szczurów (Wang *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2016). Również długotrwałe podania leków z grupy Trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych (TLPD) takich jak imipramina uniewrażliwiają receptory  $\alpha$ -adrenergiczne ( $\alpha_1$ -AR). Efekt ten jest również obserwowany w terapii elektrowstrząsowej (Kreiner *et al.*, 2016; Uys *et al.*, 2017). Leki z grupy TLPD prowadzą również do aktywacji szlaków cAMP,

aktywację szlaku FGFR/FRS2 $\alpha$ /ERK/CREB przez co wpływają na ekspresję genu GDNF (Hisaoaka *et al.*, 2011) jak i BDNF (Razavi *et al.*, 2017).

Dotychczas leki oparte na tej teorii depresji używane są w klinice jak i badaniach przedklinicznych.

### 2.1.1. Teoria neurotroficzna

Czynniki neurotroficzne to grupa polipeptydów układu nerwowego niezbędna dla funkcjonowania komórek nerwowych. Do tej grupy białek należą:

- Neurotrofiny (np. NGF, BDNF oraz neurotrofiny: NT-3, -4/5, -6, -7),
- Czynniki wzrostu fibroblastów (FGF-1, -2, -5),
- Cytokiny neuropoetyczne (np. cTNF),
- Insulinopodobne czynniki neurotroficzne (IGF-1, -2),
- Białaczkowy czynnik hamujący (LIF),
- Glejowe czynniki neurotroficzne (np. GDNF)
- Czynniki neurotroficzne naskórka (EGF) (Barbacid, 1995; Skaper, 2012; Xiao and Le, 2016)

Neurotrofiny wiążą się do receptorów przezbłonowych p57<sup>NTR</sup> (apoptoza komórek nerwowych, aktywacja ścieżki Rac1/Jun) lub Trk przez co uczestniczą we wzroście i przeżywaniu neuronów (aktywacja ścieżki Ras/ERK i Akt/PI3K) (Huang and Reichardt, 2001). Do najważniejszych czynników neurotroficznych w mechanizmie depresji należy czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. *Brain derived neurotrophic factor*, BDNF), którego funkcja związana jest z przeżywalnością rdzeniowych neuronów czuciowych, hipokampalnych oraz korowych. BDNF nasila pobudzający potencjał postsynaptyczny (ang. *Excitatory Postsynaptic Potential*, EPSP) oraz osłabia hamujący potencjał postsynaptyczny (ang. *Inhibitory Postsynaptic Potential*, IPSP) przez co bierze udział w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym (ang. *Long-term potentiation*, LTP) oraz długotrwałym osłabieniu synaptycznym (ang. *Long-term depression*, LTD), czyli procesach związanych z formowaniem śladów pamięciowych (Xiao and Le, 2016). Wykazano, że podania leków przeciwdepresyjnych zwiększają poziom BDNF w mózgu, zaś jego zmniejszona ekspresja odpowiedzialna jest za zachowanie typu depresyjnego u zwierząt (Młyniec *et al.*, 2014; Pochwat *et al.*, 2015a; Jastrzębska-Więsek *et al.*, 2018a; Muñoz-Cobo *et al.*, 2018; Rong *et al.*, 2018). U pacjentów MDD z depresją lekooporną leczonych lekami z grupy SSRI i SNRI lub Riluzolem (pochodna benzotiazolu, stosowany w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego) wykazującym działanie neuroprotecyjne obserwowano zwiększony poziom BDNF w surowicy pacjentów

leczonych lekiem neuroprotekcijnym (Wilkinson *et al.*, 2018) co potwierdza udział neurotrofin w patomechanizmie depresji.

### 3.1.1. Teoria uwzględniająca rolę stresu oraz interleukin w patomechanizmie depresji

Rola stresu w chorobach o podłożu psychicznym jest szeroko opisywana w literaturze podmiotu. Ekspozycja na przewlekły stres, szczególnie we wczesnym okresie rozwojowym i wczesnej adolescencji, uznawana jest jako główny czynnik środowiskowy sprzyjający rozwojowi depresji. Istotnym czynnikiem pośredniczącym wydaje się być aktywacja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*, HPA) skutkująca nadmiernym uwalnianiem glikokortykosteroidów (ang. *Glucocorticoids*, GR), głównie kortyzolu (Keller *et al.*, 2017). Istotną rolę w regulacji osi HPA odgrywają receptory GR, które poprzez pętle sprzężeń zwrotnych hamują uwalnianie glikokortykosteroidów przez nadnercza, ponadto są zaangażowane w regulację wydzielania noradrenaliny i serotoniny oraz negatywnie wpływają na poziom BDNF. Udowodniono, że depresji u ludzi towarzyszy wzrost poziomu kortyzolu w surowicy krwi jak i zmniejszenie ilości mRNA receptorów GR w korze czołowej i hipokampie (Modell *et al.*, 1997; Bhagwagar, Hafizi and Cowen, 2005).

Prócz aktywacji osi HPA, stres wywiera również istotny wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego oraz innych procesów związanych z aktywacją jego komórek. Przede wszystkim obserwuje się wzrost uwalniania cytokin prozapalnych oraz markerów stresu oksydacyjnego, które oddziałują na układ nerwowy zarówno poprzez bezpośredni wpływ na przeżywalność komórek jak i funkcjonowanie układów neuroprzebieżnikowych (Klein and Ackerman, 2003; Salim, 2017). Stres oksydacyjny powoduje m.in. uszkodzenia DNA, mitochondriów i enzymów komórkowych, co w konsekwencji prowadzi do dysfunkcji i śmierci neuronów (Klein and Ackerman, 2003).

Cytokiny prozapalne stymulują wychwyty zwrotne serotoniny z synaps. Zwiększony poziom TNF- $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor A*, czynnik martwicy nowotworów) oraz IL-1 $\beta$  (ang. *Interleukin-1  $\beta$* , interleukina 1  $\beta$ ) powiązany jest z aktywacją ścieżki MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*, kinazy aktywowane mitogenami) co wzmacnia wychwyty zwrotne neurotransmiterów i ostatecznie prowadzi do rozwoju behawioru prodepresyjnego u zwierząt (Koo and Duman, 2009). IL-1 $\beta$  oraz jej receptor, nasilają procesy ekscytotoksyczności w hipokampie poprzez zapoczątkowanie fosforylacji receptora NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor* NMDAR, receptor N-metylo-D-asparaginowy) (Grygiel-Górniak, Limphaibool and Puszczewicz, 2019). Liczne badania kliniczne i przedkliniczne potwierdziły znaczenie stresu oksydacyjnego w patomechanizmie chorób afektywnych oraz antyoksydacyjny potencjał leków przeciwdepresyjnych i stabilizatorów nastroju (Siwek *et al.*, 2013). Podobnie, w surowicy krwi pacjentów MDD obserwowano również zwiększony poziom cytokin jak i ich receptorów: sIL-1RA (ang. *Soluble*

*interleukin-1 receptor antagonist*, Antagonista rozpuszczalnego receptora interleukiny-1), sTNF-R1 (ang. *Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor*, Rozpuszczalny receptor czynnika martwicy nowotworu), sIL-6R (ang. *Soluble interleukin-6 receptor*, rozpuszczalny receptor interleukiny-6) oraz TBARS (ang. *Thiobarbituric acid reactive substances*, kwas tiobarbiturowy) oraz zmniejszony poziom IL-1 $\alpha$  (ang. *Interleukin-1  $\alpha$* , Interleukina 1  $\alpha$ ), co pozwala przypuszczać, że iż MDD choroba związana jest ze zwiększonym poziomem peroksydacji lipidów oraz aktywacją systemu immunologicznego (Sowa-Kućma *et al.*, 2018). Badania przedkliniczne wskazują również na obniżony poziom katalazy, peroksydazy glutationowej oraz zwiększony poziom dysmutazy ponadtlenkowej i ROS, oraz normalizację zmian po chronicznych podaniach dezmipraminy (lek z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych - TLPD) (Siwek *et al.*, 2013). Również w modelu depresji opartym na stosowaniu diety o obniżonej zawartości cynku, obserwowano zwiększony poziom IL-1 $\alpha$  oraz TBARS w hipokampie jak i IL-1 $\beta$  i TBARS w korze czołowej w stosunku do grupy kontrolnej, co potwierdza rolę cytokin prozapalnych w depresji (Doboszevska *et al.*, 2016).

Badania nad stresem i modulacyjną funkcją układu immunologicznego w patomechanizmie depresji wpłynęły na opracowanie licznych modeli zwierzęcych tej choroby. Współcześnie modelowanie zachowań „depresyjnych” u gryzoni opiera się głównie na stosowaniu różnych czynników stresowych przez określony czas, czego konsekwencją jest pojawienie się objawów podobnych do depresji u ludzi. Skuteczne leki przeciwdepresyjne niwelują skutki stresu i wspierają ujawnianie się fenotypu przeciwdepresyjnego. Modele te są niezbędne zarówno do badania mechanizmów komórkowych związanych z rozwojem depresji jak również do poszukiwania nowych, skutecznych form jej zwalczania. Do najpowszechniej stosowanych zalicza się: chroniczny łagodny stres, chroniczny nieprzewidywalny stres, model stresu socjalnego, stres separacji od matki czy chroniczny stres unieruchomienia.

#### 4.1.1. Teoria glutaminianergiczna

Badania ostatnich lat wskazują, że obiecującym celem badań nad mechanizmem depresji oraz sposobami jej leczenia może być układ glutaminianergiczny. Jest to dominujący układ pobudzający mózgu, który jest w dynamicznej równowadze z układem GABA-ergicznym (główny układ hamujący mózgu), dzięki czemu możliwe jest utrzymanie homeostazy w ośrodkowym układzie nerwowym. Podstawowym neuroprzekaźnikiem w systemie glutaminianergicznym jest kwas glutaminowy oddziałujący poprzez receptory jonotropowe (iGluR) bądź metabotropowe (mGluR). Do pierwszej rodziny receptorów zaliczamy: NMDAR oraz nie-NMDAR (AMPA i receptory kainianowe), zaś do drugiej trzy główne grupy: mGluRI (mGluR1 i 5), mGluRII (mGluR2 i 3) oraz mGluR III (mGluR4, 6, 7 i 8) (Li, Yang and Lin, 2019). Pierwsze odniesienia wiążące układ

glutaminianegiczny z depresją dotyczyły wzrostu poziomu kwasu glutaminowego we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów MDD (ang. *Major Depressive Disorder*, Duża Depresja). Nowsze badania wskazują przede wszystkim na znaczące zaburzenie funkcji receptorów dla glutaminianu. Wykazano, że depresji towarzyszy nadmierna aktywacja receptorów NMDA. Występują one licznie w hipokampie, korze czołowej oraz jądrach migdałowatych, czyli strukturach mózgu szczególnie istotnych dla rozwoju depresji. Antagoniści NMDAR, jak np. ketamina wykazuje silny efekt przeciwdepresyjny u gryzoni już po jednorazowych podaniach (Dong *et al.*, 2016; Abelaira *et al.*, 2017). Ponadto ketamina wpływa na procesy zapalne normalizując poziom IL-1 $\beta$  i IL-6 (Xie *et al.*, 2017). Natychmiastowy przeciwdepresyjny efekt ketaminy oraz jej długotrwałe działanie (1-7 dni) obserwowany był również u pacjentów zarówno z depresją jedno- jak i dwubiegunową, z towarzyszącymi myślami samobójczymi (Zheng *et al.*, 2018) oraz depresją lekooporną (Tuck and Ghazali, 2017). Wykazano również, że długotrwałe podania leków przeciwdepresyjnych powodują zmniejszenie powinowactwa miejsc wiązania glicyny (GLYB) do receptora NMDA co prowadzi do osłabienia jego funkcji (Nowak *et al.*, 1993; Peyrovian *et al.*, 2019). Inny antagonist NMDAR – związek MK-801 podany dostrukturalnie wpływał na modulację NMDAR poprzez zmniejszenie poziomu glutaminianu i ekscytotoksyczności w korze czołowej (Xiong *et al.*, 2019). Antagoniści układu glutaminergicznego a w szczególności receptora NMDA i AMPA są badani pod kątem depresji lekoopornej oraz szybkiej odpowiedzi na leki.

### 2.1. Diagnostyka i leczenie

Szacuje się iż 4-6 pacjentów na 10 wykazuje pozytywną odpowiedź na stosowany u nich lek przeciwdepresyjny. Do grupy pierwszego rzutu należą leki drugiej generacji leków przeciwdepresyjnych takie jak SSRI i SNRI i są one częściej wykorzystywane w leczeniu depresji z powodu mniejszej toksyczności niż leki pierwszej generacji (TLPD i MAOI). SSRI powodują zwiększenie poziomu serotoniny w mózgu poprzez zahamowanie jej wychwytu zwrotnego. Wśród tej grupy leków wyróżniamy takie jak: citalopram, fluoksetyna, escitalopram, paroksetyna, fluwoksamina, sertralina. Do efektów ubocznych ich stosowania najczęściej należą insomnie, bóle głowy, zaburzenia seksualne, nerwowość, problemy gastryczne, przyrost wagi, nadmierna potliwość itp (Koenig & Thase 2009.). Leki z grupy SNRI blokują wychwyt serotoniny jak i norepinefryny powodując zwiększenie tych transmiterów w szczeliny synaptycznej, przez co wybierane są dla pacjentów z ciężką depresją. Do leków SNRI stosowanych w terapii depresji wliczamy: duloksetynę, deswenlafaksynę, wenlafaksynę, milnacipran, lewomilnacipran. Do efektów niepożądanych należą: niepokój, zawroty głowy, problemy seksualne, insomnie, suchota w ustach, nudności itp. Do leków pierwszego rzutu należą również nietypowe leki przeciwdepresyjne jak bupropion i mirtazapina. Działają one na jeden lub więcej neuroprzekaźników. Używane są w celu uniknięcia niektórych

efektów ubocznych SSRI czy SNRI lub w przypadku braku odpowiedzi na leki z tych grup. MAOI (inhibitory monoaminooksydazy) blokują enzymy MAO-A i MAO-B zapobiegając deaminacji serotoniny, norepinefryny oraz dopaminy. Ze względu na ich szeroki wachlarz efektów ubocznych wykorzystuje się je jako leki trzeciego i czwartego rzutu. Do leków tych należą: fenelzyna, izokarboksazyd, tranylcypromina, selegilina. Najstarszą grupą leków przeciwdepresyjnych są trójcykliczne leki przeciwdepresyjne stosowane od lat 60 XX wieku. Leki te blokują wychwyty zarówno serotoniny jak i norepinefryny ale również blokują receptor histaminowy i  $\alpha$ -adrenergiczny. Ze względu na ich szerokie działanie leki te obarczone są wieloma różnymi efektami ubocznymi m.in. senność, zwiększony apetyt, problemy gastrologiczne, suchość w ustach, zatrzymanie moczu, zawroty głowy, niedociśnienie ortostatyczne, działanie toksyczne na układ naczyniowo-sercowy u osób ze skłonnościami do chorób naczyniowo-sercowych. Wśród TLPD należy wymienić: amitryptylinę, desimipraminę, imipraminę, clomipraminę, nortriptylinę, doksepin itp (Rang et al. 2012.; Fang et al. 2019). W Tabeli.1 zebrano przykładowe leki przeciwdepresyjne używane w farmakoterapii depresji.

Tabela.1. Niektóre leki przeciwdepresyjne wykorzystywane w terapii

| <b>Grupa leków przeciwdepresyjnych</b>                               | <b>Nazwa leku</b>   |
|--|---|
| <b>Selektywne inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny SSRI</b>      | citalopram, fluoksetyna, escitalopram, paroksetyna, fluwoksamina, sertialina    |
| <b>Inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny SNRI</b> | duloksetynę, deswenlafaksyna, wenlafaksyna, milnacipran, lewomilnacipran        |
| <b>Nietypowe leki przeciwdepresyjne</b>                              | bupropion i mirtazapina   |
| <b>Inhibitory monoaminooksydazy MAOI</b>                             | fenelzyna, izokarboksazyd, tranylcypromina, selegilina                          |
| <b>Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne TLPD</b>                     | amitryptylinę, desimipraminę, imipraminę, clomipraminę, nortriptylinę, doksepin |

## 2. Epigenetyka

Oddziaływanie środowiska (stres, składniki odżywcze, interakcje społeczne itp.) na organizm może kształtować różny fenotyp wśród jednostek danej grupy badanej. W 1942 C.H. Waddington wprowadził pojęcie epigenetyka dla określenia zmian nie będące wynikiem bezpośrednich oddziaływań w obrębie struktury DNA (Hall, 2004). Pojęcie epigenomu określa zestaw modyfikacji DNA oraz białek histonowych regulujących strukturę chromatyny co w konsekwencji prowadzi do wpływu na ekspresję genów, naprawę i replikację DNA. Modyfikacje epigenetyczne, a w szczególności metylacje DNA czy acetylacje histonów odgrywają szczególną rolę w mechanizmach wielu chorób nie tylko opartych na opartych na zmianach w dziedziczeniu DNA (choroby genetyczne np. choroba Retta), ale również badane są w chorobach nowotworowych oraz o podłożu psychicznym (Joseph, Strand and Vezina, 2018; Grova *et al.*, 2019; H.-D. Li *et al.*, 2019; Xu, Natarajan and Chen, 2019).

Wśród modyfikacji epigenetycznych wyróżniamy te dotyczące modyfikacji białek histonowych jak: acetylacji/deacetylacja, fosforylacja/defosforylacja, metylacja, SUMO-lizacje, ubikwintynacje jak i te dotyczące modyfikacji DNA np. metylacja/demetylacja oraz miRNA modyfikacje. Najczęściej badane modyfikacje to metylacja DNA oraz deacetylacja histonów.

### 2.1.1 Metylacja/demetylacja DNA

Metylacja DNA jest jedną z najważniejszych modyfikacji poreplikacyjnych biorących udział w ekspresji genów. Polega na dodaniu grupy metylowej (-CH<sub>3</sub>) do zasady azotowej cytozyny przez co powstaje C5-metylocytozyna (m5C), N4-metylocytozyna (m4C) lub do azotu pierścienia adeniny N6-metyloadenina (m6A) w miejscach nazwanych CpG. Za proces metylacji DNA odpowiedzialne są enzymy rodziny metylotransferaz DNA (DNMT): DNMT1 utrzymujące stały wzór metylacji w czasie replikacji, DNMT2 (DNMT3A i 3B) biorące udział w metylacji *de novo* oraz DNMT3L wspomaga metylotransferazy w interakcji z DNA (Joseph, Strand and Vezina, 2018). Metylowane DNA w pobliżu promotora genów wiąże się z ich wyciszeniem poprzez rekrutację białek wchodzących w kompleks represorowy takich jak białek z rodziny MBD - MeCP2. Procesem odwrotnym do metylacji DNA jest demetylacja w którą zaangażowane są DNA-demetylazy jak TET oraz białko GADD45B (Campbell and Wood, 2019). Metylacja DNA odpowiedzialna jest m.in. za imprinting genomowy, inaktywację chromosomu X, regulacja aktywności transpozonów oraz wyciszenie genów. Ponadto metylacja DNA odgrywa znaczącą rolę w chorobach nowotworowych, procesie starzenia, chorobach neurodegeneracyjnych, związanych z silnym stresem jak PTSD itp

(Stenz *et al.*, 2018; Giurgescu *et al.*, 2019; Hu, Li and Duan, 2019; Román, Mancera-Páez and Bernal, 2019).

### 2.1.2 Acetylacja/deacetylacja oraz metylacja histonów

Białka histonowe podlegają różnym modyfikacjom potranslacyjnym jednakże do najważniejszych należą procesy metylacji (w większości powodują zahamowanie ekspresji genów) oraz acetylacji (najczęściej prowadzą do aktywacji ekspresji genów).

Za proces acetylacji/deacetylacji histonów odpowiadają odpowiednio enzymy acetylotransferazy (HAT) oraz deacetylazy histonów (HDAC). HAT katalizują wiązanie grupy  $\epsilon$ -aminowej do lizyny białek histonowych H3 (najczęściej lizyna w pozycji 9, 14, 18, 23, 56) oraz H4 (lizyna w pozycji 5, 8, 13, 16) powodując relaksację chromatyny co umożliwia przyłączenie się polimerazy RNA oraz czynników transkrypcyjnych do promotora genów i aktywację ich transkrypcji. Odwrotny proces katalizują enzymy z rodziny HDAC. Do enzymów z rodziny HAT należą: GNAT, MYST oraz p300/CBP (Sundar *et al.*, 2010). Rodzina HDAC złożona jest z klasy I (HDAC 1, 2, 3, 8), klasy II (IIa: 4, 5, 7, 9 oraz IIb: 6, 10), klasy III (Sirt 1-7) i klasy IV (HDAC 11). Klasa I, II i IV to metaloproteiny wymagające jonów cynku jako ko-aktywatora natomiast ko-aktywatorem enzymów klasy III jest  $\text{NAD}^+$  (forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego) (Misztak, Pańczyszyn-Trzewik and Sowa-Kućma, 2018). HDAC biorą udział w proliferacji, dojrzewaniu i karcynogenie, apoptozie, regulacji ATP, neurodegeneracji, starzeniu itp (Feinberg and Tycko, 2004; Mottamal *et al.*, 2015; Wapenaar *et al.*, 2016).

Metylacja białek histonowych jest procesem złożonym polegającym na metylacji grup  $\epsilon$ -aminowej lizyny jedno, dwu lub trzykrotnie (mono, di-, tri- metylacja) przez co oddziałują na chromatynę w sposób represorowy – hamujący (np. H3K27me3) lub aktyuatorowy - aktywujący (np. H3K9me3) ekspresję genów (Handy, Castro and Loscalzo, 2011). Enzymy należące do metylotransferaz histonów dzielą się na dwie grupy: zawierające domenę SET oraz te niezawierające domeny SET jak i metylotransferazy argininy. Metylacja histonów odgrywa szczególną rolę w proliferacji komórki co odzwierciedla się w badaniach nad nowotworami (Schulz *et al.*, 2019; Singh, 2019).

### 2.1.3. Epigenetyka nowe podejście w patomechanizmie depresji

Większość chorób psychicznych charakteryzuje się złożonością mechanizmu działania. Obserwuje się nie tylko wpływ czynników genetycznych ale również środowiskowych. Wśród chorób psychicznych schizofrenia oraz choroby autystyczne mają największy współczynnik



dziedziczenia (0.81 i 0.8 odpowiednio). W przypadku zaburzeń depresyjnych, wydaje się, iż dziedziczenie nie odgrywa już tak znaczącej roli (MDD - 0.37; BDII - 0.75) (Sullivan, Daly and O'Donovan, 2012). Doniesienia ostatnich lat sugerują natomiast znacznie mechanizmów epigenetycznych zarówno w patofizjologii depresji jak i odpowiedzi na leki przeciwdepresyjne. Szczególną rolę w rozwoju choroby przypisuje się acetylacji histonów. We krwi obwodowej i tkance mózgowej, zarówno pacjentów jak i w zwierzęcych modelach depresji obserwowano spadek acetylacji histonów H3 i H4 (Iga *et al.*, 2007; H. E. Covington *et al.*, 2009; Covington *et al.*, 2011; Ferland and Schrader, 2011; Liu *et al.*, 2015), zaś po podaniach LPD efekt przeciwny (Réus *et al.*, 2013). Z kolei podania ketaminy powodowały wzrost ekspresji genów poprzez eksport jądrowego HDAC5 (ang. Histone Deacetylase 5, Deacetylaza histonu 5), czyli enzymu odpowiedzialnego za deacetylację histonów (Choi *et al.*, 2015a). Zastosowanie imipraminy skutkowało obniżeniem poziomu metylacji histonów i HDAC5 oraz zwiększeniem poziom acetylacji w promotorze *bdnf* transkrypcji II i IV. Co więcej nadekspresja HDAC5 w hipokampie blokowała antydepresyjne działanie imipraminy w chronicznym stresie socjalnym u myszy (Tsankova *et al.*, 2006). Epigenetyczna regulacja ekspresji genu *bdnf* odbywa się poprzez metylację (metylacja DNA) i modyfikację histonów (acetylacji, deacetylacji, metylacji histonów). Czynniki stresowe prowadzą do metylacji *bdnf* powodując zahamowanie transkrypcji. Podania leków normotymicznych odwracało metylację *bdnf* w promotorze IV w szczurzych neuronach hipokampalnych (Dwivedi and Zhang, 2015). Za rolę mechanizmów epigenetycznych w depresji przemawiają również inne badania badania prowadzone na komórkach krwi obwodowej pobranych od osób chorych na depresję oraz potraktowanych *ex vivo* paroksetyną które wykazały redukcję aktywności DNMT1 oraz obniżenie metylacji DNA *bdnf* (Gassen *et al.*, 2015). Ponadto liczne prace sugerują przeciwdepresyjne działanie inhibitorów HDAC (HDACi) w zwierzęcych modelach depresji. Na przykład dostrukturalne podanie związku MS-275 powodowało wzrost poziomu białka CREB (ang. cAMP response elements) i BDNF (ang. brain-derived neurotrophic factor, neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego) u szczurów (Lin *et al.*, 2012). Podobne efekty uzyskano po podaniach dootrzewnowych kwasu walproinowego (VPA) oraz maslanu sodu (ang. *Sodium butyrate*, SB), czemu towarzyszyło obniżenie czasu bezruchu w teście wymuszonego pływania i zawieszenia za ogon (Yamawaki *et al.*, 2012; Han A, Sung YB, Chung SY, 2014). Covington III i współpracownicy po podaniach dostrukturalnych MS-275 i SAHA (ang. *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*) wykazali podwyższenie poziomu acetylacji H3K14, obniżenie ekspresji HDAC2 oraz zwiększenie ekspresji CREB i co-REST (ang. *REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex*) w jądrze pólężącym. Ponadto po podaniach powyższych HDACi zanotowano zwiększoną ekspresję genów *slc17a*, *nrn1*, *rab3b*, *sin3b* i *tnfrsf1a*, czyli zmiany identyczne do obserwowanych po podaniach fluoksetyny (Herbert E Covington *et al.*, 2009).

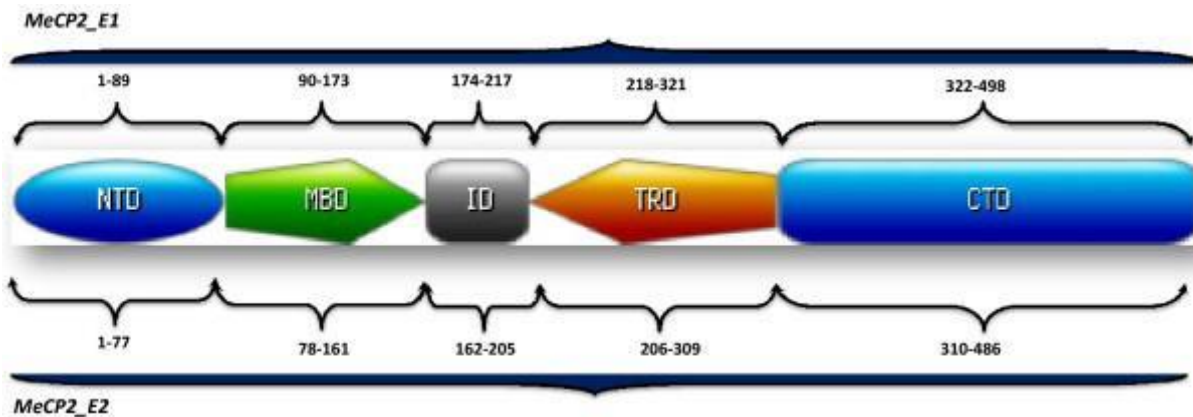


### 3. MeCP2

#### 3.1 Ogólna charakterystyka MeCP2

Białko MeCP2 (ang. *Methyl-CpG Binding Protein 2*) jest powszechnie występuje w wielu tkankach ludzkiego organizmu (w tym w jajnikach, prostaty, płucach, sercu, czy mózgu (Fagerberg *et al.*, 2014). Spośród wymienionych, najwyższa ekspresja jest notowana w mózgu, głównie w jądrze komórkowym jak i cytoplazmie komórek nerwowych. MeCP2 odgrywa szczególną rolę w rozwoju embrionalnym oraz neurologicznym u ssaków (dojrzewanie neuronów i synaptogeneza, różnicowanie astrocytów). Niedobór MeCP2 w neuronach skutkuje nieprawidłowym rozwojem dendrytów i aksonów, jak również nasileniem procesów neurotoksyczności poprzez nadmierne uwalnianie glutaminianu (Díaz de León-Guerrero, Pedraza-Alva and Pérez-Martínez, 2011).

MeCP2 wraz z białkami MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 i Kaiso należy do rodziny białek MBD (ang. *Methyl binding domain*) . wiążących 5-metylocytozynę (5mC). Białka MeCP2 oraz MBD 1 i 2, w przeciwieństwie do MBD3 i MBD4, hamują transkrypcję i rearanżację chromatyny poprzez wiązanie do metylowanego DNA. MeCP2 do efektywnego wiązania DNA wymaga cztery lub więcej powtórzeń A/T (Adenina/Tymina) sąsiadujących z metly-CpG (Klose *et al.*, 2005) ponadto może również wiązać się do metylowanej cytozyny trinukeotydu (mCAC) (Lagger *et al.*, 2017). Białko to zbudowane jest z 486 aminokwasów o łącznej masie 53 kDa (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MECP2>). MeCP2 hamuje transkrypcję głównie poprzez rekrutację kompleksu represorów takich jak m.in.: NCoR/SMART, SIN3a i białek modyfikujących chromatynę HDAC3 (Chahrour *et al.*, 2008; Lyst *et al.*, 2013). Gen *mecp2* składa się z 9 eksonów u ludzi i 4 eksonów u myszy i jest zlokalizowany na Xq28 chromosomie. Białka MeCP2 zawierają N-terminalnej domeny (NTD, ang. *N-terminal domain*), MBD (domena wiążąca się do metylacji, ang. *Methyl binding domain*), interwiniującej domena (ID) stabilizującej MBD, oraz TRD (domena represjonująca transkrypcję, ang. *Transcriptional Repression Domain*) i CTD  $\alpha$  i  $\beta$  (domena C-terminalna, ang. *C-terminal Binding Domain*). MBD jak i TRD związane są z represją transkrypcji poprzez interakcje z metylovanym CpG DNA, natomiast pozostałe domeny uczestniczą w niezależnych od metlowanego DNA oddziaływaniach MECP2 (Claveria-Gimeno *et al.*, 2017)



Ryc.1. Strukturalne domeny MeCP2: NTD, MBD, ID, TRD, CTD, E1;E2 – wariant splicing-izofорма 1 i 2. MeCP2\_E1 transkrybowany bardziej efektywnie w mózgu niż E2 (Sheikh *et al.*, 2013)

### 3.2 Fosforylacja MeCP2 S421 oraz interakcja miR-132/212

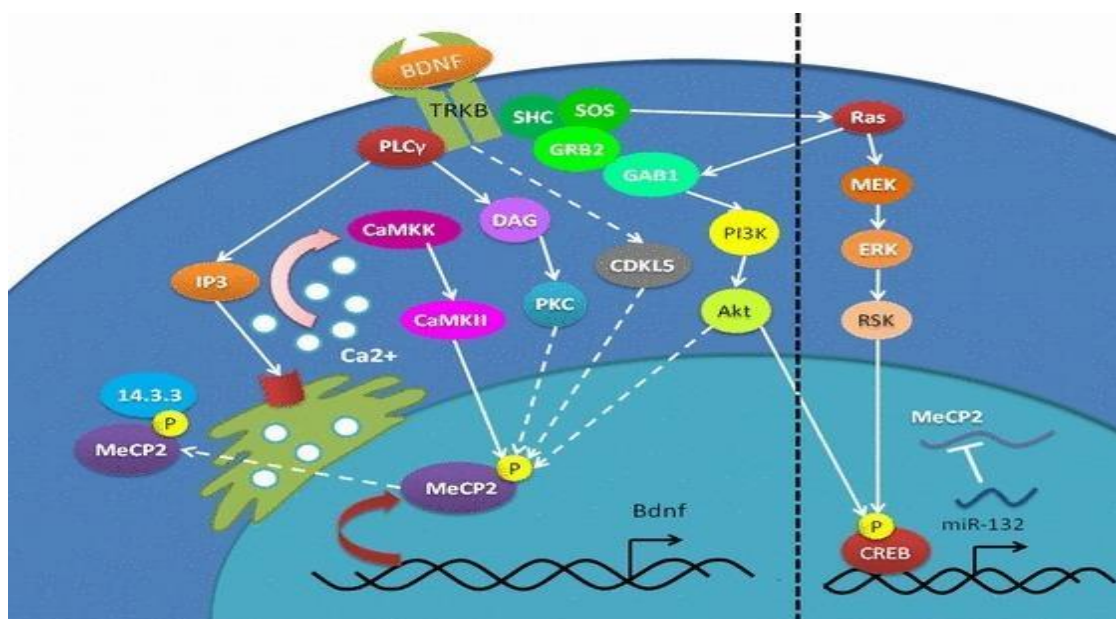
MeCP2 może ulegać fosforylacji w pozycji 13, 80, 116, 216, 229, 424 oraz 421 przy czym ta ostatnia odbywa się z udziałem CaMK2 (ang. *Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*, zależna od wapnia kinaza II) (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Z2D6>). Fosforylacja seryny 421 w mózgu prowadzi do regulacji wzrostu dendrytów i ich dojrzewania oraz zależnej od wapnia aktywacji transkrypcji *bdnf* (Zhou *et al.*, 2006). Ostatnie badania wykazały, iż fosforylacja S421 MeCP2 indukowana jest poprzez czynniki wzrostu regulowane przez kinazę B Aurora i bierze udział w proliferacji i różnicowaniu dojrzałych nerwowych komórek progenitorowych (aNPC) przez ścieżkę sygnałową Notch. Ponadto fosforylacja S421 regulowaniu odgrywa ważną rolę w regulacji procesów uczeniu się, pamięci i skalowania synaptycznego. Wykazano, że myszy z mutacją S421 powodującą zmianę seryny na kwas glutaminowy w pozycji 421 charakteryzują się upośledzeniem w uczeniu się i pamięci w teście warunkowania strachu (ang. *Fear Conditioning Test*) oraz labiryntu wodnego Morrisa (ang. *Morris Water Maze*) (Zhong *et al.*, 2018). Badania biochemiczne wskazują, iż wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia poprzez aktywację receptorów NMDA lub L-VSCC prowadzi do fosforylacji S421 na drodze szlaku kinaz CaMKII/CaMKIV (Damen and Heumann, 2013).

MeCP2 jak każdy gen regulowany jest poprzez interakcje z jednoniciowym RNA – miRNA, a w szczególności mir-132 i mir-212. Zarówno mir-132 jak i mir-212 posiadają zbliżone miejsce wiążące „seed” co oznacza iż regulują podobne geny. Mir-132/212 reguluje morfologię neuronów w korze i hipokampie, bierze udział w plastyczności synaptycznej, angiogenezie i reakcjach zapalnych (Mendoza-Viveros, Chiang, Jonathan L.K. Ong, *et al.*, 2017). Klaster miR-132/212 oprócz regulacji transkrypcji MeCP2 wpływa również na poziom ekspresji CREB i REST. Regulacja miR-132/212

odbywa się poprzez zaangażowanie ERK1/2 i częściowo MSK1/2 może prowadzić do aktywacji ekspresji BDNF. Ponadto miR-132 uczestniczy w mechanizmie sprzężenia zwrotnego zaangażowanego w utrzymanie kontroli nad ekspresją MeCP2/BDNF. Up-regulacja miR-132 będąca wynikiem stymulacji BDNF neuronów korowych może prowadzić pośrednio do zależnej od BDNF indukcji ekspresji podjednostek NR2A, NR2B i GluR1. Zaburzenia ekspresji miR-132/212 powodują wady rozwojowe oraz choroby mózgowie takie jak choroba: Huntingtona, Parkinsona, Alzheimera, Schizofrenia itp (Wanet *et al.*, 2012).

### 3.3 Wpływ MeCP2 na poziom genu *bdnf*

Jak już wspomniano MeCP2 wpływać na ekspresję wielu różnych genów poprzez tworzenie kompleksów represorowych z czynnikami transkrypcji oraz ko-represorami jak jak HDAC/Sin3. Jednym z takich genów jest *bdnf*. Gen *bdnf* u gryzoni składa się z 5' niekodującego i 3' kodującego egzonu. Egzon IV genu *bdnf* modulowany jest poprzez element CRE białka CREB co prowadzi do aktywacji transkrypcji. MeCP2 natomiast wiąże selektywnie miejsce CRE promotora genu *bdnf* prowadząc do represji transkrypcji genu. W neuronach podczas depolaryzacji dochodzi do dysocjacji kompleksu MeCP2-CREB od promotora i aktywacji transkrypcji genu poprzez fosforylację MeCP2 przez CaMKII (Klose and Bird, 2006; Seo *et al.*, 2016). Fosforylacja CREB prowadzi do podwyższonej ekspresji miR-132, które hamuje ekspresję MeCP2. Nie mniej jednak zmniejszona ekspresja MeCP2 nie wpływa na zwiększenie poziomu BDNF (również BDNF aktywuje ekspresję miR-132) (Ooi and Wood, 2008) co prowadzi do zachowania homeostazy pomiędzy fosforylacją CREB oraz MeCP2 i regulacją BDNF. Taka regulacja BDNF opisywana jest u szczurów w modelu samopodawania kokainy.



Ryc.2. Aktywacja BDNF poprzez fosforylację MeCP2/CaMKII lub/i CDKL5 oraz pętla zwrotna regulacji MeCP2 poprzez wzrost miR-132 (Díaz de León-Guerrero et al. 2011)

### 3.4 Zaburzenia MeCP2, a choroby człowieka

#### 3.4.1 MeCP2 w chorobach o podłożu neurologicznym

Zaburzenia w funkcji MeCP2 spowodowane mutacjami oraz regulacją jego ekspresji powodują liczne choroby o podłożu neurologicznym. Jedną z flagowych chorób człowieka uwarunkowanych z funkcją MeCP2 jest Zespół Retta.

Zespół Retta jest zespołem rozwojowym o uwarunkowaniu genetycznym dotyczącym w większości dziewczynki z częstością 1:10.000. Objawy uwidaczniają się już w pierwszych miesiącach życia dziecka i dotyczą zaburzeń rozwoju motorycznego. W pierwszych latach dzieci wykazują problemy z mową, ruchem oraz pojawiają się napady padaczkowe i bezdechy. Zespołowi Retta towarzyszą również osteoporoza, skolioza, spastyczność, niedowaga, zaburzenia kardiologiczne i napięcia mięśniowe (Vashi and Justice, 2019a). Typowy Zespół Retta zapoczątkowuje mutacja *de novo* genu *mecp2* jednego z chromosomu XX (95% występowania zespołu Retta) lub duże delecje w obrębie tego genu (15% zapadalności na tę chorobę). Inaktywacja jednego z chromosomu X powoduje mozaikowość fenotypową u chorych (Vashi and Justice, 2019a). Nietypowy Zespół Retta związany jest natomiast z mutacjami genów CDKL5 (powoduje wczesne napady drgawkowe w RTT) lub FOXP1 (Zapella Variant – dotyczy osobników męskich) Nietypowy Zespół Retta związany jest natomiast z mutacjami genów CDKL5 (powoduje Early Seizure RTT) lub FOXP1 (Zapella Variant – dotyczy osobników męskich) (Shovlin and Tropea, 2018b). W Zespole Retta upośledzony jest również system Redox (odpowiedzialny za uwalnianie reaktywnych form tlenu) co doprowadza do uszkodzeń tkanek pod wpływem stresu oksydacyjnego. W surowicy krwi pacjentek wykazano zwiększony poziom uszkodzenia lipidów oraz zmniejszony poziom dysmutazy ponadtlenkowej (Müller, 2019) jak i dysfunkcję mitochondriów oraz wzrost receptorów AMPA1 i AMPA2 i zmniejszenie ekspresji genu dla receptora GABA – *GABRB3*. Zespół Retta charakteryzuje się upregulacją *EAAT1* i *EAAT2* w mózgu, co powoduje nadmierne uwalnianie glutaminianu przez mikroglej i zaburzenie struktury dendrytycznej komórek nerwowych (Shovlin and Tropea, 2018a). Innym receptorem represjonowanym w Zespole Retta jest metabotropowy receptor mGluR7. Sugeruje się, iż jego ekspresja jest znacznie obniżona u pacjentów RTT w neuronach motorycznych oraz u myszy z knockout *MeCP2* w synaptosomalnej frakcji hipokampalnej. Co więcej podanie PAMs (pozytywne modulatory allosteryczne) VU0422288 i VU0155094 odwraca zmiany w transmisji synaptycznej SC-CA1 (Schaffer collateral-CA1) u myszy RTT (Fisher *et al.*, 2018). Terapia RTT jest terapią zachowawczą polegającą na poprawie

przewodnictwa neurotransmiterów, metabolizmu komórki. Badania przedkliniczne wykazały m.in. pozytywny wpływ SSRI (citalopramu) oraz ketaminy na poprawę funkcji motorycznych u pacjentów RTT. Podania czynników wzrostu, takich jak BDNF czy IGF, również wpływały na znaczną poprawę motoryki u zwierząt z modulowanym Zespołem Retta. Ostatnie badania dotyczące terapii RTT skupiają się na próbach wprowadzenia kopii MeCP2 do organizmu, jednak wiąże się to ze znaczną toksycznością neuronalną i wątrobową (Vashi and Justice, 2019b).

Ze względu na szeroką rolę MeCP2 plastyczności, dojrzewaniu neuronów i modyfikacji epigenetycznych czynnik ten może towarzyszyć wielu chorobom neurologicznym. Dlatego też zmiany MeCP2 obserwuje się w chorobach takich jak: Autyzm, Parkinson czy Alzheimer. Jednak rola jaką odgrywa w patomechanizmie tych chorób nie jest znana. Zespołowi Retta często towarzyszą napady padaczkowe. Zespół drgawek związanych z duplikacją MeCP2 (MeCPdup) charakteryzuje się obecnością toniczno-klonicznych ruchów i atonicznych napadów mioklonicznych i częściej występuje u osobników płci męskiej. W syndromie MeCPdup oprócz drgawek występują często zachowania autystyczne i zaburzenie funkcji motorycznych. Leczenie jest trudne często występuje oporność na stosowaną terapię. Badania nad nowymi lekami wykazały iż stosowanie walproinianu sodu (VPA) często skutkuje zmniejszeniem drgawek w stosunku do kontroli. VPA jest inhibitorem deacetylaz hisonowej ponadto zwiększa poziom GABA i wpływa na kanały potasowe (*Sodium valproate / C8H15NaO2 - PubChem*, 2018). Nie jest znany mechanizm działania VPA na lekooporny syndrom eplipsji związany z duplikacją MeCP2 (Rajaprakash, Richer and Sell, 2018). Szacuje się iż około 17,6% pacjentów z zespołem RTT jest diagnozowanych jako pacjenci autystyczni (ang. Autism spectrum disorders - ASDs). Ponadto modele zwierzęce z wyciszeniem genu *MeCP2* wykazują behavior naśladujący ASDs. GWAS i baza dbSNP skorelowała trzy podstawowe mutacje w MeCP2 z ASDs, które wpływają na morfologię drzewka dendrytycznego oraz przeżywalność neuronów (Wen *et al.*, 2017). MeCP2 spełnia również funkcję rekrutora represorów transkrypcji. Neurony deficytowych ANKRD11 (ang. Ankyrin repeat domain-containing protein 11) charakteryzują się zmniejszonym poziomem BDNF/TrkB przy jednoczesnym zwiększeniu poziomu MeCP2. Haploinsuficjencja genu ANKRD11 jest charakterystyczna dla zespołu KBG objawiającego się zaburzeniami intelektualnymi, drgawkami i zachowaniem autystycznym (Ka and Kim, 2018). Vaccaro i współpracownicy poddali skringowi krew pacjentów ASDs i wykazali szeroki wachlarz zmian epigenetycznych m.in. MIR-199a (regulator MeCP2), który może być potencjalnym biomarkem tej choroby (Vaccaro *et al.*, 2018). Rola MeCP2 jako epigenetycznego faktora w modulacji DNA opisywana jest również w chorobie Huntingtona. Sugeruje się iż interakcja Htt (zmutowane białko huntingtyna) z MeCP2 oddziałuje na ubiqintynację i transkrypcję BDNF znacznie bardziej niż sama Htt (McFarland *et al.*, 2014). Nadekspresja MeCP2 badana jest w chorobie Parkinsona jako terapeutyczny czynnik w regulacji funkcji neuronów dopaminergicznych i jako

czynnik anty-apoptotyczny (Xie *et al.*, 2013). Choroba Alzheimera nie jest chorobą o ściśle genetycznym profilu. Sugeruje się udział białka prekursorowego amyloidu- $\beta$  (A $\beta$ PP) w powstawaniu tej choroby. Ostatnie badania wykazały modulujący wpływ MeCP2 na BDNF w neuronach korowych myszy. Nadekspresja tego białka związana jest ze zwiększeniem poziomu BDNF jak i NT-3 i NT-4/5 w hipokampie u myszy Tg-APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> (Choi *et al.*, 2019).

### 3.4.2 Uzależnienia

Rola MeCP2 w uzależnieniach opiera się na jego zdolności do regulowania aktywności chromatyny poprzez represję bądź aktywację genów. Podania kokainy prowadzą do metylacji DNA. MeCP2 przyłącza się do hemi-metylowanego DNA i rekrutuje kompleks represorowy, co prowadzi do zmniejszenia transkrypcji genów. W przypadku podań metanolu/etanolu kompleks represorowy G9a/DNMT3A/MeCP2 również odgrywa znaczną rolę w procesie uzależnienia, poprzez wpływ na zmiany neurodegeneracyjne zachodzące w syndromie uzależnienia alkoholowego zmniejszając poziom m.in. BDNF oraz pCREB (Subbanna *et al.*, 2014). Aktywacja genów odbywa się najczęściej poprzez fosforylację MeCP2. Amfetamina fosforyluje MeCP2 na serynie Ser421, co zmniejsza poziom MeCP2 w jądrze pólężącym i prowadzi do wystąpienia hiperaktywności lokomotorycznej. Mutacje powodujące brak fosforylacji S421 związane są z brakiem odpowiedzi na indukowaną amfetaminą nadaktywność lokomotoryczną oraz samopodawanie kokainy u gryzoni (Anderson *et al.*, 2018). Cotto i współpracownicy potwierdzili, iż samopodawanie kokainy 2 godziny dziennie przez 10 dni powoduje zwiększenie poziomu białka MeCP2 w hipokampie i w prążkowie, a jego fosforylacja w polu CA3 hipokampa powoduje zwiększenie poziomu pro-BDNF (forma pro-BDNF) w tych strukturach. Co ciekawe, jednak zwiększona ekspresja MeCP2 w mikrogleju nie korelowała z ekspresją BDNF. Ponadto samopodawanie kokainy powodowało zwiększoną translokację MeCP2 z jądra do cytoplazmy w komórkach mikrogleju, co potwierdza sugeruje odmienną rolę MeCP2 w komórkach nerwowych i mikrogleju (Cotto *et al.*, 2018). Psychostymulująca rola MeCP2 wywołana podaniami heroiny potwierdzona została przez Yan i współpracowników. Wśród licznych grup miRNA, miR-218 (cel dla MeCP2) okazał się odgrywać rolę aktywatora uzależnienia wywołanego heroiną. Obniżony poziom miR-218 w jądrze pólężącym obserwowany jest po podaniach heroiny, a jego nadekspresja związana jest z zahamowaniem poszukiwawczym dla heroiny (ang. *heroin seeking behavior*). Ponadto miR-218 jest ściśle zaangażowany w regulację MeCP2. Zwiększony poziom miR-218 wpływa odwrotnie proporcjonalnie na poziom MeCP2 (Yan *et al.*, 2017). Zmniejszony poziom MeCP2 przy jednoczesnym zwiększeniu jego fosforylacji S421 w mPFC (przyśrodkowa kora przedczołowa), ale



nie w jądrze półleżącym i prążkowie, korelował z lepszym wynikiem w teście podejmowania decyzji u szczurów (ang. *risky decision making*), co sugeruje udział MeCP2 w mechanizmie uczenia się (Deng *et al.*, 2018). Wpływ MeCP2 i jego fosforylowanej formy w procesie uzależnień jest szeroko badany, jednakże mechanizmy komórkowe, poprzez które czynnik ten oddziałuje, nie do końca są poznane.

### 3.4.3 Rola MeCP2 w depresji

Badania z ostatnich kilku lat sugerują, iż MeCP2 może odgrywać również ważną rolę w patomechanizmie i terapii depresji. Najczęściej opisywana jest fosforylacja MeCP2 S421 oraz jej wpływ na regulację genów m.in. BDNF. Fosforylacja MeCP2 S421 związana jest z aktywacją transkrypcji genu *bdnf*. W fazie spoczynku neuronów (neuron spolaryzowany) MeCP2 jest związany z promotorem III genu *bdnf* co powoduje inaktywację transkrypcji. W neuronach depolaryzowanych dochodzi do fosforylacji MeCP2 za pomocą ścieżki *Camk2/4*, uwolnienia promotora dla BDNF i aktywacji genu.

Jedną z prac opisuje interakcje MeCP2/Deaf1 (ang. *Deformed epidermal autoregulatory factor 1 homolog*) z promotorem genu *HTR1A*. Stwierdzono iż myszy *Deaf1A<sup>-/-</sup>* mają zwiększoną ilość autoreceptorów 5-HT<sub>1A</sub> przez co dochodzi do zmniejszenia poziomu 5-HT w jądrach szwu i wytworzenia behawioru depresyjno/maniakalnego. Ponadto MeCP2 wiąże się z Deaf1 przez co reguluje ekspresję *HTR1A*. Myszy z warunkowym knockoutem MeCP2 w neuronach 5-HT (*MeCP2<sup>TPH2creERT2-flx/Y</sup>*) warunkują zwiększony poziom i funkcję autoreceptorów 5-HT<sub>1A</sub> co potwierdza rolę MeCP2 jako represora genu *HTR1A* w badaniach *in vivo* (Philippe *et al.*, 2018). U pacjentów ze zdiagnozowaną MDD potwierdzono iż deregulacja mir-132 (reguluje między innymi MeCP2) wpływa na funkcję układu czołowo-limbicznego. Nadekspresja mir-132 w korze czołowej prowadzi do zredukowania objętości czarnej materii w rejonach przedczołowych oraz fALEF (amplituda fluktuacji niskiej częstotliwości, ang. *Amplitude of low-frequency fluctuation*) obserwowanych za pomocą MRI, a w hipokampie odpowiedzialna jest za kontrolę nad rozwojem kolców dendrytycznych oraz ingeruje w ekspresję BDNF (Qi *et al.*, 2018). W krwi obwodowej pacjentów z MDD wykazano również podwyższony poziom ekspresji mir-132, co jest negatywnie skorelowane z poziomem białka MeCP2 i BDNF. W hipokampalnych neuronach pierwotnych transfekowanych wektorem sh-MeCP2 stwierdzono zwiększoną ekspresję mir-132 zmniejszony poziom genu dla BDNF, co pokazuje iż MeCP2 może regulować ekspresję mir-132 (SU *et al.*, 2015).

Od fosforylacji MeCP2 zależny jest również gen *Avp* (ang. *arginine vasopressin gene*), *Crh* (ang. *corticotropin releasing hormone*) oraz *Pomc* (ang. *Proopiomelanocortin*), które wzmacniają odpowiedź osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) na czynniki early life stress (ELS) (Ausió,

2016). Okazało się również iż fosforylacja S421 MeCP2 jest niezbędna do odpowiedzi terapeutycznej imipraminy i citalopramu u myszy KI MeCP2 (myszy knock-in MeCP2), które wykazują wrażliwość na działanie czynników stresowych (Hutchinson *et al.*, 2012a). Pomimo to niewiele jest prac opisujących wpływ fosofrylacji S421 MeCP2 na odpowiedź terapeutyczną leków przeciwdepresyjnych.

## CEL PRACY:

MeCP2 jest czynnikiem regulującym wiele procesów komórkowych. Ze względu na jego powszechne występowanie w mózgu i kluczowe znaczenie w regulacji ekspresji wybranych genów, sugeruje się, że MeCP2 może mieć istotne znaczenie w patomechanizmie chorób psychicznych, w tym depresji.

Celem niniejszej pracy było określenie roli MeCP2 w patomechanizmie oraz farmakoterapii zaburzeń depresyjnych poprzez:

- Zbadanie i analizę porównawczą zmian poziomu ekspresji genu *mecp2* oraz białka MeCP2 i jego aktywacji (poziom MeCP2 ufosforylowanego na S421, p-S421-MeCP2) w hipokampie i korze czołowej ofiar samobójstw oraz zwierząt z zaindukowanymi objawami podobnymi do depresji u ludzi (zwierzęce modele depresji: usunięcia opuszek węchowych i przewlekłego łagodnego stresu)
- Zbadanie i analizę porównawczą zmian poziomu ekspresji genu *mecp2* oraz białka MeCP2 i jego aktywacji (poziom MeCP2 ufosforylowanego na S421) w hipokampie i korze czołowej szczurów poddanych usunięciu opuszek węchowych oraz przewlekłemu łagodnemu stresowi otrzymujących leki przeciwdepresyjne (imipramina/amitryptylina, fluoksetyna, escitalopram, wenlafaksyna, olanzapina)
- Określenie zależności pomiędzy poziomem MeCP2/p-S421-MeCP2 a ekspresją *bdnf* oraz poziomem białka BDNF w hipokampie i korze czołowej szczurów poddanych usunięciu opuszek węchowych oraz przewlekłemu łagodnemu stresowi otrzymujących w/w leki przeciwdepresyjne
- Określenie zależności pomiędzy poziomem MeCP2/p-S421-MeCP2 a poziomem białek *acH3K9/14*, *HDAC2*, *HDAC3*, *H3K27me2*, *Sin3a* w hipokampie i korze czołowej szczurów poddanych usunięciu opuszek węchowych oraz przewlekłemu łagodnemu stresowi otrzymujących w/w leki przeciwdepresyjne
- Określenie zależności pomiędzy ekspresją *mecp2*, poziomem MeCP2/p-S421-MeCP2 a ekspresją *miR-132/212* w hipokampie i korze czołowej szczurów poddanych usunięciu opuszek węchowych oraz przewlekłemu łagodnemu stresowi otrzymujących w/w leki przeciwdepresyjne

## MATERIAŁY I METODY:

Głównym celem niniejszej pracy było przeprowadzenie szeregu analiz biochemicznych w tkankach ludzkich pochodzących od ofiar samobójstw oraz w tkankach zwierząt z modelowanymi objawami depresji oraz otrzymujących leki przeciwdepresyjne. Celem potwierdzenia lub zaprzeczenia uniwersalności badanych mechanizmów, w badaniach wykorzystano dwa modele depresji oraz 4 leki o różnych mechanizmach działania.

### 1. Tkanki ludzkie *post mortem*

Kora czołowa i hipokamp zostały pobrane pośmiertnie od siedemnastu osób, które popełniły samobójstwo (Samobójcy; średnia wieku  $\pm$  SEM =  $35,8 \pm 4,3$  lata) oraz ośmiu osób, których śmierć była przypadkowa (Kontrola; średnia wieku  $\pm$  SEM =  $34,3 \pm 6,0$  lata). Łącznie grupę badaną i kontrolną stanowiły tkanki pozyskane od siedmiu kobiet i szesnastu mężczyzn. Wszystkie tkanki zostały skolekcjonowane przez pracowników Wydziału Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w ramach grantu KBN nr 6P05B 142 20 po uprzednim uzyskaniu zgody Komisji Etycznej UJ CM. Zgodnie z dostępną dokumentacją medyczną, osoby zaklasyfikowane do grupy kontrolnej jak i badanej nie były leczone z powodu przewlekłych chorób ośrodkowego układu nerwowego oraz innych chorób somatycznych. Od momentu pobrania tkanek do czasu rozpoczęcia analiz biochemicznych, materiał przechowywano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 2. Ogólna charakterystyka demograficzna tkanek post mortem wykorzystanych w badaniach biochemicznych (K-kobieta; M-mężczyzna) (Sowa-Kućma *et al.*, 2013)

| Lp. | Wiek (lata) | Płeć<br>(K-kobieta;<br>M-mężczyzna) | Przyczyna śmierci                  | Grupa<br>(K-kontrola;<br>S-badana<br>samobójcy) |
|-----|-------------|-------------------------------------|------------------------------------|---|
| 1   | 33          | M                                   | Samobójstwo przez powieszenie      | S   |
| 2   | 29          | M                                   | Samobójstwo przez powieszenie      | S   |
| 3   | 21          | K                                   | Samobójstwo przez skok z wysokości | S   |
| 4   | 17          | M                                   | Samobójstwo przez powieszenie      | S   |
| 5   | 47          | M                                   | Samobójstwo przez powieszenie      | S   |
| 6   | 19          | M                                   | Samobójstwo przez skok pod pociąg  | S   |

|           |    |   |   |   |
|-----------|----|---|---|---|
| <b>7</b>  | 21 | K | Samobójstwo przez przedawkowanie (doksepina + klomipramina) | S |
| <b>8</b>  | 75 | K | Samobójstwo przez samookaleczenie                           | S |
| <b>9</b>  | 17 | M | Kontrola/uraz czaszki                                       | K |
| <b>10</b> | 29 | K | Samobójstwo przez skok z wysokości                          | S |
| <b>11</b> | 20 | M | Samobójstwo przez przedawkowanie (hydroksyzyna + perazyna)  | S |
| <b>12</b> | 58 | M | Samobójstwo przez przedawkowanie (klometiazol + diazepam)   | S |
| <b>13</b> | 55 | M | Samobójstwo przez powieszenie                               | S |
| <b>14</b> | 44 | K | Kontrola/wypadek drogowy                                    | K |
| <b>15</b> | 20 | K | Samobójstwo przez utonięcie                                 | S |
| <b>16</b> | 20 | M | Kontrola/zatrucie tlenkiem węgla                            | K |
| <b>17</b> | 55 | K | Samobójstwo przez przedawkowanie (diazepam + etanol)        | S |
| <b>18</b> | 54 | M | Kontrola/zawał mięśnia sercowego                            | K |
| <b>19</b> | 29 | M | Kontrola/powieszenie  | K |
| <b>20</b> | 58 | M | Samobójstwo przez powieszenie                               | S |
| <b>21</b> | 42 | M | Kontrola/zawał mięśnia sercowego                            | K |
| <b>22</b> | 24 | M | Samobójstwo przez skok z wysokości                          | S |
| <b>23</b> | 19 | M | Samobójstwo przez powieszenie                               | S |

## 2. Badania na zwierzętach

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach – samcach szczepów szczepu Sprague Dawley (model usunięcia opuszek węchowych; ang. olfactory bulbectomy, OB) oraz Wistar (model przewlekłego łagodnego stresu; ang. chronic mild stress, CMS) z hodowli Charles River Laboratories (Niemcy). Zwierzęta były traktowane zgodnie z wytycznymi Komitetu ds. Ochrony i Użytkowania Zwierząt. Zaplanowane procedury oraz liczebność grup zostały pozytywnie zaopiniowane przez II Loaklną Komisję Etyczną przy Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk (IF PAN) w Krakowie. Zastosowanie reguły 3R w projekcie miało na celu zminimalizowanie ilości użytych zwierząt oraz ich cierpienia.

Zwierzęta, po przebytych okresie kwarantanny (2 tygodnie), przetrzymywano w pomieszczeniach o stałej temperaturze  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  i wilgotności  $55\pm 5\%$ , w standardowych klatkach plastikowych z wyściółką trocinową, w naturalnym cyklu dobowym (12:12; wyjątek: model CMS, gdzie okresowo stosowano zmienną amplitudę oświetlenia). W trakcie trwania eksperymentów, szczury miały nieograniczony dostęp do wody i pokarmu, z wyjątkiem czasu deprywacji od wody i paszy w modelu CMS.

## *2.1. Zwierzęce modele depresji*

### *2.1.1. Model przewlekłego łagodnego stresu (ang. Chronic Mild Stress, CMS)*

Chroniczny łagodny stres jest jednym z najlepiej zwalidowanych modeli depresji u zwierząt, który naśladuje objawy depresji indukowane negatywnymi bodźcami środowiskowymi. W modelu tym poprzez długotrwałe stosowanie łagodnych bodźców stresowych indukuje się u zwierząt (szczury lub myszy) zachowania typu anhedonicznego (brak odczuwania przyjemności), co potwierdza stosowany do weryfikacji test spożycia 1% roztworu sacharozy.

Procedurę przewlekłego łagodnego stresu przeprowadzono zgodnie z procedurą metodyką opisaną przez Szewczyk i wsp. (B Szewczyk et al., 2014). Przed zastosowaniem u szczurów bodźców stresowych, wykonano test spożycia 1% r-ru sacharozy (ang. *Sucrose Preference Test*, SPT) celem wykluczenia różnic osobniczych pomiędzy zwierzętami. Następnie dokonano podziału zwierząt na dwie główne grupy eksperymentalne – stresowaną i niestresowaną (kontrola), które umieszczono w dwóch odizolowanych pomieszczeniach. W grupie stresowanej rozpoczęto stosowanie czynników stresowych, które kontynuowano przez 7 kolejnych tygodni. Każdy tydzień składał się z dwóch okresów: deprywacji od wody i pokarmu, pochylenia klatki o  $45^{\circ}$ , zmiennej iluminacji (przerywane światło), moczenia ściółki, oświetlenia stroboskopowego o niskiej intensywności oraz jednego okresu obecności innego osobnika w klatce bytowej. Każdy tydzień zawierał również trzy okresy bez czynnika stresowego. Czynniki stresowe były stosowane nieprzerwanie w dzień i noc

przez 10-14 godzin. Zwierzęta kontrolne, podobnie jak stresowane, przebywały również pojedynczo w klatkach i w trakcie całego eksperymentu były poddawane handlingowi. Po każdym tygodniu stresowania u wszystkich zwierząt przeprowadzono SPT celem potwierdzenia/weryfikacji negatywnego wpływu CMS na zachowanie zwierząt. Po 2 tygodniach stresowania, zwierzęta podzielono na podgrupy i rozpoczęto podawanie badanych związków (Tab. 2) przez kolejne 5 tygodni. W celu potwierdzenia behawioralnej na zastosowane leki, cyklicznie co tydzień wykonywano u wszystkich zwierząt SPT.



Ryc.3. Schemat przeprowadzenia procedury przewlekłego łagodnego stresu

### 2.1.2. Model Usunięcia Opuszek Węchowych (OB)

Model OB jest stosowany do wywołania u zwierząt (myszy, szczury) zachowania podobnego do depresji agitowanej u ludzi. U szczurów pozbawionych opuszek węchowych obserwuje się m.in. hiperaktywność w teście wolnego pola.

Model usunięcia opuszek węchowych został wykonany zgodnie z metodą zoptymalizowaną i od wielu lat stosowaną z powodzeniem w zakładzie Neurobiologii Instytutu Farmakologii PANIF PAN w Krakowie (Bernadeta Szewczyk et al., 2014b). Przed rozpoczęciem eksperymentu, szczury przydzielono do dwóch grup: OB (grupa poddawana operacji usunięcia opuszek węchowych) oraz Sham (grupa poddawana operacji pozorowanej). Następnie przeprowadzono test wolnego pola, celem weryfikacji, czy nie ma istotnych różnic osobniczych pomiędzy zwierzętami przydzielonymi do poszczególnych grup. Następnie przystąpiono do zabiegu chirurgicznego, który przeprowadzano na szczurach o masie ~ 270g.

Przed wykonaniem operacji, szczury wprowadzano w stan anestezji poprzez domięśniowe podanie ketaminy (100 mg/kg) oraz ksylazyny (10 mg/kg). Usunięcie opuszek węchowych przeprowadzono w oparciu o koordynaty z atlasu mózgu szczura (10 mg/kg). Usunięcie opuszek

węchowych przeprowadzono w oparciu o atlas mózgu szczura (Paxinos i Watson; 1998). W skrócie, u szczurów z grupy OB, po wyeksponowaniu kości czaszki, wywiercone zostały otwory, przez które za pomocą pompy próżniowej wyssano opuszki węchowe. Otwory wypełniono Spongostanem (środek hemostatyczny), a skórę głowy zaszyto przy uzyciu nylonowych nici chirurgicznych. Zwierzęta z grupy Sham, miały wykonane te same czynności, z wyjątkiem odsysania opuszek węchowych. Bezpośrednio po zabiegu oraz przez 2 kolejne dni po operacji, szczury otrzymywały podskórnym Metoxicam w dawce 0.05 mg/kg jako środek przeciwbólowy i przeciwzapalny przeciwzapalny. Po wybudzeniu, zwierzęta były umieszczane w klatkach bytowych w liczbie 4 osobniki/klatka (2 OB. + 2 Sham). Okres rekonwalescencji wynosił dwa tygodnie, w ciągu których zwierzęta były poddawane wnikliwej obserwacji i handlingowi, celem minimalizowania stresu przy podejmowaniu kolejnych czynności. . Po upływie 2 tygodni, przeprowadzono test wolnego pola celem weryfikacji zmian behawioralnych indukowanych OB. Następnie dokonano podziału zwierząt na podgrupy i rozpoczęto 2 tygodniowy okres dootrzewnowych podań leków przeciwdepresyjnych o różnych mechanizmach działania (Tab. 4). 24 godziny po podaniu ostatniej dawki leków, wykonano test wolnego pola, celem weryfikacji skuteczności przeciwdepresyjnej związków. Następnie dokonano dekapitacji zwierząt oraz izolacji struktur mózgowych (kora czołowa, hipokamp) do badań biochemicznych. Do dalszych badań pobierano materiał jedynie od tych szczurów z grupy OB., u których stwierdzono usunięcie co najmniej 2/3 objętości opuszek węchowych bez uszkodzenia kory czołowej.



Ryc.4. Schemat przeprowadzenia procedury Usunięcia Opuszek Węchowych

## 2.2.Substancje podawane zwierzętom oraz ich dawkowanie

W eksperymentach na zwierzętach zastosowano 4 związki/leki o różnych mechanizmach działania:



- Amitryptylina 10 mg/kg (OB) lub Imipramina 10 mg/kg (CMS) - Trójpierścieniowe Leki Przeciwd depresyjne,
- Fluoksetyna 10 mg/kg (OB) lub Escitalopram 10 mg/kg (CMS) - Selektywne Inhibitory Wychwytu Zwrotnego Serotoniny,
- Wenlafaksyna 10 mg/kg - Inhibitor Wychwytu Zwrotnego Noradrenaliny i Serotoniny,
- Olanzapina 2 mg/kg - Atypowy lek przeciwpsychotyczny.

Leki podawano w postaci iniekcji dootrzewnowej (i.p.) w objętości 2 ml/kg masy ciała, raz dziennie w godzinach od 8:00 – 12:00 przez okres 2 lub 5 tygodni (odpowiednio OB. i CMS). Jako kontrolę podawano sól fizjologiczną (0.9% NaCl), która była rozpuszczalnikiem dla w/w związków.

Tabela 3. Charakterystyka grup eksperymentalnych w modelu przewlekłego łagodnego stresu

| <b>GRUPY</b>                 |                       | <b>Liczba osobników na grupę<br/>Nie stresowane : stresowane</b> |
|------------------------------|-----------------------|--|
| <b>Kontrola</b>              | <b>Stres</b>          |  |
| <b>Kontrola - NaCl</b>       | Kontrola - NaCl       | 8:8  |
| <b>Imipramina 10 mg/kg</b>   | Imipramina 10 mg/kg   | 8:8  |
| <b>Escitalopram 10 mg/kg</b> | Escitalopram 10 mg/kg | 8:8  |
| <b>Wenlafaksyna 10 mg/kg</b> | Wenlafaksyna 10 mg/kg | 8:8  |
| <b>Olanzapina 2 mg/kg</b>    | Olanzapina 2 mg/kg    | 8:8  |

Tabela 4. Charakterystyka grup eksperymentalnych w modelu usunięcia opuszek węchowych

| <b>GRUPY</b>                  |                        | <b>Liczba osobników na grupę<br/>Sham : OB</b> |
|-------------------------------|------------------------|--|
| <b>Sham</b>                   | <b>OB</b>              |  |
| <b>Kontrola - NaCl</b>        | Kontrola - NaCl        | 8:8  |
| <b>Amitryptylina 10 mg/kg</b> | Amitryptylina 10 mg/kg | 8:8  |
| <b>Fluoksetyna 10 mg/kg</b>   | Fluoksetyna 10 mg/kg   | 8:8  |
| <b>Wenlafaksyna 10 mg/kg</b>  | Wenlafaksyna 10 mg/kg  | 8:8  |
| <b>Olanzapina 2 mg/kg</b>     | Olanzapina 2 mg/kg     | 8:8  |

### 2.3. Testy behawioralne

Celem weryfikacji zmian indukowanych usunięciem opuszek węchowych oraz przewlekłym łagodnym stresem (behawior „prodepresyjny”) oraz efektywności działania zastosowanych leków, u zwierząt w różnych punktach czasowych przeprowadzono test spożycia 1% roztworu sacharozy (CMS) oraz test wolnego pola (OB).

#### 2.3.1 Test Spożycia 1% roztworu sacharozy (SPT)

Test spożycia sacharozy przeprowadzono w 8 punktach czasowych. Pierwszy test wykonano bezpośrednio przed rozpoczęciem procedury CMS (baseline), celem wyeliminowania potencjalnych różnic osobniczych w poborze cukru. Kolejne testy przeprowadzono w cotygodniowych interwałach. Drugi i trzeci test (punkt -7, 0) pozwoliły na weryfikację negatywnego wpływu bodźców stresowych. Kolejne 5 testów umożliwiło weryfikację skuteczności podawanych związków oraz określić szybkość odpowiedzi na zastosowane terapie. Ostatni test wykonano 24 godziny po podaniu dawki leków.

Test spożycia 1% r-ru sacharozy polega na prezentacji szczurom przez 1 godzinę dwóch butelek - jednej z cukrem, drugiej z wodą. Butelka z cukrem jest ważona przed testem i bezpośrednio po jego zakończeniu. 1 dzień przed testem zwierzęta poddaje się deprivacji od pokarmu i wody. U szczurów, które przejawiają objawy anhedonii obserwuje się co najmniej 20% mniejsze spożycie roztworu cukru do w odniesieniu do pomiaru wykonanego przed rozpoczęciem procedury stresowej oraz niestresowanej kontroli do punkty baseline i kontroli nie stresowanej (Zurawek *et al.*, 2017).

#### 2.3.2. Test wolnego pola (ang. *Open Field Test, OFT*)

Test wolnego pola polega na analizowaniu aktywności lokomotorycznej zwierząt i eksploracji przez nie nowego środowiska.

Analizę aktywności zwierząt przeprowadzono 24 godziny po podaniu ostatniej dawki badanych związków, celem weryfikacji ich aktywności (odwracanie zmian indukowanych procedurą OB).

Analiza aktywności lokomotorycznej została przeprowadzona w aparacie na planie koła o średnicy 1m<sup>2</sup> przedzielonym kwadratami 10x10 cm i otoczonym ścianką na wysokości 40-60 cm. Test wykonywany był przy punktowym źródle światła (żarówka o mocy 60W, umieszczona na wysokości 100 cm) umieszczonym nad centralnym punktem aparatu środkiem aparatury. Ambulancję

zliczano przez 3 minuty począwszy od momentu umieszczenia szczura na aparatury centrum aparatu.

### 2.3.3. Pobieranie i przechowywanie tkanek zwierzęcych

Bezpośrednio po zakończeniu eksperymentów, 24 godziny od podania ostatniej dawki leków, zwierzęta były uśmiercane poprzez dekapitację, następnie ich mózgi szybko izolowano z czaszek i przystępowano do izolacji struktur mózgowych (kora czołowa i hipokamp). Uzyskane tkanki zamrażano na suchym lodzie i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu rozpoczęcia kolejnych etapów badań.

### 3. Badania biochemiczne

#### 3.1. Analiza białek metodą Western blot

Analizy Western blot przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Pochwat i wsp. (Pochwat et al., 2015b). Analizy przeprowadzono w dwóch strukturach mózgu – korze czołowej i hipokampie zwierząt (n=8) i ludzi (kontrola n=6; samobójcy n=16). Tkanki homogenizowano za pomocą ultrasonifikatora w 2% roztworze SDS w objętości 100  $\mu$ l na 10 mg tkanki. Tak przygotowane homogenaty poddano obróbce cieplnej przez 10 min w 95°C, a następnie wirowano przez 5 min w 12.000 RPM w 4°C. W zebranym supernatancie oznaczono stężenie białka za pomocą metody BCA z wykorzystaniem gotowego zestawu do oznaczenia białka (ThermoFisher Scientific). Kolejno przygotowano próbki do rozdziału elektroforetycznego. Każda próbka zawierała 30  $\mu$ g białka oraz bufor obciążający. Bezpośrednio po elektroforezie SDS-PAGE w żelach 8-12%, dokonywano transferu białek na membrany nitrocelulozowe i inkubowano w 1% roztworze blokującym [BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit), Roche], celem zablokowania niespecyficznego miejsc wiążących. Następnie inkubowano membrany z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi (Tab. 5) przez całą noc w temperaturze 4°C.

Tabela.5. Przeciwciała I rzędowe wykorzystane do analizy Western blot.

| Nazwa  | host   | Firma         | Masa cząsteczkowa [kDa] |
|--|--|---------------|-------------------------|
| <b><math>\beta</math>-aktyna</b><br><b>białko</b><br><b>referencyjne</b> | monoklonalne<br>przeciwciała<br>antymyśie    | Sigma-Aldrich | 42                      |
| <b>MeCP2</b>   | poliklonalna<br>przeciwciała<br>antyróżlicze | Santa Cruz    | 60                      |
| <b>p-S421-MeCP2</b>  | poliklonalna<br>przeciwciała<br>antyróżlicze | ABGENT        | 55                      |
| <b>Sin3a</b>   | poliklonalna<br>przeciwciała<br>antyróżlicze | Active Motif  | 155                     |

|                  |   |                |    |
|------------------|---|----------------|----|
| <b>HDAC2</b>     | monoklonalne przeciwciała anty-mysie    | Cell Signaling | 55 |
| <b>HDAC3</b>     | monoklonalne przeciwciała anty-mysie    | Cell Signaling | 49 |
| <b>acH3K9/14</b> | poliklonalna przeciwciała anty-królicze | Santa Cruz     | 17 |
| <b>H3K27me2</b>  | monoklonalne przeciwciała anty-mysie    | Active Motif   | 17 |
| <b>BDNF</b>      | poliklonalna przeciwciała anty-królicze | Santa Cruz     | 17 |

Po zakończonej inkubacji membrany przepłukano trzy krotnie przez 10 min w buforze TBST (Tris-kwas borowy-Tween20) i inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami II-rzędowymi (anty-królicze lub anty-mysie IgG przeciwciała skoniungowane z peroksydazą chrznową) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po serii trzech 5-minutowych płukań w TBST dokonano chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek z użyciem Clarity Western ECL Blotting (Bio-Rad) i wizualizacji za pomocą systemu Fujii-Las 1000 (FujiFilm), analizy gęstości optycznej próżków przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Image Gauge ver.4.0 (FujiFilm).

### 3.2. Analiza genów metodą Real-Time PCR

Analiza Real-Time PCR została przeprowadzona wg procedury opisanej przez Pochwat i wsp. (2015b). W skrócie, całkowity RNA wyizolowano z kory czołowej i hipokampa szczurów (n=7-8) przy użyciu TRIzol-u (Invitrogen) oraz mirVana<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (Thermofisher). Do homogenizacji tkanek wykorzystano tissuelyser (QIAGEN). Czystość (stosunek  $A_{260}$  do  $A_{280}$ ), i ilość wyizolowanego całkowitego RNA określono za pomocą spektrofotometru Nanodrop (Thermo Scientific) mierząc absorbancję 260 nm ( $A_{260}$ ). Jakość RNA zwizualizowano na żelu agarozowym poprzez uzyskanie rybosomowego RNA. W celu uzyskania cDNA do analizy PCR użyto jeden nanograma wyizolowanego RNA, który poddano trawieniu DNase I (Sigma-Aldrich) i odwrotnej transkrypcji z użyciem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (random primers; Applied

Biosystems) lub TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit do uzyskania miRNA (random primers; Applied Biosystems). Real-Time PCR przeprowadzono w objętości 18 µl w trzech powtórzeniach za pomocą CFX96 Real-Time System firmy Bio-Rad w standardowych warunkach (aktywacja wstępna 95°C przez 10min, a następnie 40 cykli zawierających: denaturację - 95 °C 15 sekund, elongację i annealing – 60 °C 60 sekund). Jako gen referencyjny (ang. *housekeeping gene*) użyto *gapdh* (analiza genów) oraz *u6* (analiza miRNA).

Do analizy genów i miRNA wybrano następujące sondy TaqMan przedstawione w tabeli 6.

Tabela.6. Zastosowanie sond TaqMan wykorzystywanych do analizy ekspresji genów oraz miRNA.

| Nazwa sondy   | ID            | RefSeq         |
|---------------|---------------|----------------|
| <b>Mir132</b> | Rn04238115_s1 | NR_031878.1    |
| <b>Mir212</b> | Rn04244016_s1 | NR_031925.1    |
| <b>U6</b>     | Rn06374801_g1 | NM_001108636.1 |
| <b>MeCP2</b>  | Rn01529606_g1 | NM_022673.2    |
| <b>BDNF</b>   | Rn02531967_s1 | NM_001270630.1 |
| <b>Gapdh</b>  | Rn01775763_g1 | NM_017008.4    |

$\Delta C_t$  dla każdej próbki, a następnie  $2^{-\Delta C_t}$  uzyskano poprzez porównanie wartości badanych do genów referencyjnych.

#### 4. Analiza Statystyczna

Do analizy statystycznej wyników uzyskanych z tkanek ludzkich wykorzystano test t-Studenta. Wyniki uzyskane w badaniach na zwierzętach oraz w analizach biochemicznych ich tkanek analizowano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji oraz testu post hoc (Newman-Keuls). Wszystkie wartości zaprezentowano jako średnia  $\pm$  SEM (standardowy błąd pomiaru). Wynik uznawano jako statystycznie istotny wówczas gdy  $p < 0,05$ .

Wszystkie analizy statystyczne oraz opracowanie graficzne wyników zostały wykonane przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism ver. 7.0.

**WYNIKI:**

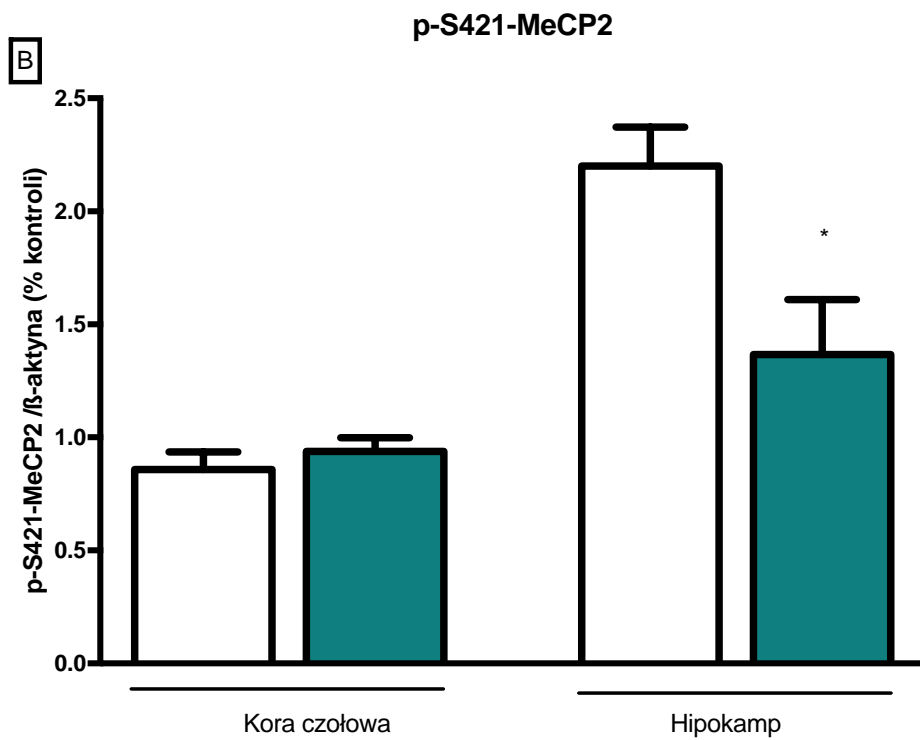
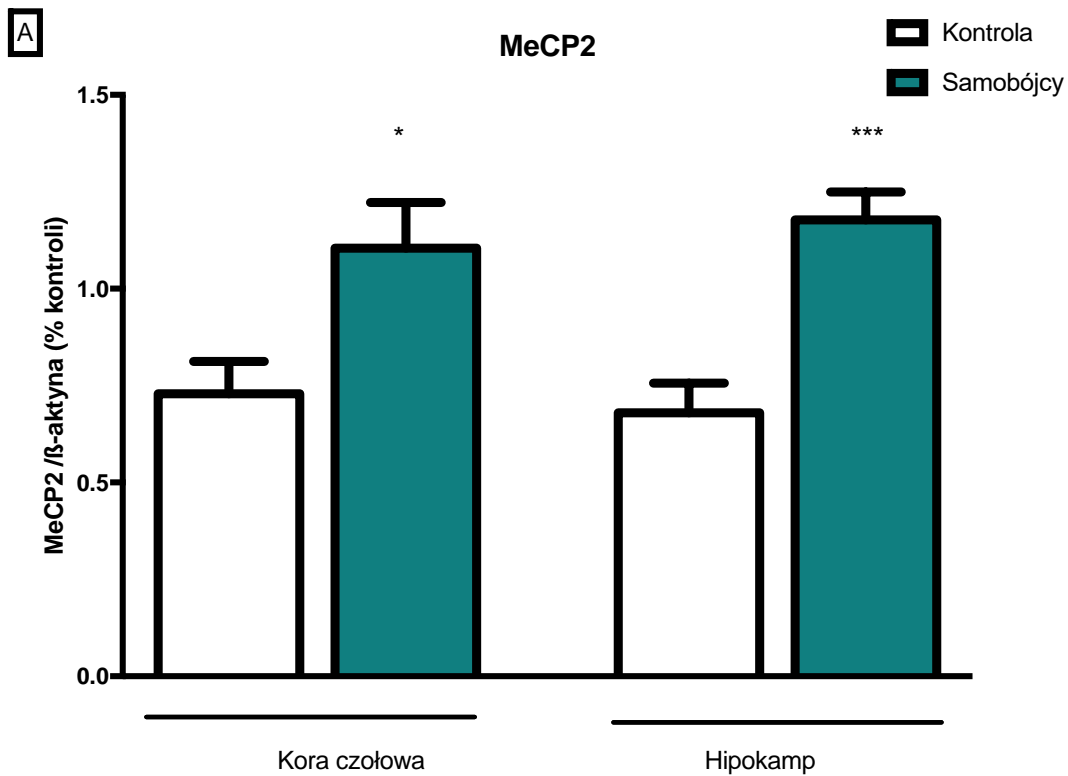
1.1. Analiza zmian poziomu białek w tkankach ludzkich *post mortem* ofiar samobójstw

1.2. Zmiany poziomu białka MeCP2 i jego ufosforylowanej formy p-S421-MeCP2 oraz białka BDNF w hipokampie i korze czołowej

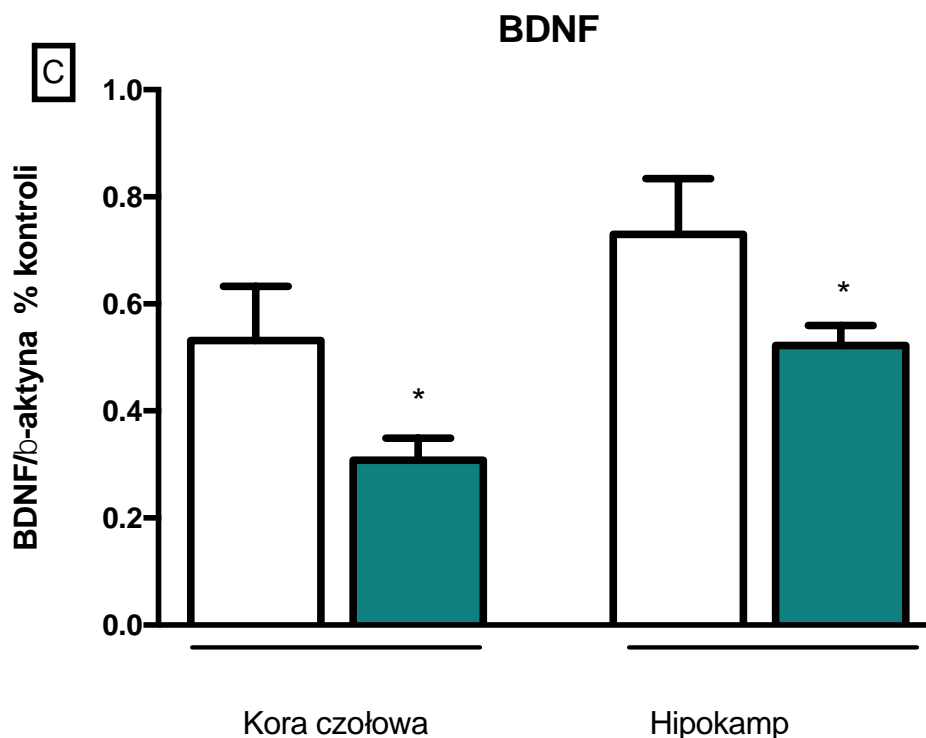
U ofiar samobójstw obserwowano wzrost poziomu białka całkowitego MeCP2 zarówno w korze czołowej jak i hipokampie ( $p < 0.0490$ ;  $p < 0.0002$  odpowiednio) w odniesieniu do grupy kontrolnej. W hipokampie (lecz nie w korze czołowej) w grupie badanej stwierdzono spadek fosforylacji seryny 421 białka MeCP2 –  $p < 0.00346$ . Zmiany te były pozytywnie skorelowane z poziomem białka BDNF ( $p < 0.0447$ ). Podobnie w korze czołowej, odnotowano istotną redukcję białka BDNF w grupie badanej w stosunku do kontroli ( $p < 0.0316$ ).

Tabela.7. Przykładowe/reprezentatywne bloty dla MeCP2, p-S421-MeCP2, BDNF oraz  $\beta$ -aktyny w korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw i odpowiednich kontroli.

| Białko          | Kora czołowa |   |   |               |   |   | Hipokamp     |   |               |   |   |
|-----------------|--------------|---|---|---------------|---|---|--------------|---|---------------|---|---|
|                 | Kontrola (K) |   |   | Samobójcy (S) |   |   | Kontrola (K) |   | Samobójcy (S) |   |   |
| MeCP2           | K            | S | S | K             | K | S | K            | S | S             | K | S |
|                 |              |   |   |               |   |   |              |   |               |   |   |
| $\beta$ -aktyna |              |   |   |               |   |   |              |   |               |   |   |
| p-S421-MeCP2    | K            | S | S | K             | K | S | K            | S | S             | K |   |
|                 |              |   |   |               |   |   |              |   |               |   |   |
| $\beta$ -aktyna |              |   |   |               |   |   |              |   |               |   |   |
| BDNF            | K            | S | S | K             | K | S | K            | S | S             | K | S |
|                 |              |   |   |               |   |   |              |   |               |   |   |
| $\beta$ -aktyna |              |   |   |               |   |   |              |   |               |   |   |







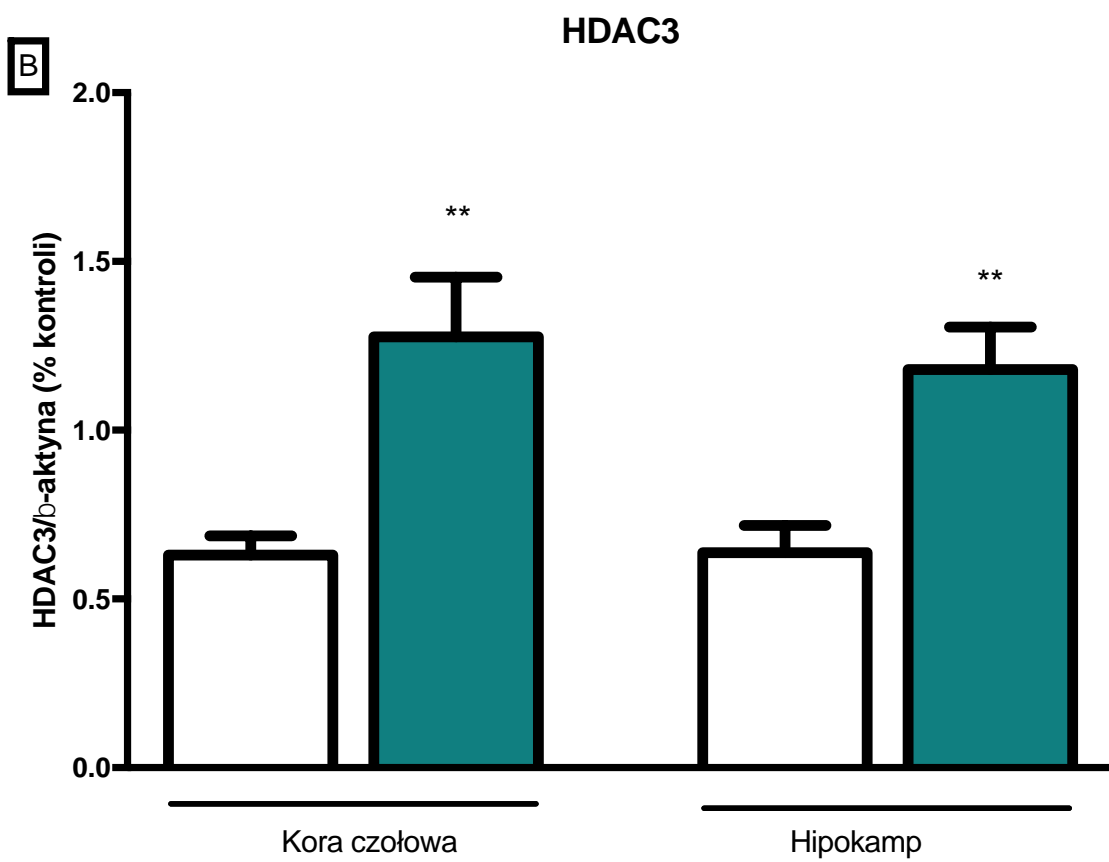
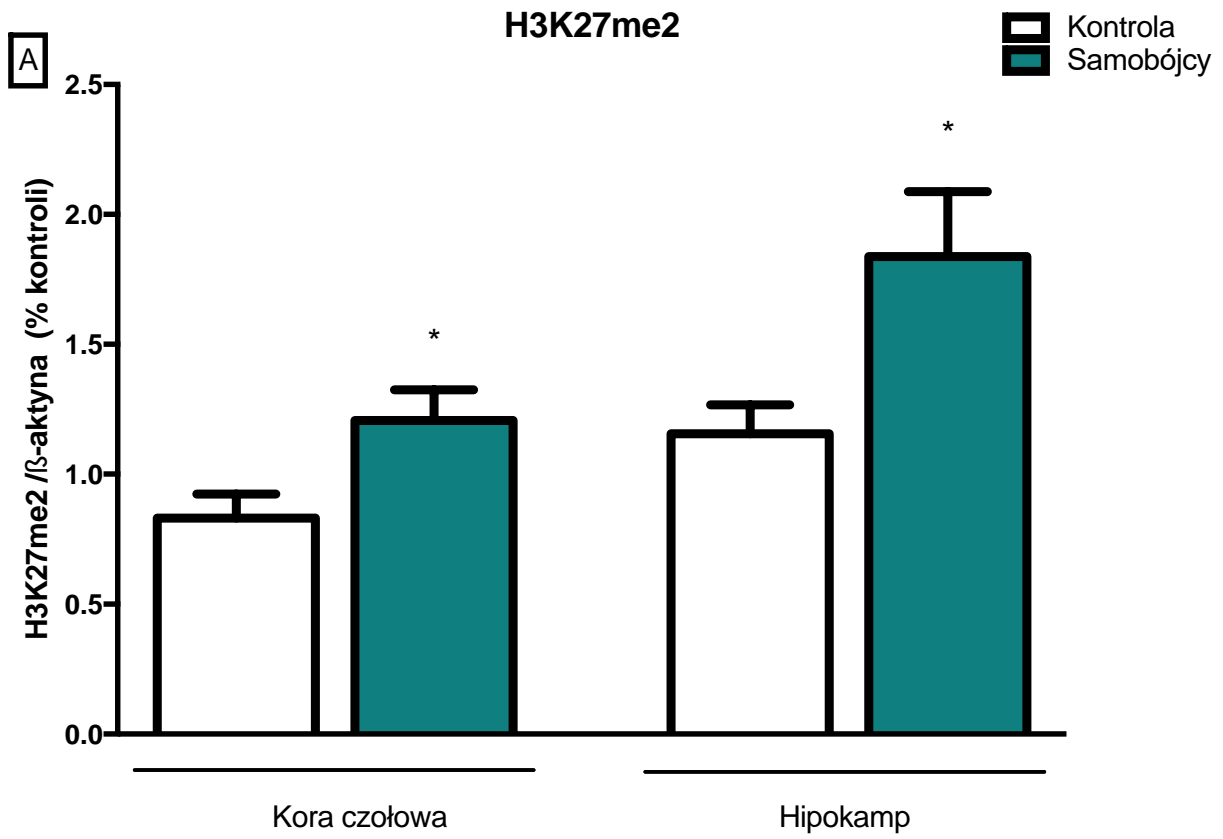
Ryc.5. Poziom białka MeCP2 (A); p-S421-MeCP2 (B) i BDNF (C) w korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw i odpowiedniej kontroli. *Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ze stosunku intensywności sygnału badanego białka/ $\beta$ -aktyny. Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu t-Studenta. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. Kontrola.*

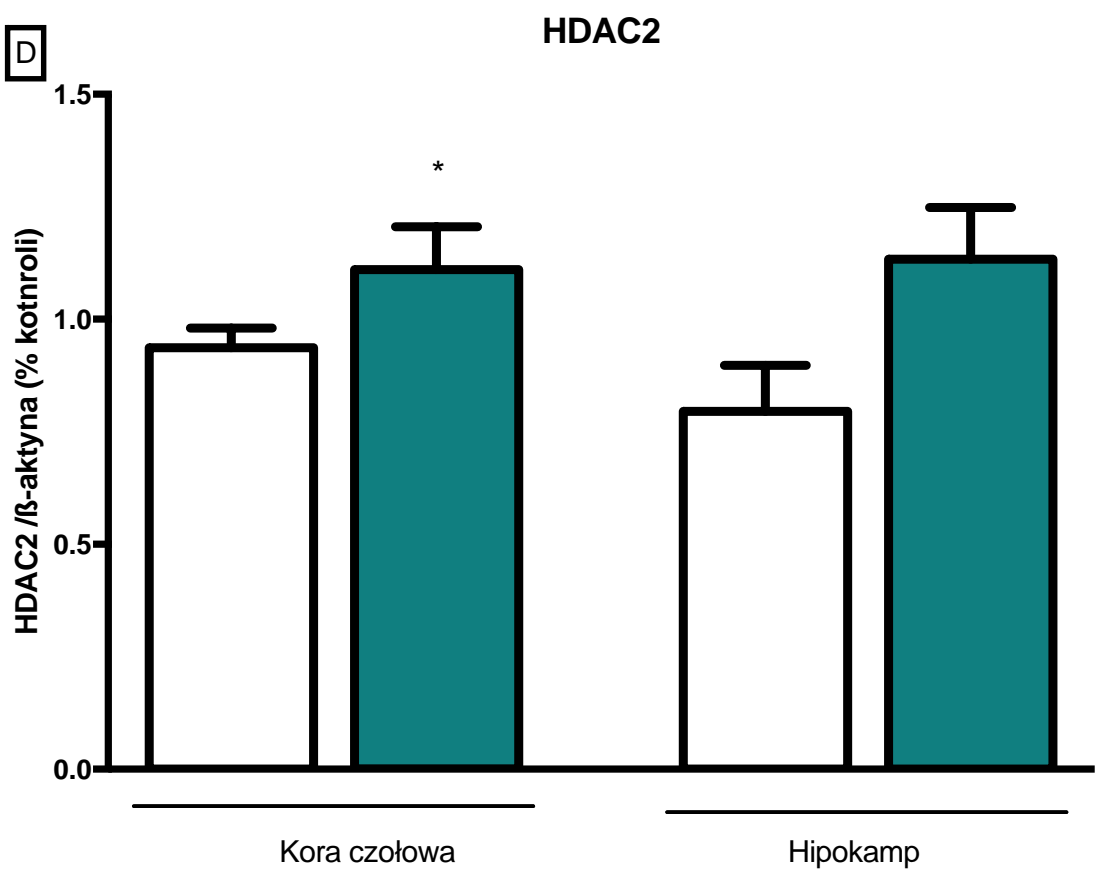
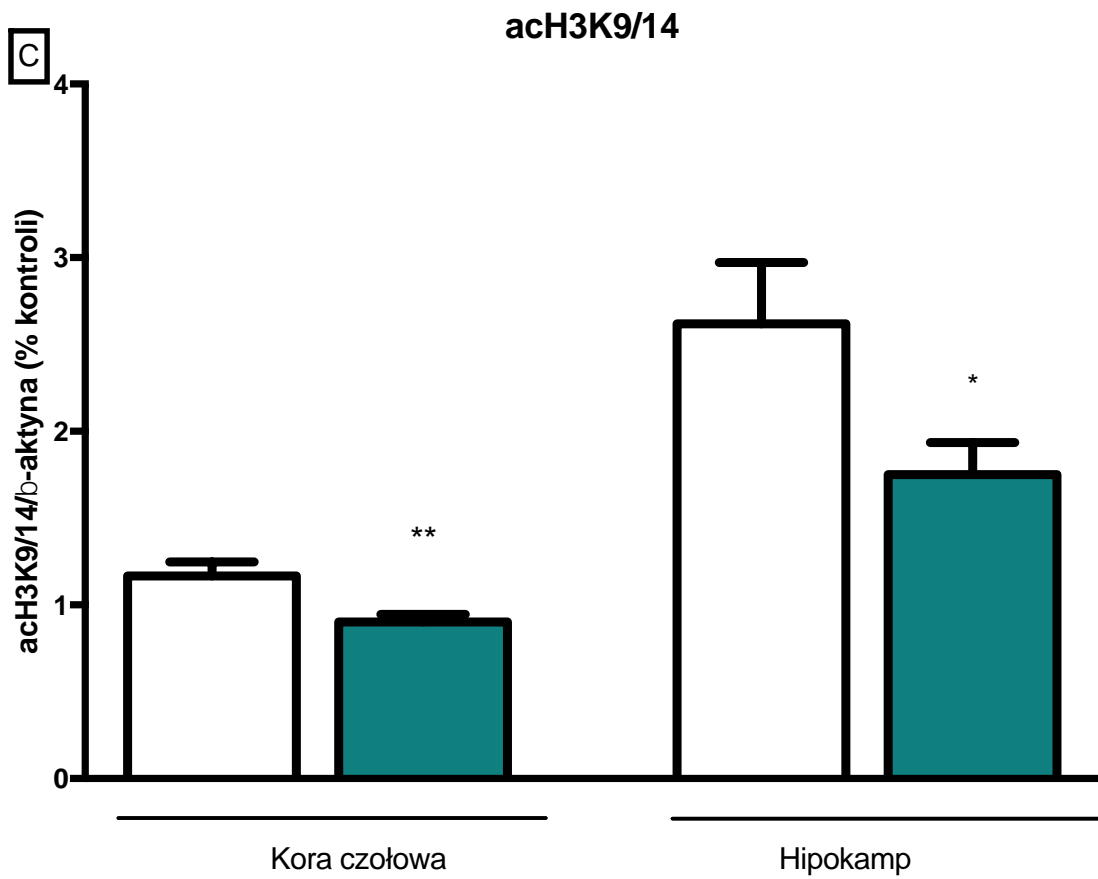
### 1.3. Poziom wybranych czynników epigenetycznych hipokampie i korze czołowej

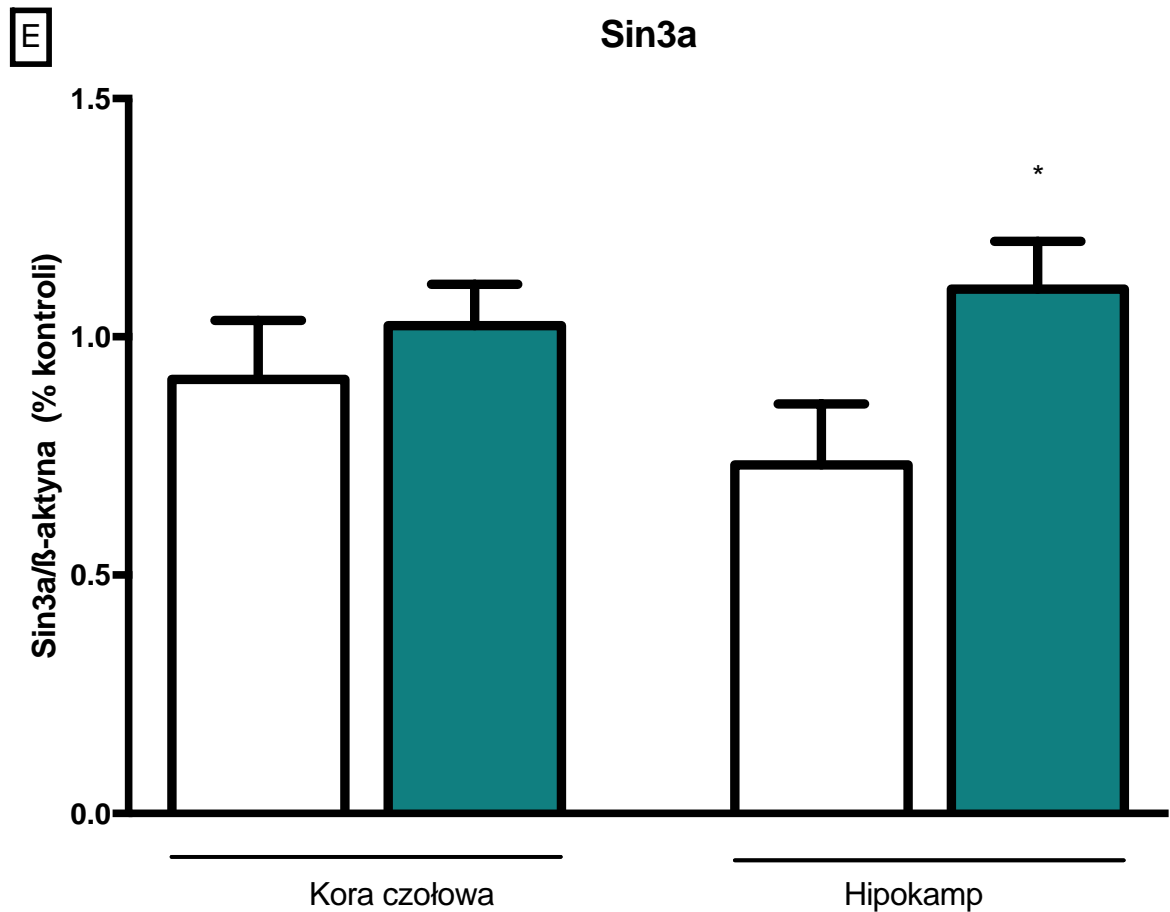
W tkankach ludzkich oznaczono następujące czynniki epigenetyczne: H3K27me2, acH3K9/14, Sin3a, HDAC2 i HDAC3. Zarówno w korze czołowej jak i hipokampie zaobserwowano zwiększony poziom białka H3K27me2 ( $p < 0.0477$ ;  $p < 0.0369$  odpowiednio) oraz HDAC3 ( $p < 0.0192$ ;  $p < 0.0097$  odpowiednio) u ofiar samobójstw w stosunku do grupy kontrolnej. Przeciwnie, poziom acetylacji histonu H3 na lizynie 9/14 uległ znacznemu obniżeniu w obydwu badanych strukturach mózgu samobójców (kora czołowa  $p < 0.0052$ ; hipokamp  $p < 0.0255$ ). Ponadto, w korze czołowej (lecz nie w hipokampie) obserwowano istotny wzrost poziomu białka HDAC2 w grupie badanej w odniesieniu do odpowiedniej grupy kontrolnej ( $p < 0.0185$ ). W hipokampie odnotowano również statystycznie wyższy poziom białka Sin3a ( $p < 0.0493$ ) w grupie samobójców.

Tabela.8. Przykładowe/reprezentatywne bloty dla H3K27me2, acH3K9/14, Sin3a, HDAC2 i HDAC3 oraz  $\beta$ -aktyny w korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw i odpowiednich kontroli.

| Białko          | Kora czołowa |   |               |   | Hipokamp     |   |               |   |
|-----------------|--------------|---|---------------|---|--------------|---|---------------|---|
|                 | Kontrola (K) |   | Samobójcy (S) |   | Kontrola (K) |   | Samobójcy (S) |   |
| H3k27me2        | K            | S | K             | S | K            | S | K             | S |
| $\beta$ -aktyna |              |   |               |   |              |   |               |   |
| HDAC3           | K            | S | K             | S | K            | S | K             | S |
| $\beta$ -aktyna |              |   |               |   |              |   |               |   |
| acH3K9/14       | K            | S | K             | S | K            | S | K             | S |
| $\beta$ -aktyna |              |   |               |   |              |   |               |   |
| HDAC2           | K            | S | K             | S | K            | S | K             | S |
| $\beta$ -aktyna |              |   |               |   |              |   |               |   |
| Sin3a           | K            | S | K             | S | K            | S | K             | S |
| $\beta$ -aktyna |              |   |               |   |              |   |               |   |







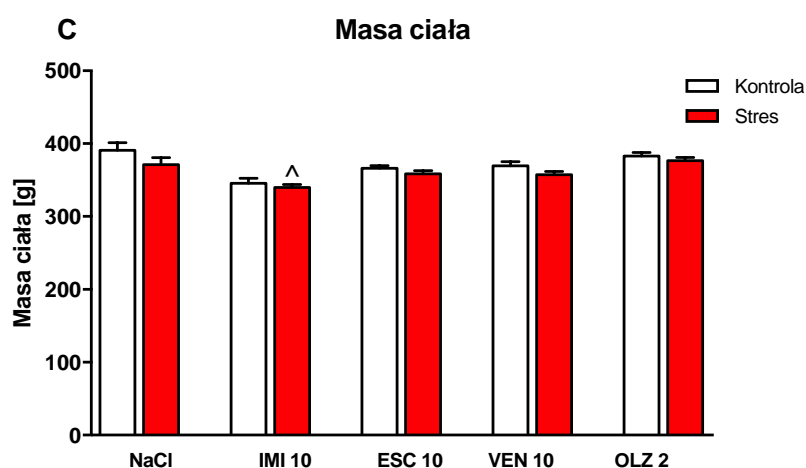
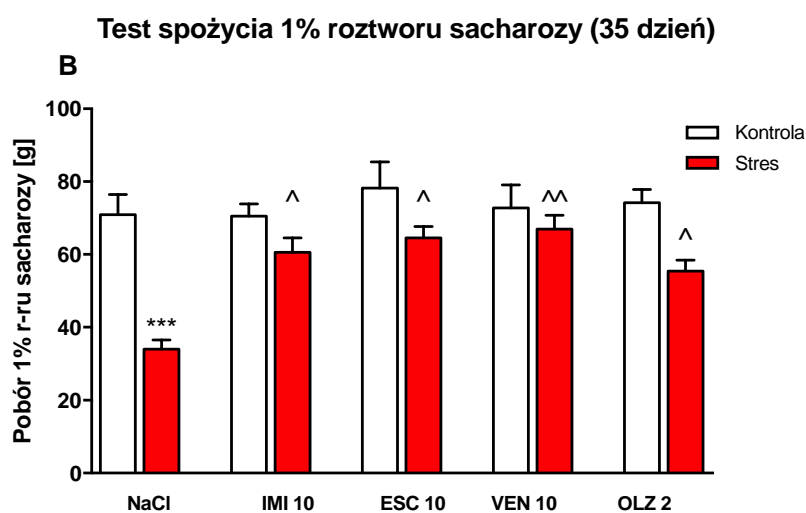
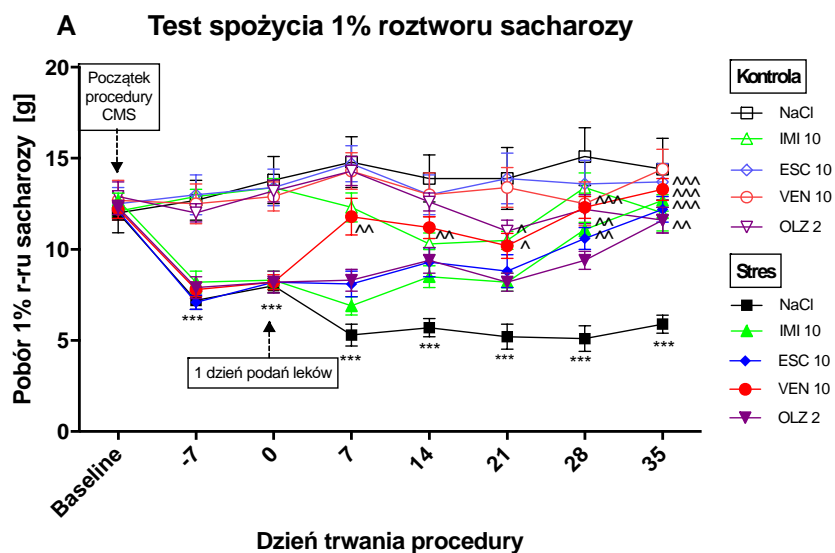
Ryc.6. Poziom białka H3K27me2 (A); HDAC3 (B); acH3K9/14 (C); HDAC2 (D); Sin3a (E) w korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw i odpowiedniej kontroli. *Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią ± SEM ze stosunku intensywności sygnału badanego białka/β-aktyny. Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu t-Studenta. \*p<0.05; \*\*p<0.01 vs. Kontrola.*

## 2. Model Przewlekłego Łagodnego Stresu

### 2.1. Wpływ Przewlekłego Łagodnego Stresu oraz leków przeciwdepresyjnych na spożycie 1% roztworu sacharozy

Zgodnie z opisywaną wyżej metodyką, test spożycia 1% roztworu sacharozy (SPT) przeprowadzano co tydzień, począwszy od 1 (baseline) do 7 tygodnia eksperymentu. Przez pierwsze 2 tygodnie od rozpoczęcia procedury CMS (Baseline – 0; Ryc. 7A) zarówno zwierzęta stresowane, jak i kontrolne nie otrzymywały żadnych leków. Leki zostały wprowadzone po 2-tygodniowym okresie stresowania (po wykonaniu 3 testu SPT – pkt. 0; Ryc. 7A) i podawane przez kolejne 5 tygodni (0-35, Ryc. 7A).

W momencie rozpoczęcia procedury CMS (baseline, Ryc. 7A) nie zaobserwowano żadnych różnic w spożyciu roztworu sacharozy, zarówno w grupie stresowanej jak i kontrolnej. Jednakże już po pierwszym tygodniu stosowania czynników stresowych stwierdzono istotny statystycznie spadek poboru sacharozy w grupie stresowanej vs. grupa kontrolna. Różnica ta utrzymywała się do końca trwania eksperymentu (dzień 35, Ryc. 7A) ( $p < 0,0001$ ). Po podaniach leków przeciwdepresyjnych zaobserwowano zwiększone spożycie sacharozy w teście SPT. imipramina, escitalopram, wenlafaksyna oraz lek przeciwpsychotyczny olanzapina statystycznie istotnie zwiększyły spożycie sacharozy w stosunku do grupy stresowanej otrzymującej 0,9% r-r soli fizjologicznej (odpowiednio:  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ ), co świadczy o pozytywnej odpowiedzi zwierząt na podanie leków przeciwdepresyjnych (patrz Ryc. 7B). Masa ciała zwierząt nie uległa istotnie statystycznym zmianom podczas trwania procedury CMS. Jedynie po podaniach imipraminy w grupie stresowanej obserwowano spadek masy ciała w stosunku do grupy stresowanej otrzymującej 0,9%NaCl ( $p < 0,05$ ) (Ryc. 3C).



Ryc.7. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na: spożycie 1% roztworu

sacharozy mierzone w odstępach tygodniowych od momentu rozpoczęcia eksperymentu (A), całkowite spożycie 1% roztworu sacharozy w okresie ostatnich 5 tygodni eksperymentu (B) oraz masę ciała zwierząt (C). Wartości przedstawiają średnią  $\pm$ SEM. Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  vs kontrola, ^  $p < 0,05$ , ^^  $p < 0,001$  vs stres

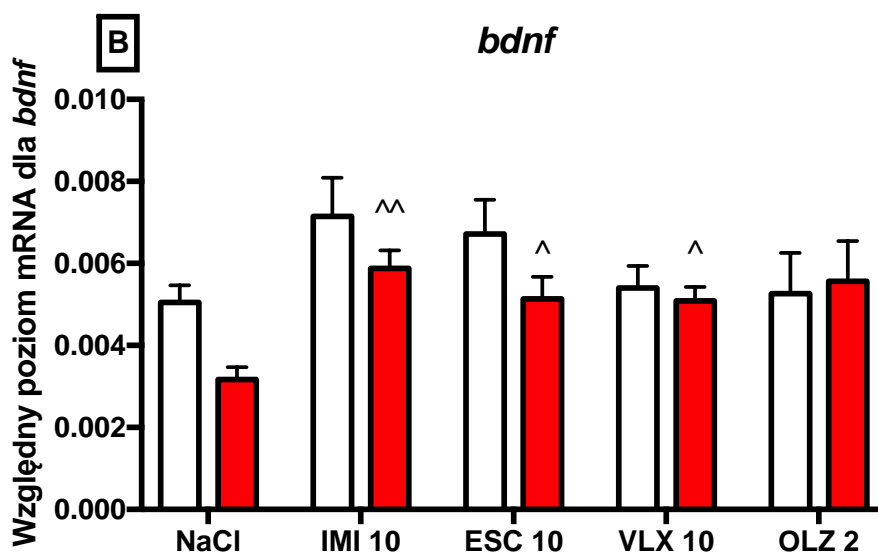
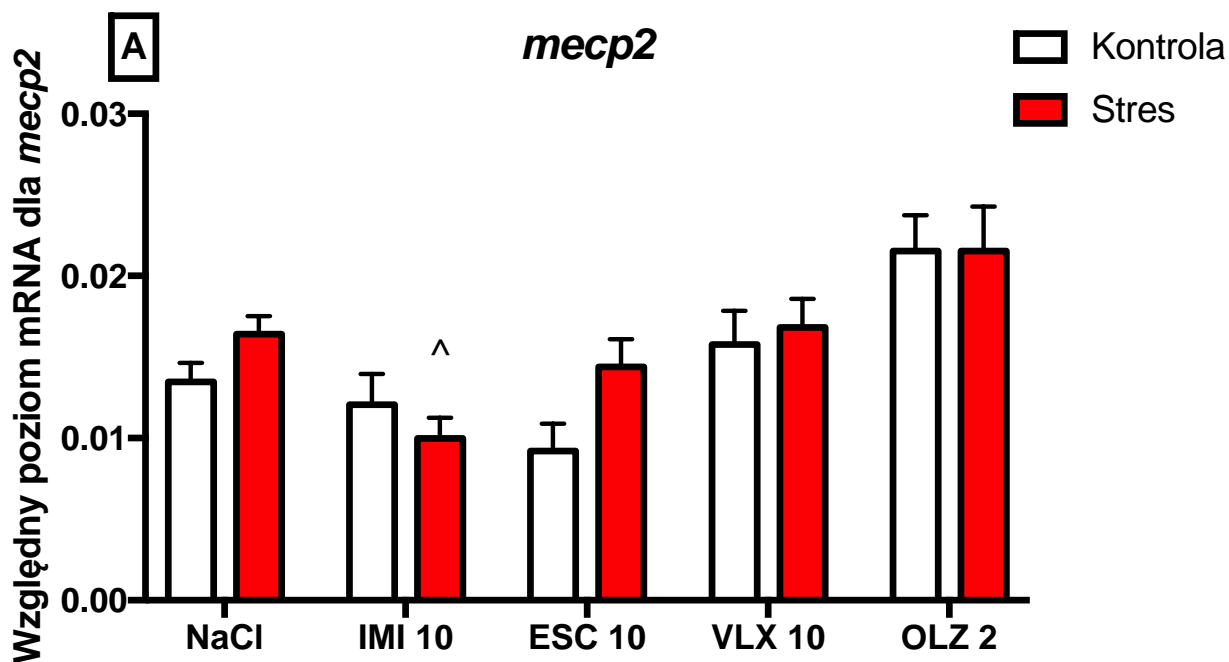
## 2.2. Wpływ przewlekłego łagodnego stresu oraz leków na ekspresję genu *mecp2* oraz *bdnf*.

Poziom ekspresji genu *mecp2* i *bdnf* oznaczono przy użyciu techniki Real-Time PCR.

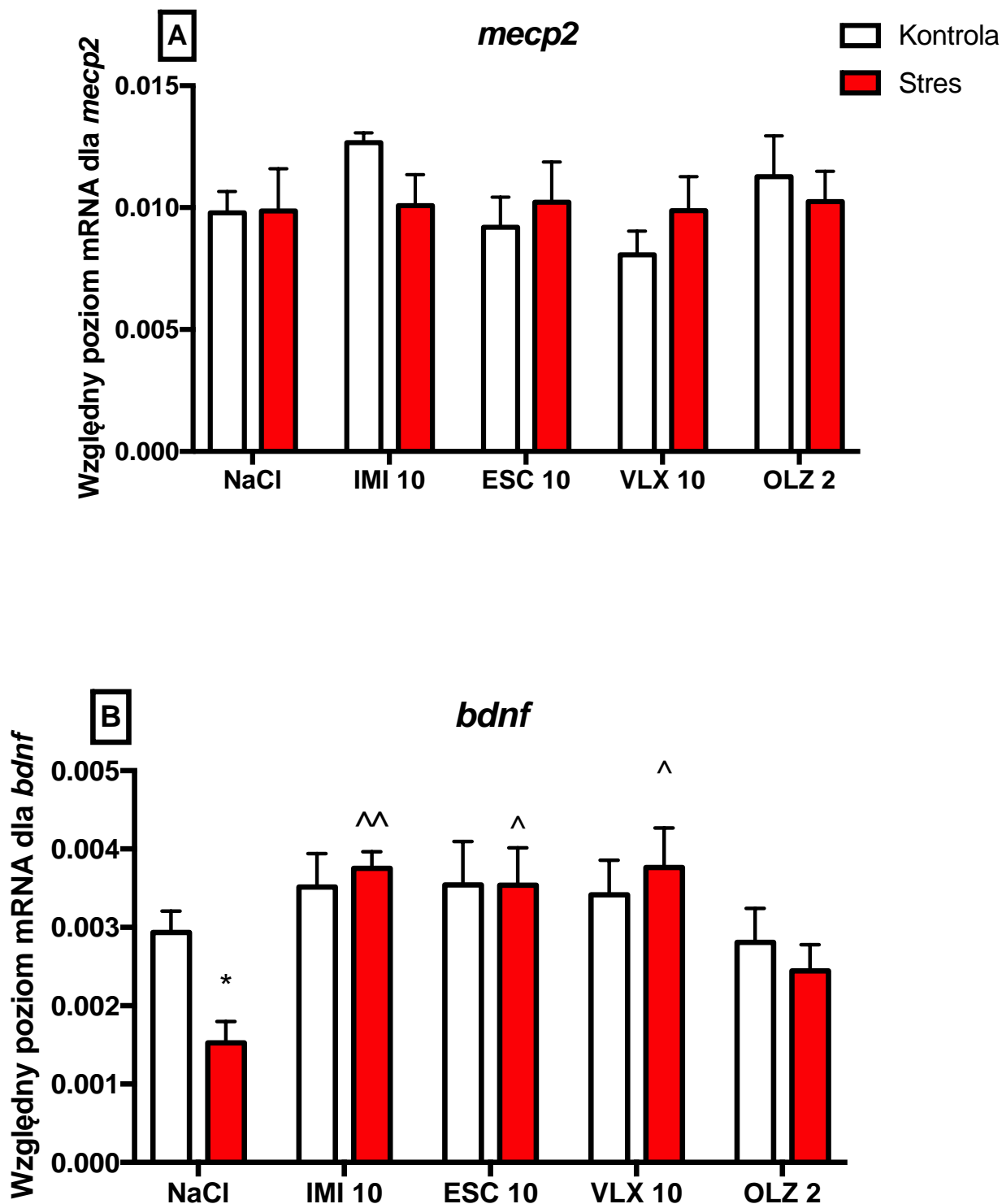
Ekspresja genu *mecp2* zarówno w hipokampie jak i korze czołowej zwierząt stresowanych była na poziomie podobnym do obserwowanego u zwierząt kontrolnych (niestresowanych) (Ryc. 8A, 9B). 5-tygodniowe podania leków o różnym profilu działania nie spowodowały większych zmian zarówno w grupie stresowanej jak i kontrolnej w obydwu badanych strukturach. Odnotowano jedynie wzrost ekspresji *mecp2* w hipokampie po podaniach imipraminy w grupie stresowanej w stosunku do grupy stresowanej otrzymującej 0,9%NaCl ( $p < 0.0464$ ) (Ryc. 8A, 9B).

Analiza poziomu mRNA dla BDNF wykazała istotne jego obniżenie w korze czołowej oraz wyraźną (nieistotną statystycznie) tendencję zniżkową w hipokampie zwierząt stresowanych w odniesieniu do niestresowanej kontroli ( $p < 0,05$ ). Podania imipraminy, escitalopramu oraz wenlafaksyny (lecz nie olanzapiny) spowodowały istotny wzrost ekspresji *bdnf* w stosunku do stresowanej kontroli zarówno w korze czołowej ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.0250$ ;  $p < 0.0235$  odpowiednio) jak i hipokampie ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$  odpowiednio) (Ryc. 8B, 9B).





Ryc.8. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom mRNA dla MeCP2 (A) oraz BDNF (B) w hipokampie. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) <sup>^</sup>  $p < 0,05$ , <sup>^^</sup>  $p < 0,001$  vs stres

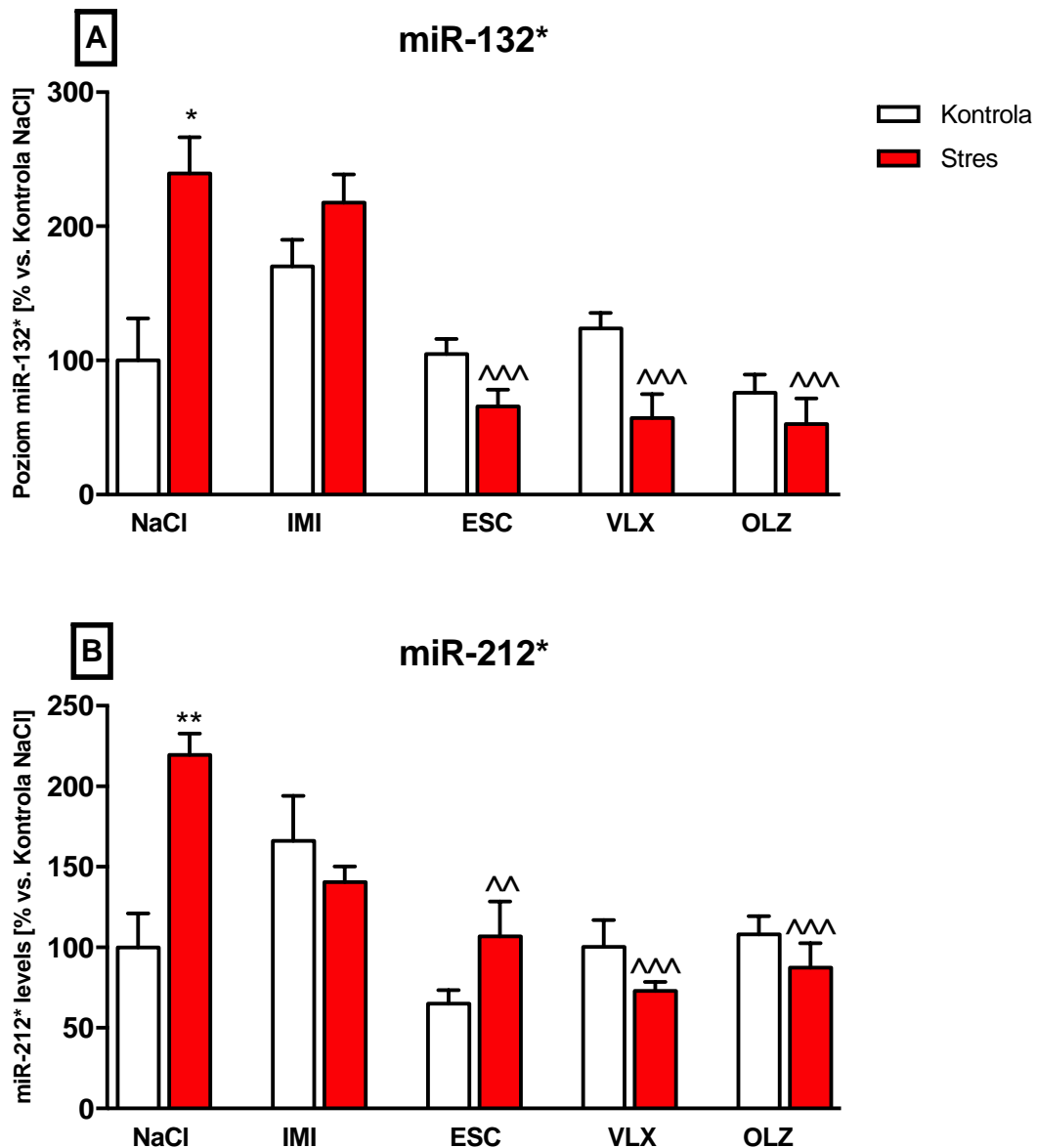


Ryc.9. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom mRNA dla MeCP2 (A) oraz BDNF (B) w korze czołowej. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*  $p<0,05$  vs. kontrola NaCl; ^ $p<0,05$ ; ^^  $p<0,01$  vs. stres NaCl

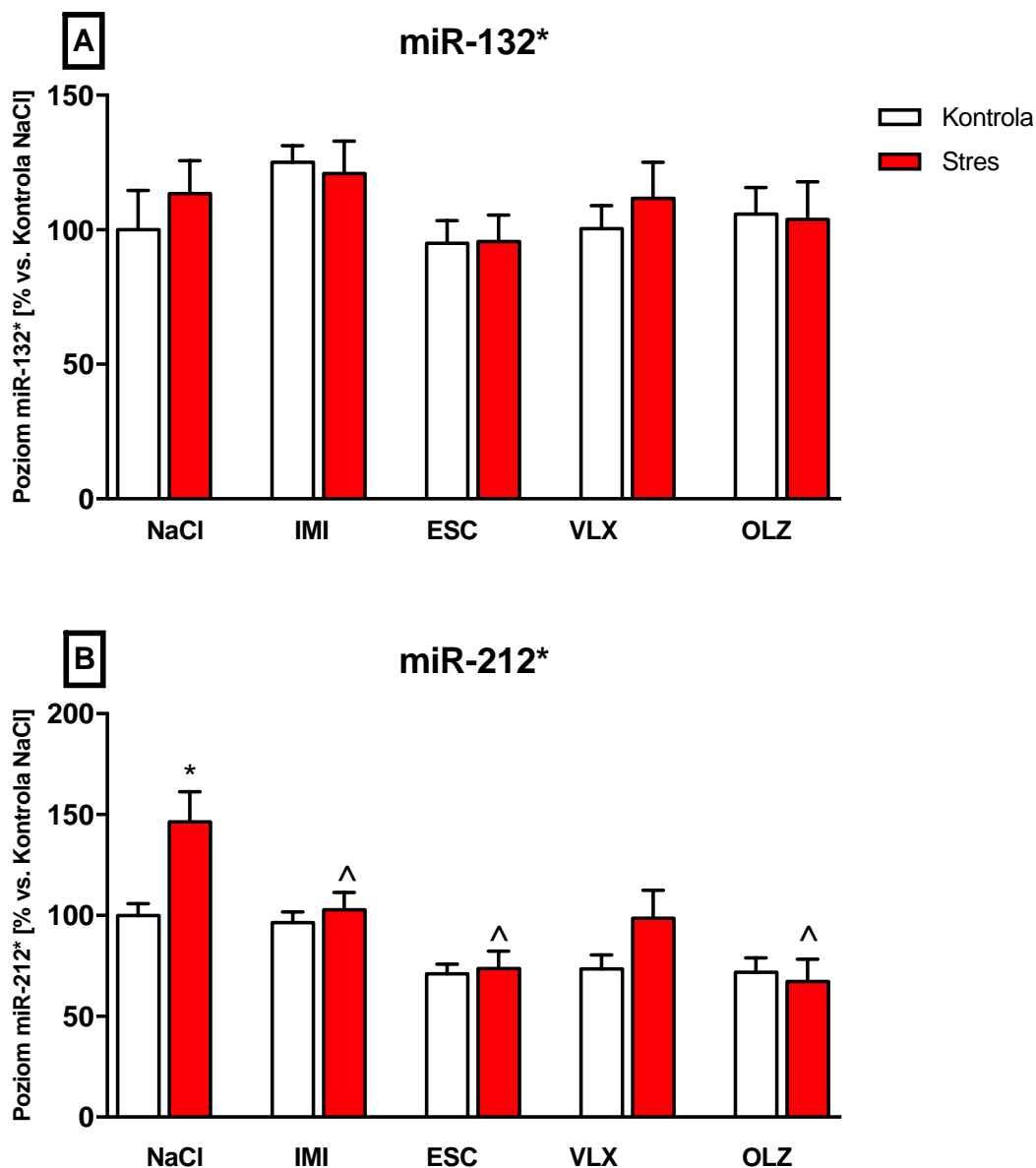
### 2.3. Wpływ przewlekłego łagodnego stresu oraz leków na ekspresję miR-132\*/212\*

Poziom ekspresji miR-132\*/212\* oznaczono przy użyciu techniki Real-Time PCR.

Analiza miR-132\* i miR-212\* w hipokampie wykazała wzrost ekspresji w grupie stresowanej NaCl vs. grupa kontrolna NaCl ( $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ). Zmiany te były odwracane wielokrotnymi podaniami escitalopramu ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,001$ , odpowiednio dla miR132\* i miR212\*), wenlafaksyny ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ , odpowiednio dla miR132\* i miR212\*) oraz olanzapiny ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ , odpowiednio dla miR132\* i miR212\*), lecz nie imipraminy (Ryc. 10 A-B). W korze czołowej nie zaobserwowano żadnych zmian w ekspresji miR132\* zarówno u zwierząt stresowanych jak i kontrolnych po podaniach leków (Ryc. 11A). Po zastosowaniu procedury CMS zanotowano natomiast wzrost miR212\* ( $p < 0,05$ ) w stosunku do niestresowanej kontroli NaCl (Ryc. 11B). Po podaniach imipraminy ( $p < 0,05$ ), escitalopramu ( $p < 0,05$ ) oraz olanzapiny ( $p < 0,05$ ) szczurom stresowanym zaobserwowano spadek miR212\* vs grupa stresowana NaCl (Ryc. 11B).



Ryc.10. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom miRNA 132\* (A); miRNA 212\* (B); w hipokampie szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*  $p<0,05$  vs. kontrola NaCl; ^ $p<0,05$ ; ^^  $p<0,01$ ; ^^ $p<0,001$  vs. stres NaCl



Ryc.11. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom miRNA 132\* (A); miRNA 212\* (B); w korze czołowej szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)\*  $p<0,05$  vs. kontrola NaCl; ^ $p<0,05$  vs. stres NaCl.

2.4. Wpływ przewlekłego łagodnego stresu oraz leków na poziom białka MeCP2 i jego ufosforylowanej formy p-S421-MeCP2 oraz białka BDNF w hipokampie i korze czołowej

Analiza białek metodą Western blot w korze czołowej (Tabela 9) oraz hipokampie (Tabela 10) wykazała brak istotnie statystycznych zmian w poziomie białek BDNF i MeCP2. W korze czołowej poziom fosforylacji S421 dla MeCP2 zmniejszył się w grupie stresowanej ( $p < 0,05$ ), a podania leków przeciwdepresyjnych odwracały ten proces (imipramina  $p < 0,05$ ; escitalopram  $p < 0,001$ ; wenlafaksyna  $p < 0,05$ ). W hipokampie imipramina i escitalopram zwiększały poziom białka p-S421-MeCP2 (odpowiednio  $p < 0,001$  i  $p < 0,0001$ ).

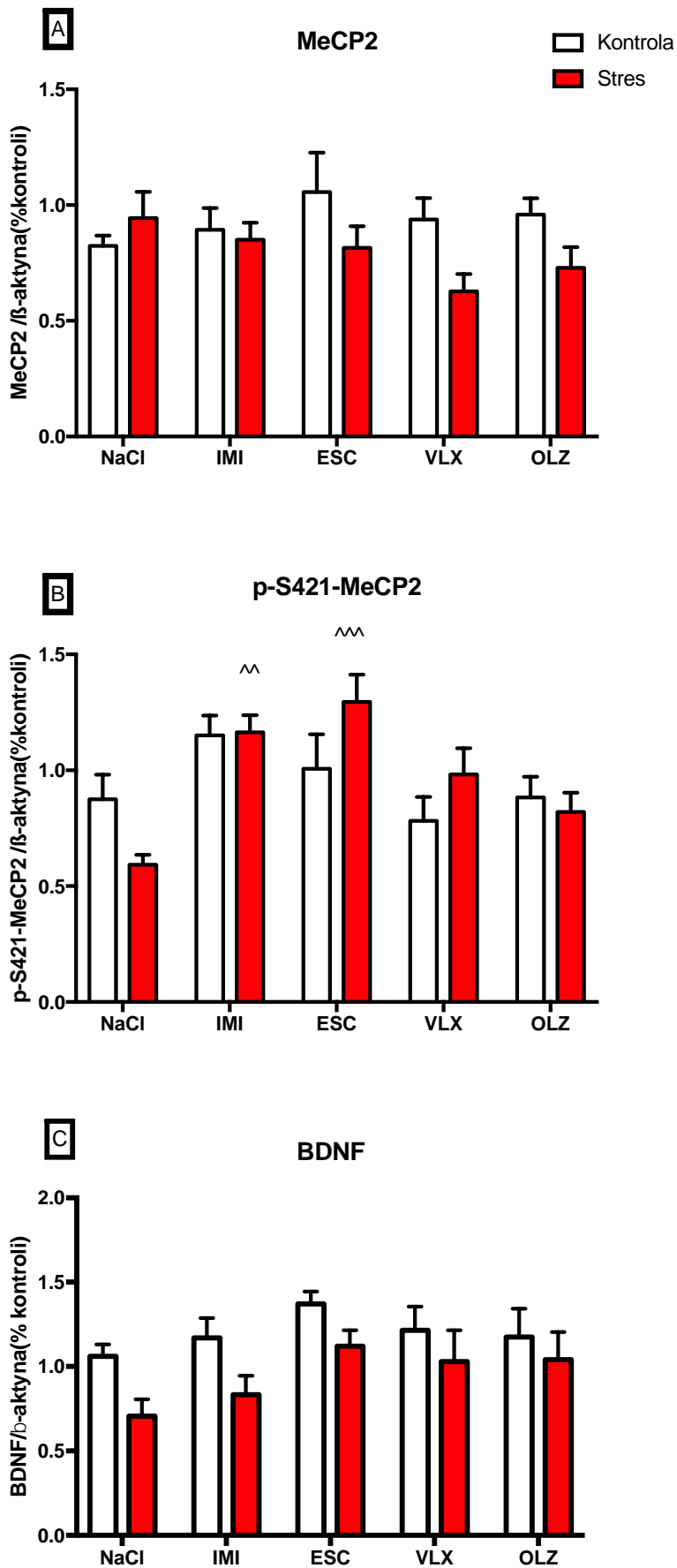
Tabela.9. Przykładowe/reprezentacyjne Western bloty BDNF, MeCP2 oraz p-S421-MeCP2 w korze czołowej szczurów po procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW-kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

| Białko       | Kora czołowa |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
|--------------|--------------|---|----|----|----|-----------|----|----|----|----|
|              | Kontrola (K) |   |    |    |    | Stres (S) |    |    |    |    |
|              | K            | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |
| MeCP2        |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
| β-aktyna     |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
| p-S421-MeCP2 |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
| β-aktyna     |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
| BDNF         |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
| β-aktyna     |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |

Tabela.10. Reprezentacyjne Western bloty BDNF, MeCP2 oraz p-S421-MeCP2 w hipokampie szczurów po procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina;

SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW-kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

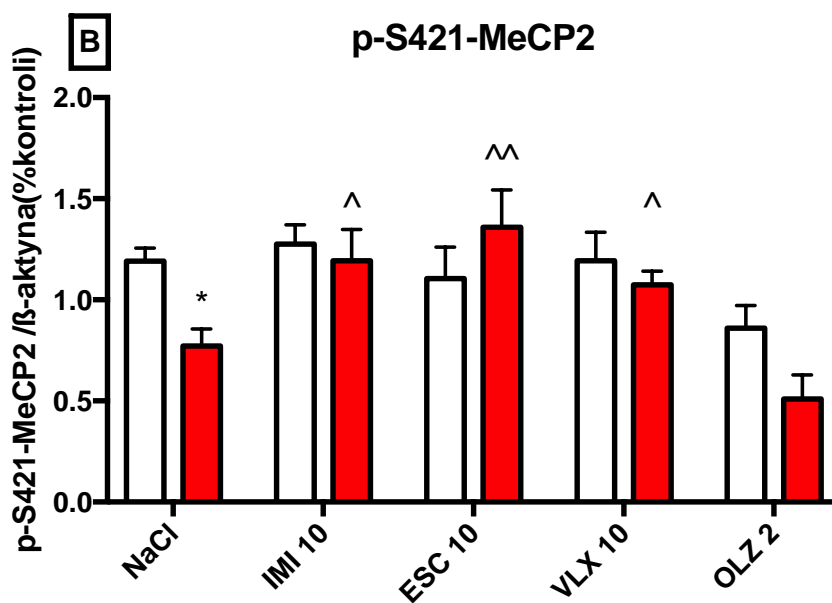
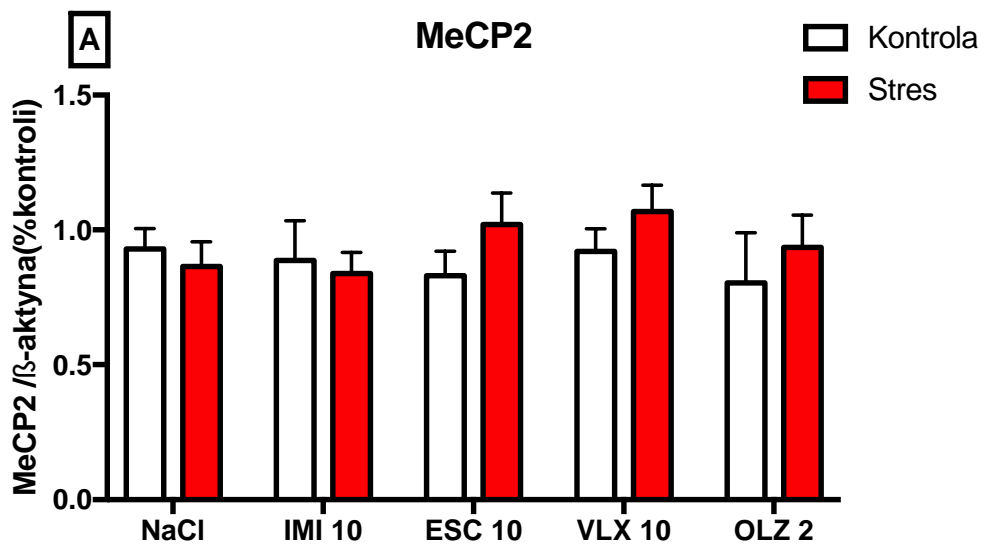
| Białko       | Hipokamp     |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
|--------------|--------------|---|----|----|----|-----------|----|----|----|----|
|              | Kontrola (K) |   |    |    |    | Stres (S) |    |    |    |    |
| MeCP2        | K            | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |
|              |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
| p-S421-MeCP2 | K            | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |
|              |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |
| BDNF         | K            | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |
|              |              |   |    |    |    |           |    |    |    |    |

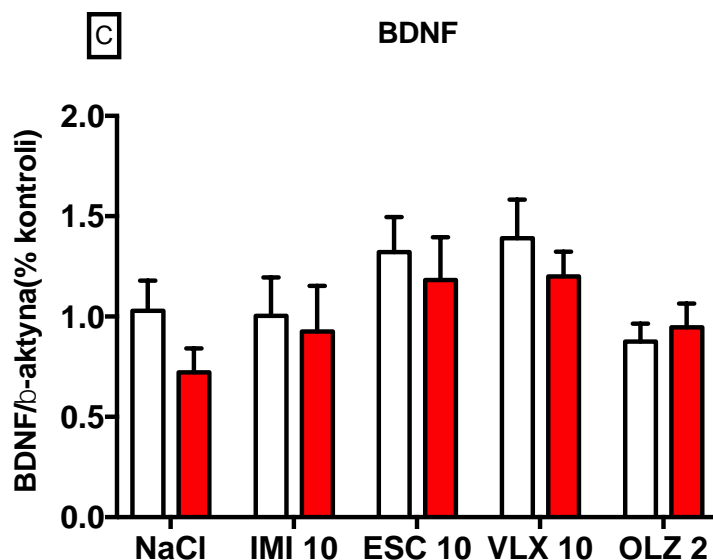


Ryc.12. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopamu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg



(VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek MeCP2 (A); p-S421-MeCP2 (B); BDNF (C) w hipokampie szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)  $^{\wedge}p<0,05$ ;  $^{\wedge\wedge}p<0,001$  vs. stres NaCl.

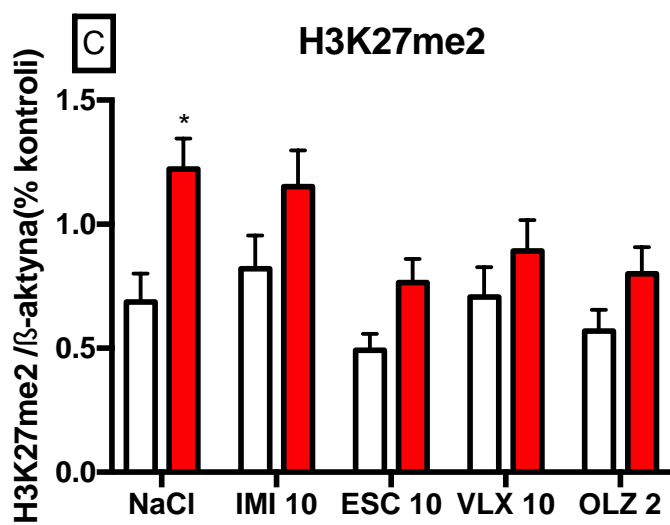
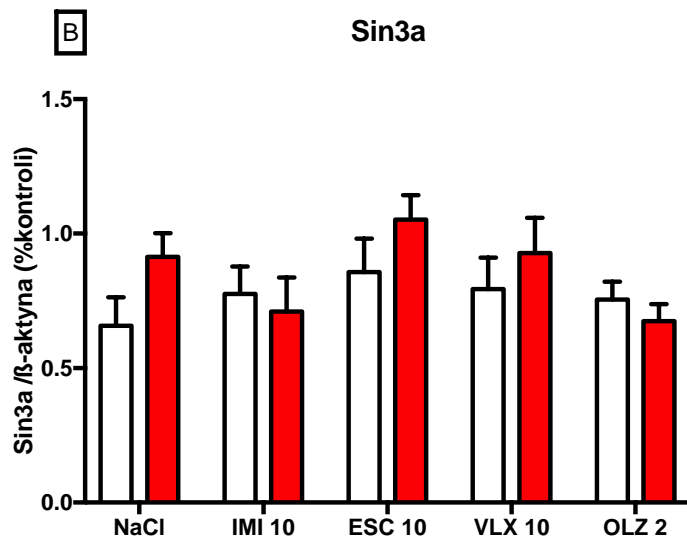
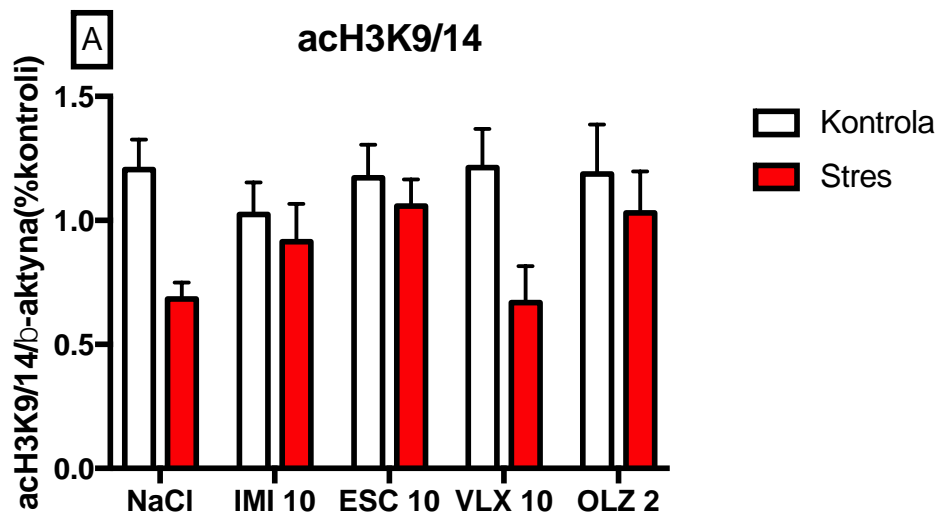


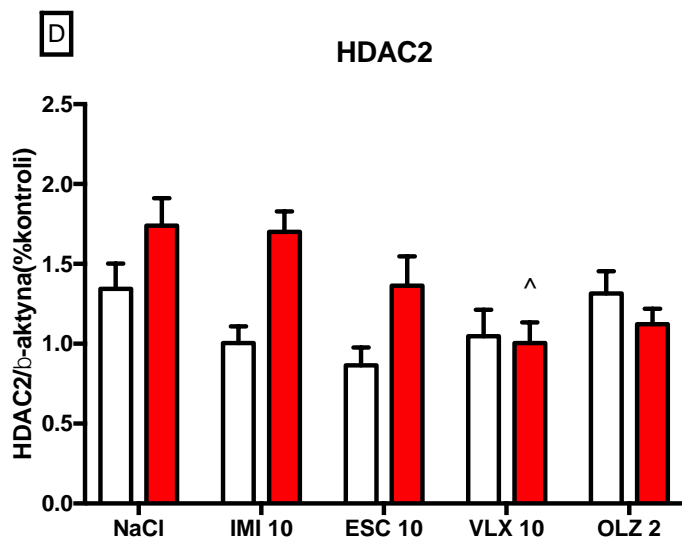


Ryc.13. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek MeCP2 (A); p-S421-MeCP2 (B); BDNF (C) w korze czołowej szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*  $p<0,05$  vs kontrola NaCl; ^ $p<0,05$ ; ^^  $p<0,001$  vs. stres NaCl.

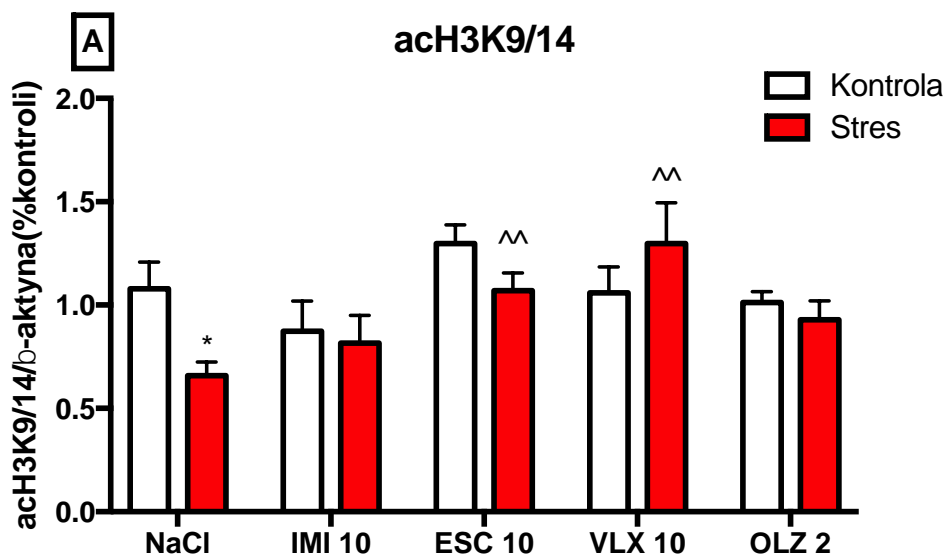
#### 2.5. Wpływ przewlekłego łagodnego stresu oraz leków na poziomie wybranych czynników epigenetycznych w hipokampie i korze czołowej

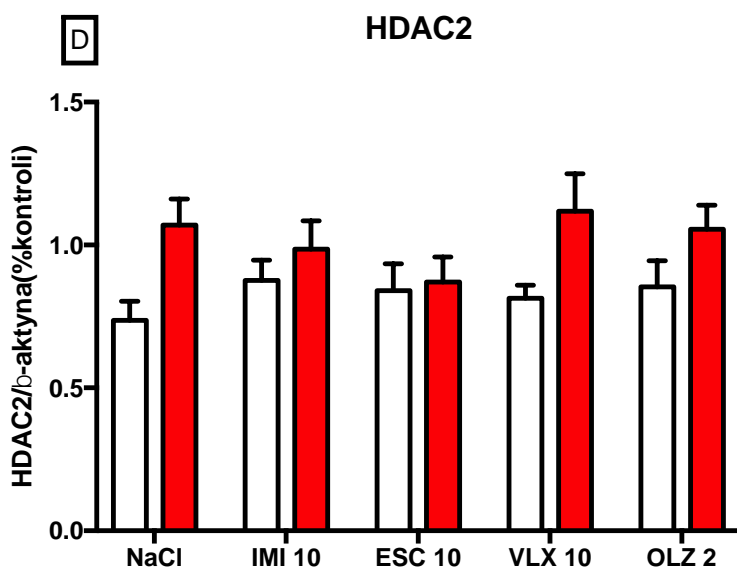
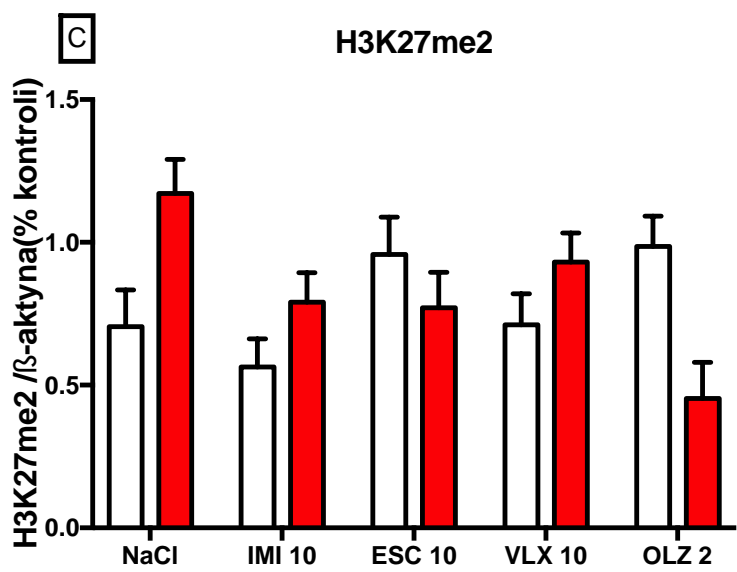
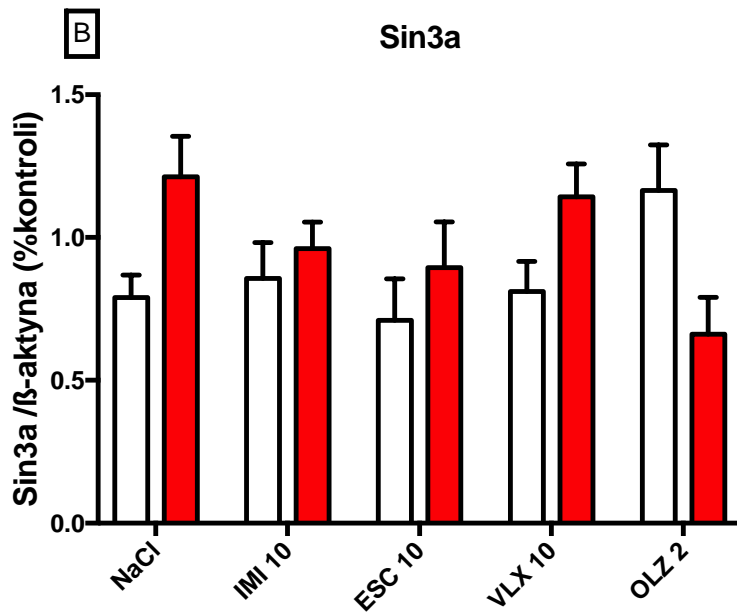
W hipokampie i korze czołowej zmierzono również poziom acetylacji histonu H3 na lizynie9/14. W korze czołowej wykazano spadek acetylacji histonu trzeciego w grupie stresowanej w stosunku do kontrolnej ( $p<0,05$ ), a wzrost tylko po podaniach szczurom stresowanym wenlafaksyny oraz escitalopramu ( $p<0,001$ ). Nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic w poziomie białek H3K27me2, HDAC2 oraz Sin3a w badanych grupach. Nie stwierdzono zmian w poziomie acetylacji Histonu H3 w pozycji 9/14 Lys oraz białka Sin3a w badanych grupach. W grupie stresowanej NaCl zanotowano wzrost di-metylacji Histonu H3K27 vs grupa kontrolna NaCl ( $p<0,0464$ ). Podania szczurom stresowanym wenlafaksyny skutkowały spadkiem poziomu białka HDAC2 w stosunku do grupy stresowanej NaCl ( $p<0,0198$ ). Przykładowe membrany z metody Western blot zaprezentowano w tabelach poniżej (Tabela 11 i 12).





Ryc.14. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek acH3K9/14 (A); Sin3a (B); H3K27me2 (C); HDAC2 (D) w hipokampie szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=7-8).* Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \* p<0,05 vs kontrola NaCl; ^p<0,05vs. stres NaCl.













Ryc.15. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek acH3K9/14 (A); Sin3a (B); H3K27me2 (C); HDAC2 (D) w korze czołowej szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=7-8).* Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu *Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)* \* p<0,05 vs kontrola NaCl; ^p<0,05; ^p<0,001 vs. stres NaCl.

Tabela.11. Reprezentacyjne Western bloty białek B acH3K9/14, H3k27me2, Sin3a oraz HDAC2 w Hipokampie szczurów poddanych procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW- kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

| Białko    | Hipokamp        |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |
|-----------|-----------------|---|----|----|----|-----------|----|----|----|----|--|
|           | Kontrola (K)    |   |    |    |    | Stres (S) |    |    |    |    |  |
| acH3K9/14 | K               | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |  |
|           | $\beta$ -aktyna |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |
| H3k27me2  | K               | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |  |
|           | $\beta$ -aktyna |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |
| Sin3a     | K               | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |  |
|           | $\beta$ -aktyna |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |
| HDAC2     | K               | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |  |
|           | $\beta$ -aktyna |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |

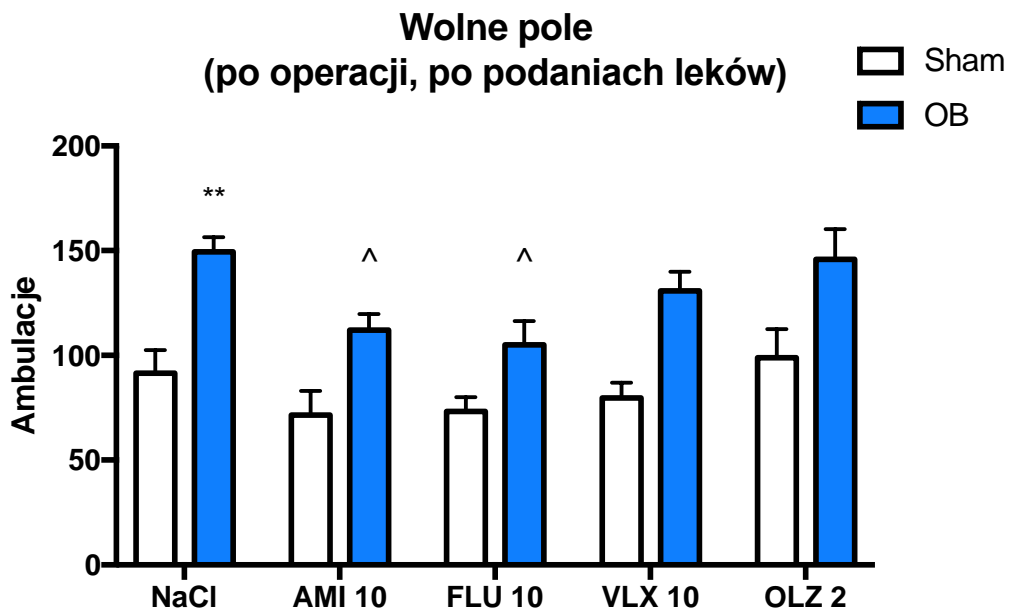
Tabela.12. Reprezentacyjne Western bloty białek acH3K9/14, H3k27me2, Sin3a oraz HDAC2 w korze czołowej szczurów poddanych procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW-kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

| Białko    | Kora czołowa   |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |
|-----------|--|---|----|----|----|-----------|----|----|----|----|--|
|           | Kontrola (K)   |   |    |    |    | Stres (S) |    |    |    |    |  |
| acH3K9/14 | K  | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |    |
| β-aktyna  |    |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |
| H3k27me2  | K  | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |    |
| β-aktyna  |  |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |
| Sin3a     | K  | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |  |
| β-aktyna  |  |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |
| HDAC2     | K  | S | KI | SI | KE | SE        | KW | SW | KO | SO |  |
| β-aktyna  |  |   |    |    |    |           |    |    |    |    |  |

### 3. Model Usunięcia Opuszek Węchowych

#### 3.1. Behawioralne działanie Usunięcia Opuszek Węchowych w Teście Wolnego Pola

Test Wolnego Pola wykonywano na szczurach w jednym punkcie czasowym po czterech tygodniach trwania procedury OB. Grupa operowana kontrolna i grupa pozornie operowana kontrolna wykazały rozbieżność w lokomotoryczności w teście OFT. Stwierdzono istotnie statystyczny wzrost ambulacji po usunięciu opuszek węchowych ( $p < 0,001$ ). Leki przeciwdepresyjne amitryptylina, fluoksetyna odwracały efekty wykonanej bulbektomi wywołując behavior przeciwdepresyjny (odpowiednio  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ ). Olanzapina jak i wenlafaksyna nie wpływała na hiperaktywność szczurów operowanych w teście OFT.



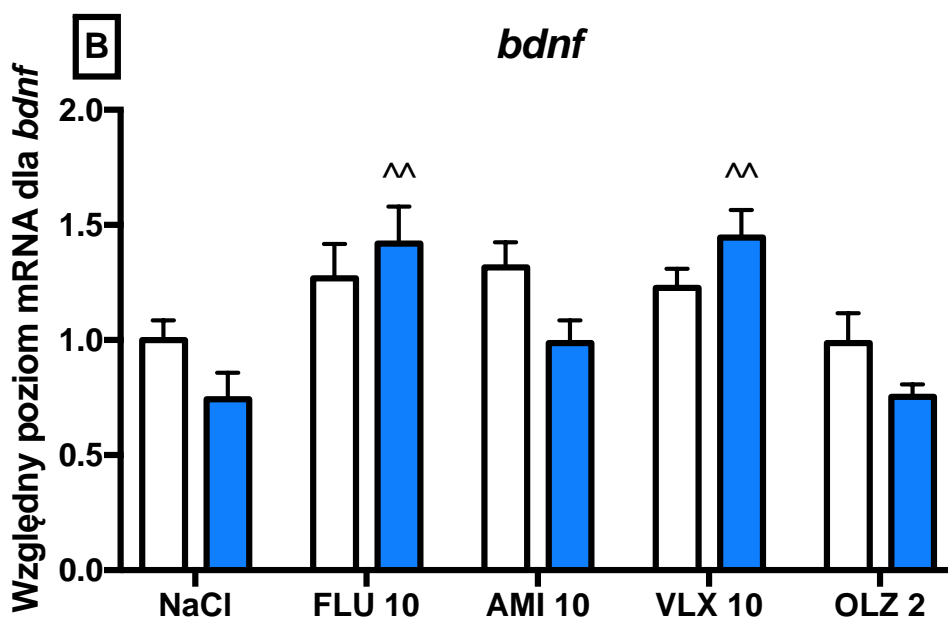
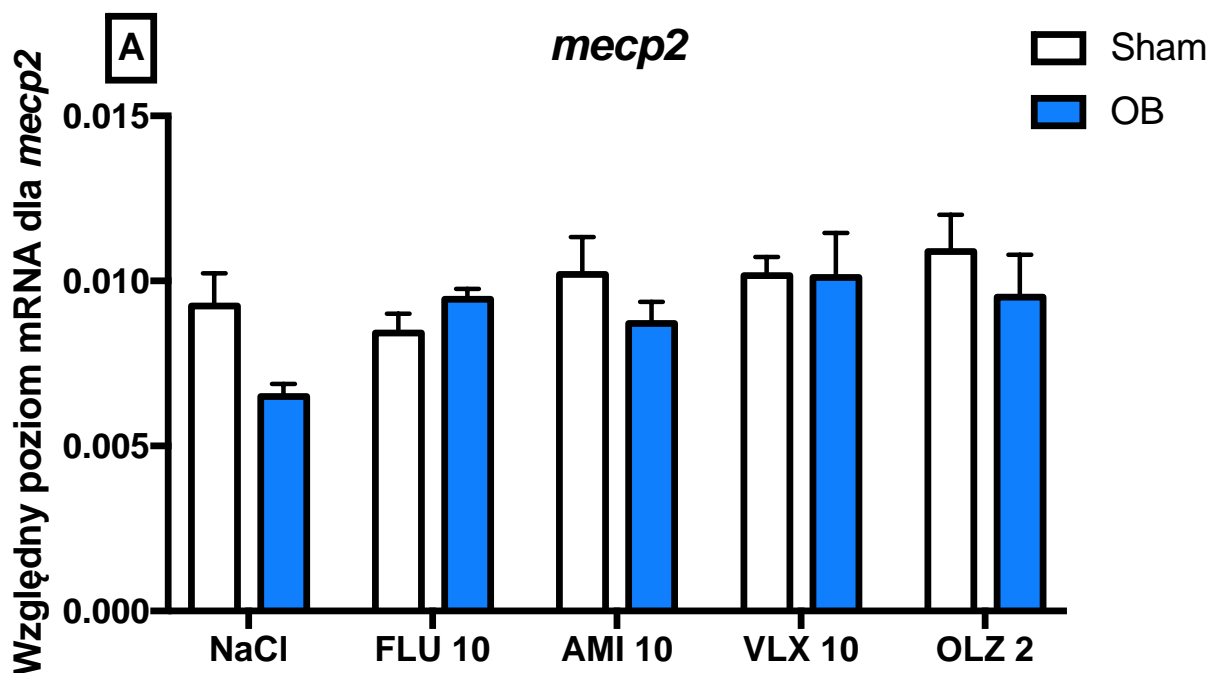
Ryc.16. Test Wolnego Pola: Sham- szczury pozornie operowane; OB -szczury po usunięciu opuszek węchowych; AMI -Amitryptylina 10 mg/kg; FLU - Fluoksetyna 10 mg/kg; VLX–Wenlafaksyna 10 mg/kg; OLZ – Olanzapina 2 mg/kg; *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=48). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*\* p<0,001 vs Sham NaCl; ^p<0,05; vs OB NaCl*

#### 3.2. Poziom ekspresji genu BDNF oraz MeCP2 w hipokampie i korze czołowej w modelu OB.

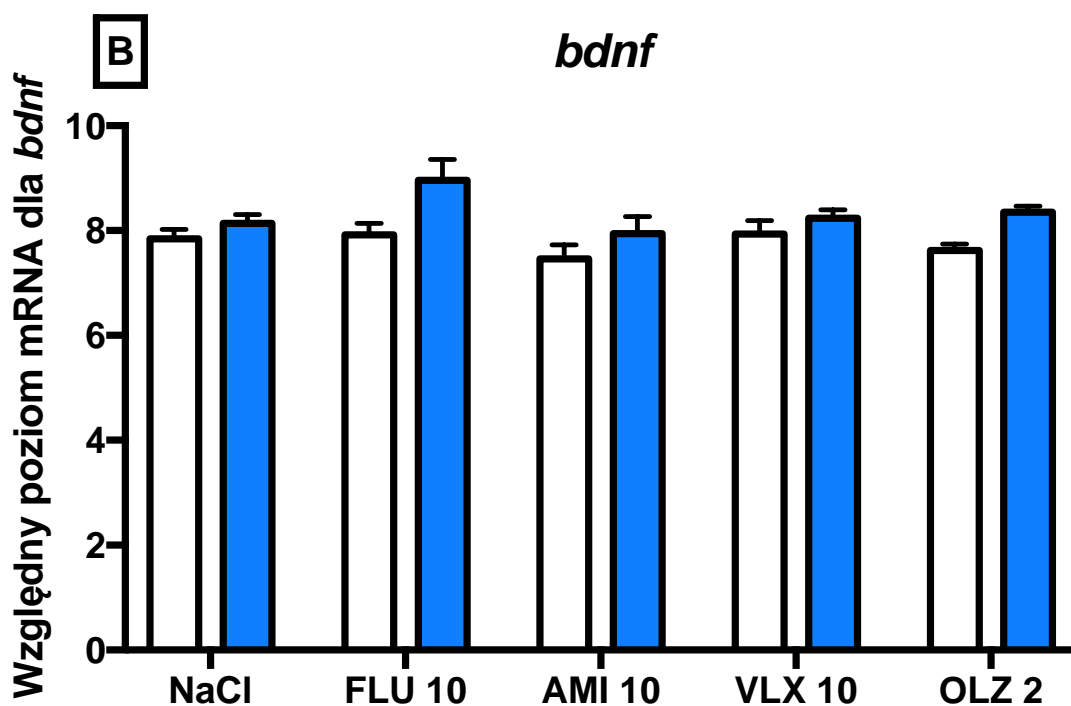
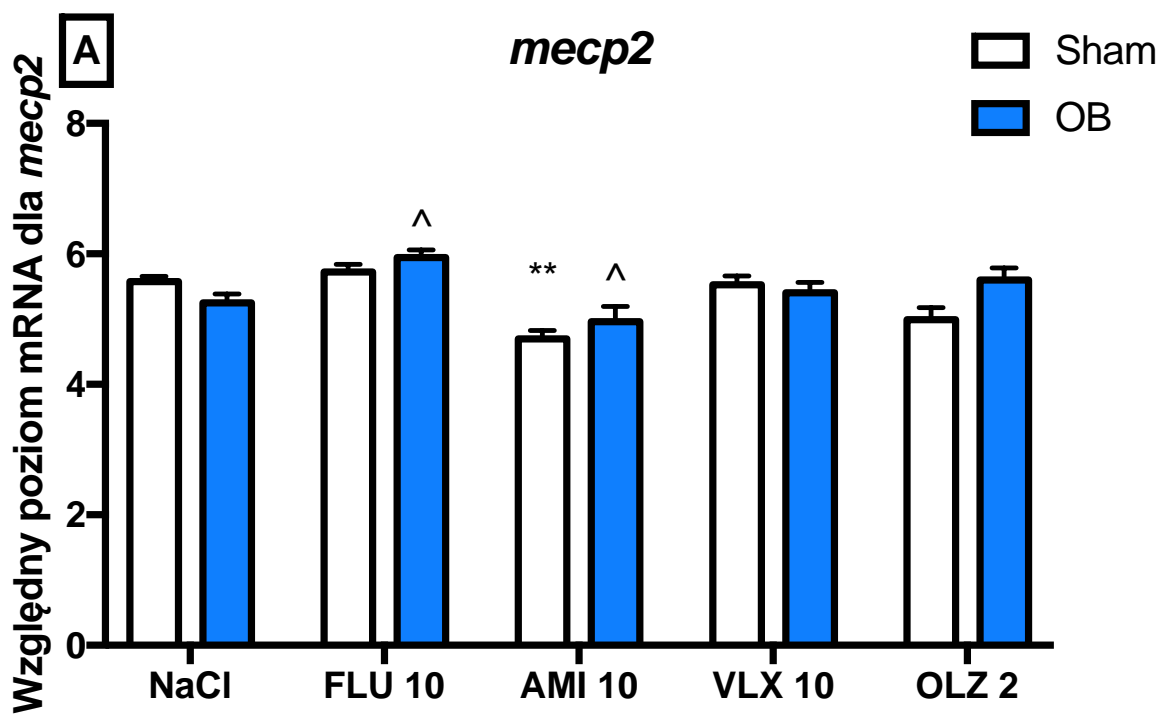


Ekspresja *mecp2* zarówno w hipokampie jak i korze czołowej nie zmieniła się po przeprowadzeniu operacji. Spadek ekspresji *mecp2* zanotowano jedynie w korze czołowej po podaniach szczurom operowanym amitryptylin ( $p < 0,05$ ) oraz wzrost po podaniach fluoksetyny ( $p < 0,05$ ) vs grupa OB. NaCl. Również po podaniach amitryptyliny w grupie pozornie operowanej zaobserwowano spadek ekspresji *mecp2* vs Sham NaCl ( $p < 0,001$ ).

Poziom ekspresji genu *bdnf* w hipokampie jak i korze czołowej nie uległ zmianie po przeprowadzeniu operacji usunięcia opuszek węchowych. Podania leków przeciwdepresyjnych fluoksetyny ( $p < 0,01$ ) oraz wenlafaksyny ( $p < 0,01$ ) zwiększało ekspresję genu *bdnf* w hipokampie u szczurów operowanych vs pozornie operowanych.



Ryc.17. Ekspresja genu *mecp2* a) i *bdnf* b) w hipokampie; Sham- szczury pozornie operowane; OB -szczury po usunięciu opuszek węchowych; AMI -Amitryptylina 10 mg/kg; FLU - Fluoksetyna 10 mg/kg; VLX – Wenlafaksyna 10 mg/kg; OLZ – Olanzapina 2 mg/kg; Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) <sup>^</sup> $p<0,05$ ; <sup>^^</sup> $p<0,001$ ; vs OB NaCl

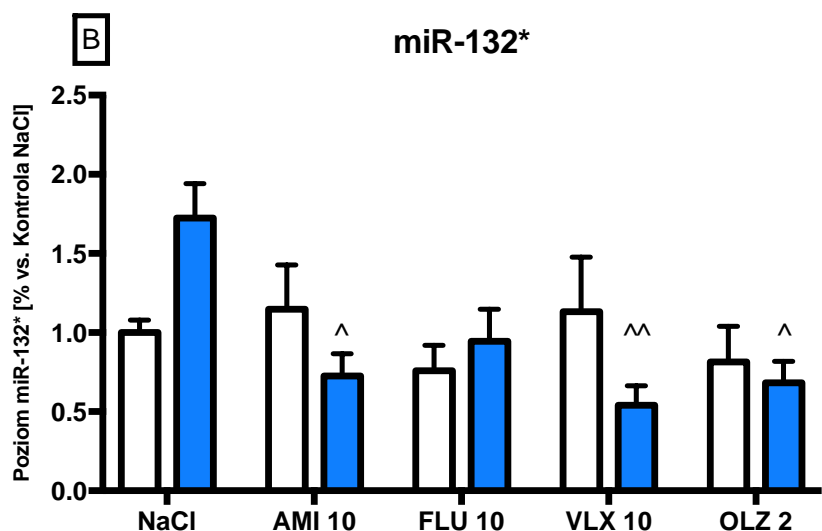
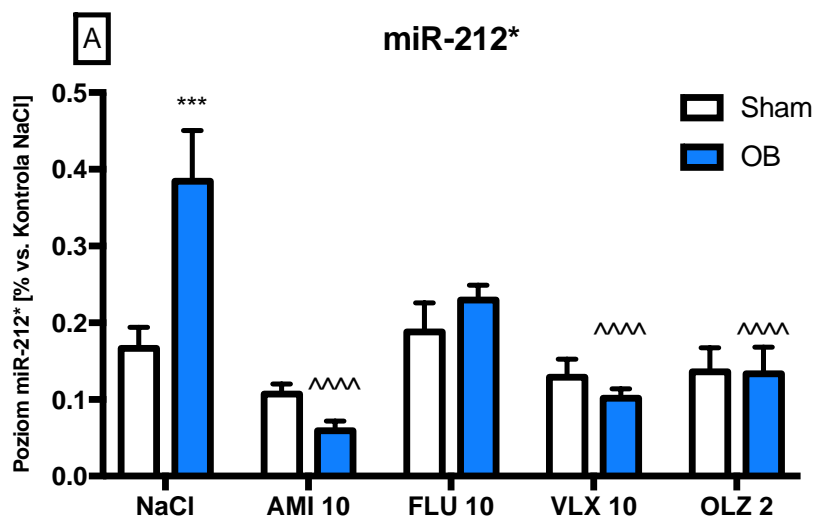


Ryc.18. Ekspresja genu *mecp2* a) i *bdnf* b) w korze czołowej; Sham- szczury pozornie operowane; OB -szczury po usunięciu opuszek węchowych; AMI -Amitryptylina 10 mg/kg; FLU - Fluoksetyna 10 mg/kg; VLX – Wenlafaksyna 10 mg/kg; OLZ– Olanzapina 2 mg/kg; ). *Zmienność*

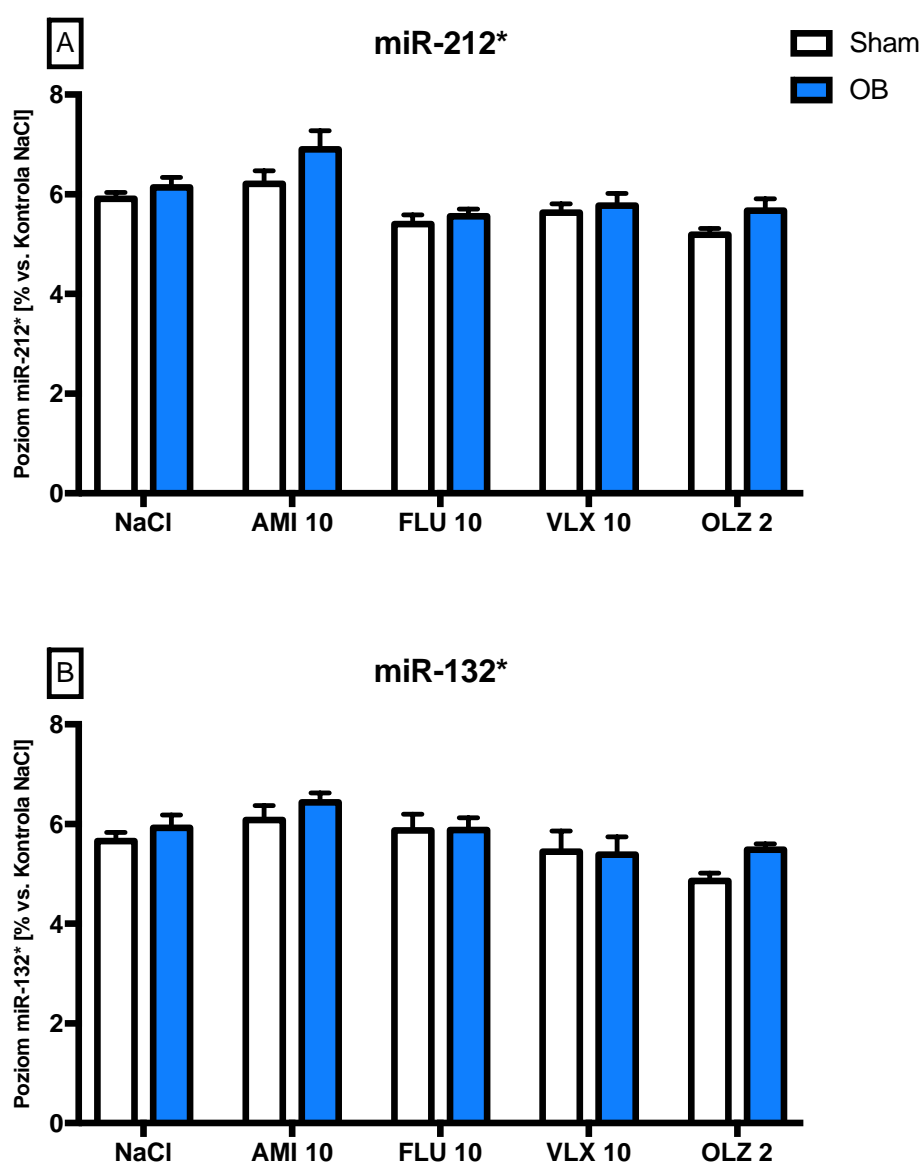
statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  vs Sham NaCl; ^  $p < 0,05$  vs OB NaCl

### 3.3. Wpływ usunięcia opuszek węchowych oraz leków na ekspresję miRNA 132\*; miRNA 212\* w korze czołowej i hipokampie

Usunięcie opuszek węchowych spowodowało istotny wzrost miRNA 212\* ( $p < 0,0008$ ) w hipokampie w stosunku do zwierząt kontrolnych Sham otrzymujących sól fizjologiczną, natomiast miRNA 132\* nie wykazał istotnie statystycznych różnic. W hipokampie u szczurów OB którym podano leki wenlafaksynę ( $p < 0,0001$ ), olanzapinę ( $p < 0,001$ ) oraz amitryptylinę ( $p < 0,0001$ ) poziom ekspresji miRNA 212\* spadał w porównaniu do grupy OB kontrolnej. Tylko podania wenlafaksyny ( $p < 0,001$ ), amitryptyliny ( $p < 0,0497$ ) oraz olanzapiny ( $p < 0,05$ ) obniżały poziom miRNA 132\* w grupach OB + leki w stosunku do grupy OB NaCl. W korze czołowej żadne leki nie wpływały na poziom miRNA 132\* oraz miRNA 212\*.



Ryc.19. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom mir-212\* (A); mir-132\* (B) w hipokampie szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=7-8). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*\*\* p<0,0001 vs Sham NaCl; ^ p<0,05; ^^ p<0,001; ^^^^ p<0,00001 vs OB NaCl*



Ryc.20. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom mir-212\* (A); mir-132\* (B) w korze czołowej szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości*

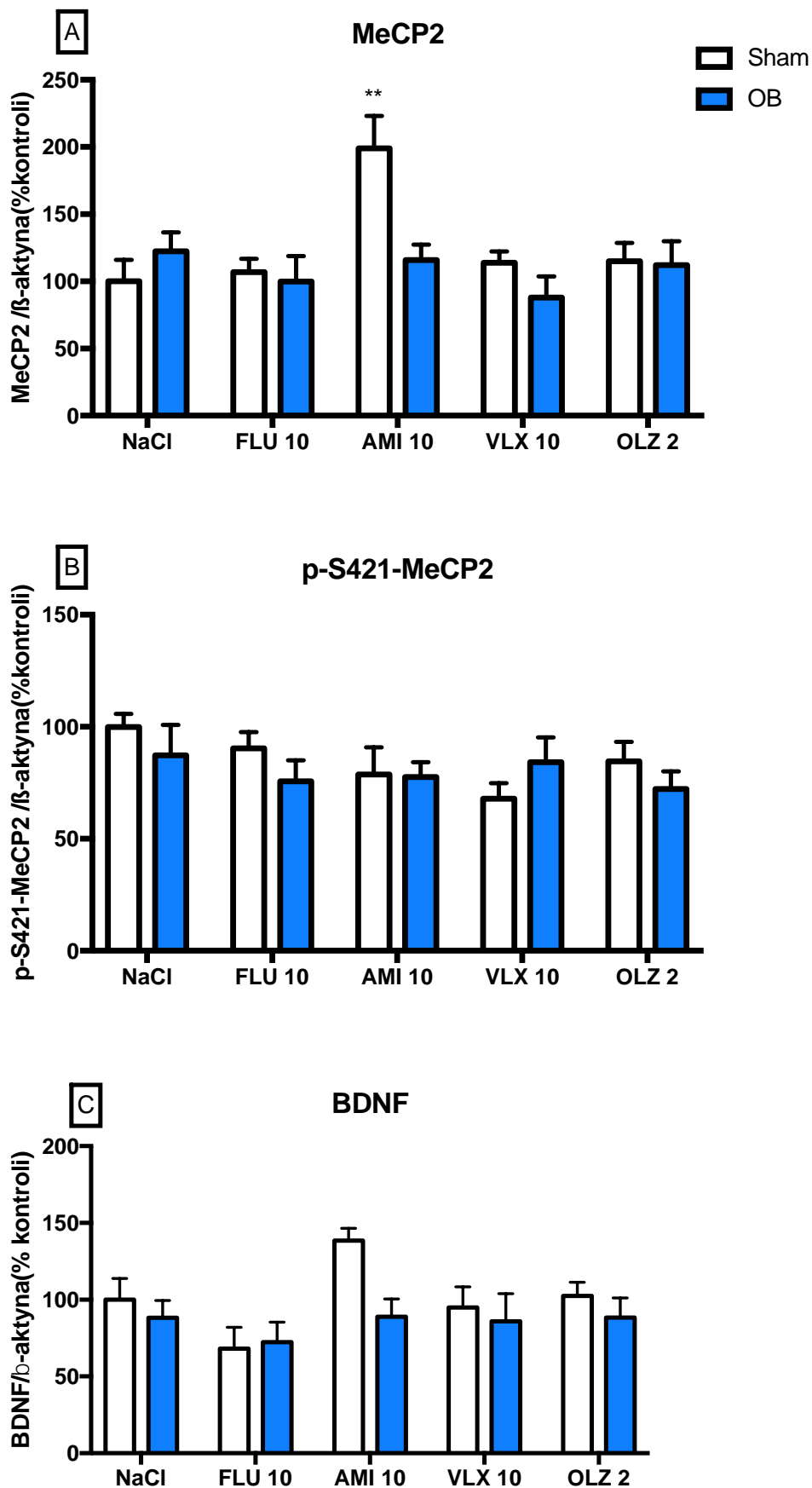
przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)\*\*\*  $p<0,0001$  vs Sham NaCl; ^  $p<0,05$ ; ^^  $p<0,001$ ; ^^^  $p<0,00001$  vs OB NaCl

3.4. Wpływ usunięcia opuszek węchowych na poziom białek BDNF, MeCP2 oraz p-S421-MeCP2 w korze czołowej i hipokampie.

Po wykonaniu procedury usunięcia opuszek węchowych w korze czołowej wykazano wzrost poziomu białka MeCP2 ( $p < 0.001$ ). Po dwóch tygodniach podania leków przeciwdepresyjnych w korze czołowej tylko fluoksetyna zmniejszała poziom białka MeCP2 ( $p < 0.05$ ) w stosunku do grupy OB. NaCl. Forma fosforylowana S421 białka MeCP2 zmieniała się odwrotnie proporcjonalnie co total MeCP2. Usunięcie opuszek węchowych spowodowało obniżenie poziomu fosforylacji S421, a podania leków przeciwdepresyjnych skutkowało jej zwiększeniem (AMI 10 -  $p < 0,05$ ; FLU 10 -  $p < 0,001$ ; VEN 10 -  $p < 0,0001$ ). W Hipokampie poziom białka BDNF jak i fosforylacji S421 MeCP2 nie uległ zmianom. Jedynie poziom białka MeCP2 w grupie Sham po podaniach amitryptyliny wzrósł w stosunku do grupy Sham NaCl ( $p < 0,0019$ ). W tabeli 13 zaprezentowano membrany wykonane analizą Western blot dla kory czołowej i hipokampa szczurów w modelu OB.

Tabela.13. Przykładowe/reprezentacyjne bloty wybranych czynników epigenetycznych w korze czołowej szczurów po procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW-kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

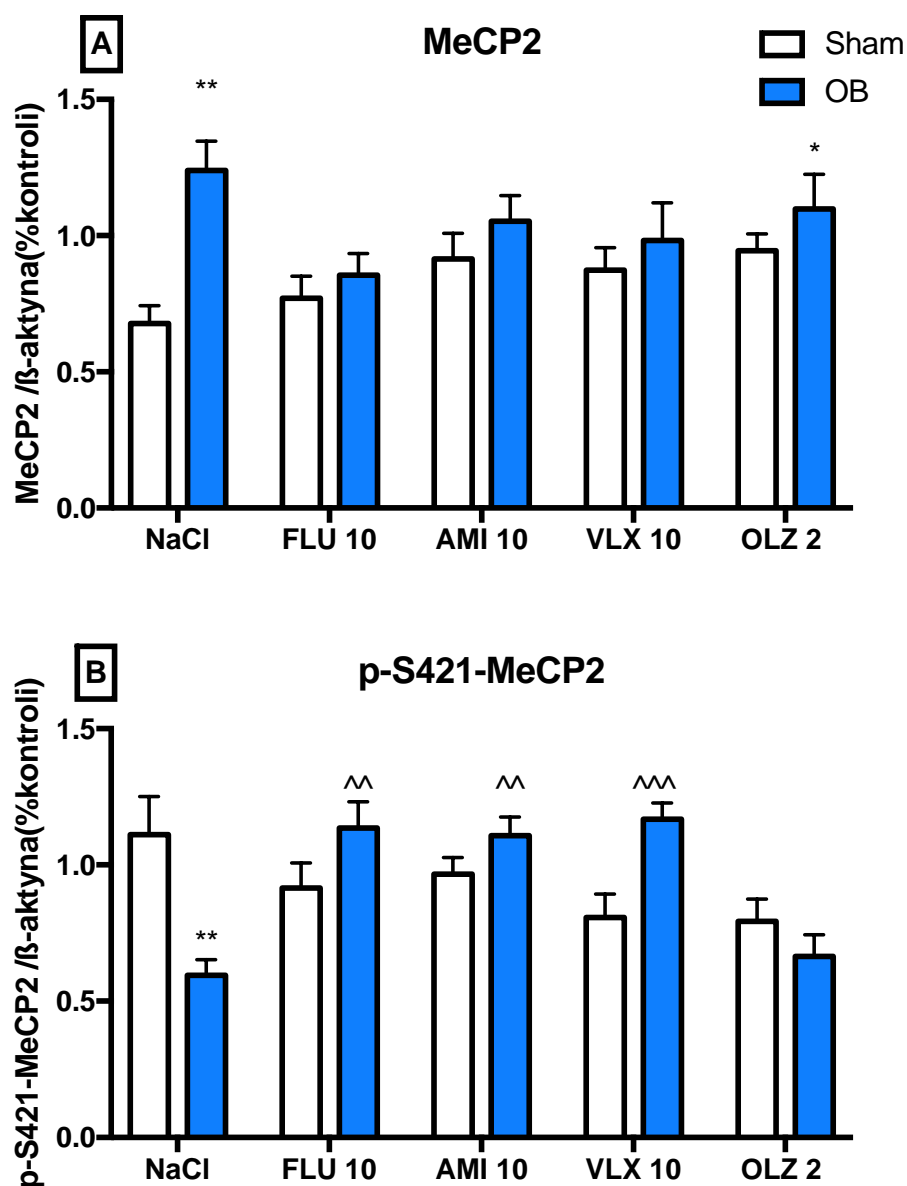
| Białko       | Kora czołowa |    |     |     |     |         |     |     |     |  | Hipokamp  |    |     |     |     |         |     |     |     |  |
|--------------|--------------|----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|--|-----------|----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|--|
|              | Sham (Sh)    |    |     |     |     | OB (Ob) |     |     |     |  | Sham (Sh) |    |     |     |     | OB (Ob) |     |     |     |  |
| MeCP2        | Sh           | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO |  | Sh        | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO |  |
|              |              |    |     |     |     |         |     |     |     |  |           |    |     |     |     |         |     |     |     |  |
| β-aktyna     |              |    |     |     |     |         |     |     |     |  |           |    |     |     |     |         |     |     |     |  |
| p-S421-MeCP2 | Sh           | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO |  | Sh        | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO |  |
|              |              |    |     |     |     |         |     |     |     |  |           |    |     |     |     |         |     |     |     |  |
| β-aktyna     |              |    |     |     |     |         |     |     |     |  |           |    |     |     |     |         |     |     |     |  |
| BDNF         | Sh           | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO |  | Sh        | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO |  |
|              |              |    |     |     |     |         |     |     |     |  |           |    |     |     |     |         |     |     |     |  |
| β-aktyna     |              |    |     |     |     |         |     |     |     |  |           |    |     |     |     |         |     |     |     |  |



Ryc.21. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek MeCP2 (A) p-S421-MeCP2 (B) oraz



BDNF (C) w hipokampie szczurów OB; Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*\*  $p<0,001$  vs Sham NaCl



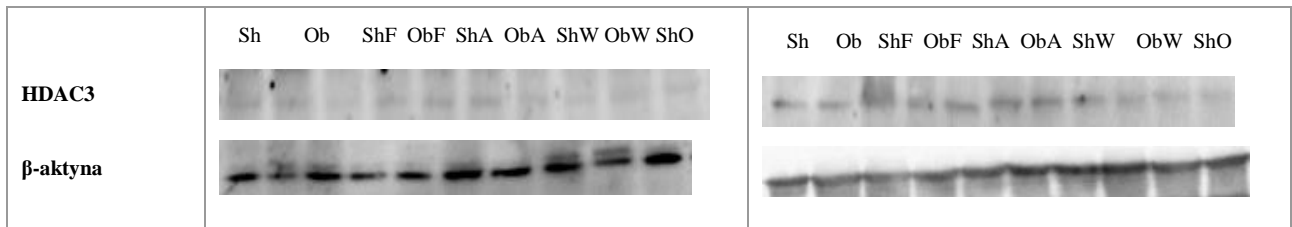
Ryc.22. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek MeCP2 (A) p-S421-MeCP2 (B) w korze czołowej szczurów OB; Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*\*\*  $p<0,0001$  vs Sham NaCl; ^  $p<0,05$ ; ^^  $p<0,001$ ; ^^^  $p<0,00001$  vs OB NaCl

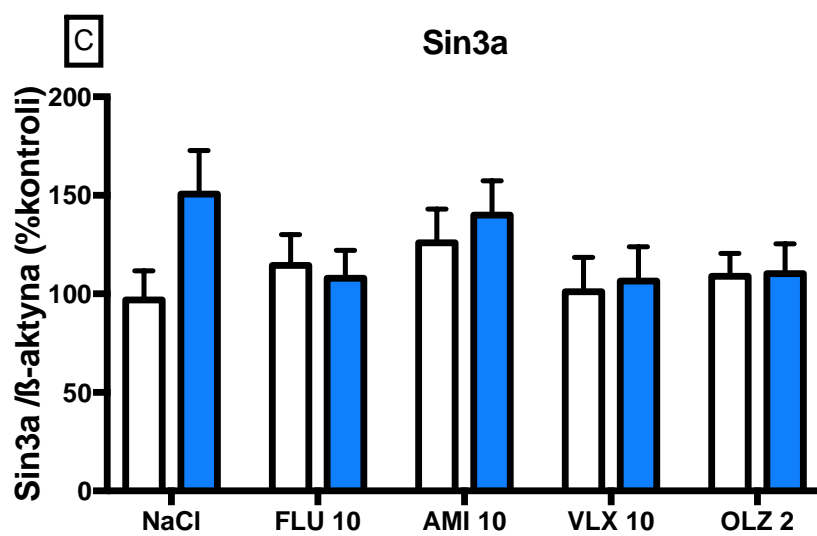
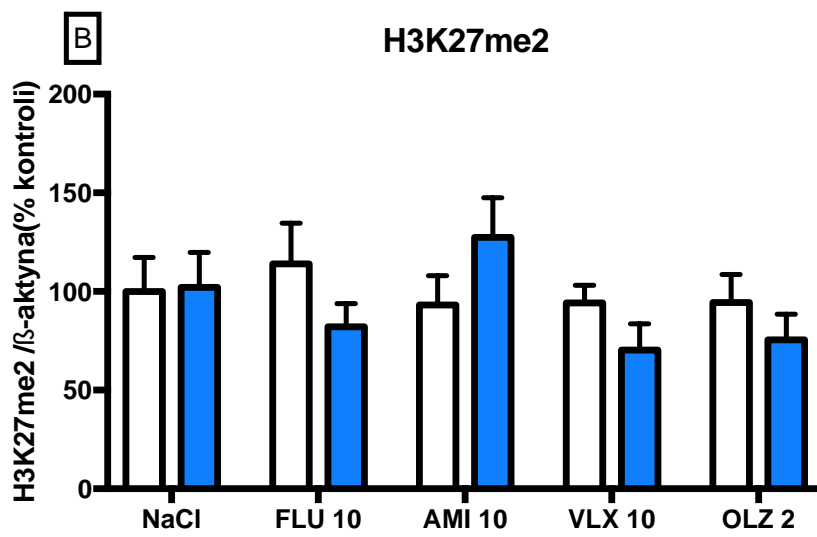
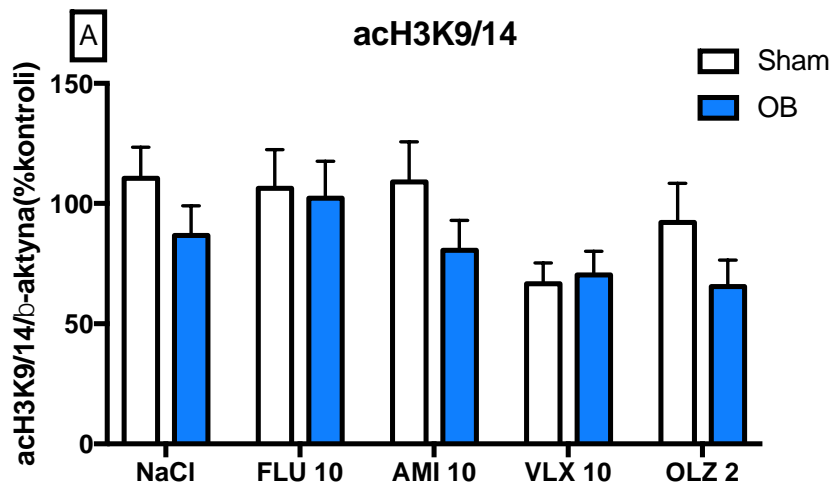
### 3.5. Wpływ usunięcia opuszek węchowych na poziom białek wybranych czynników epigenetycznych w korze czołowej i hipokampie

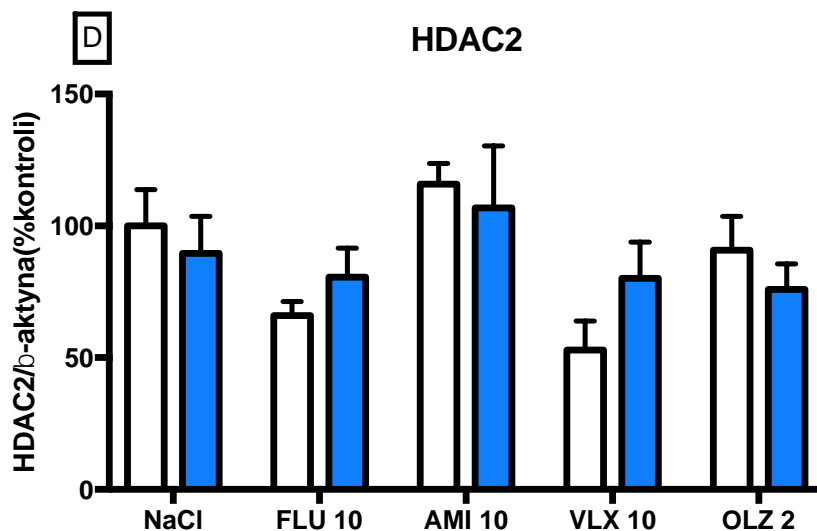
W modelu Usunięcia Opuszek węchowych oznaczono poziom białka dla wybranych czynników epigenetycznych takich jak: HDAC2 i 3, acH3K9/14 jak i Sin3a. W korze czołowej poziom acetylacji H3K9/14 uległ zmniejszeniu w grupie OB NaCl ( $p < 0,05$ ) i zwiększył po zastosowaniu wenlafaksyny ( $p < 0,05$ ). Poziom białka co-represorowego Sin3a oraz HDAC3 nie uległ zmianie w modelu OB, natomiast poziom HDAC2 zwiększył się w grupie OB NaCl ( $p < 0,05$ ) i zmniejszył po podaniach amitryptyliny ( $p < 0,001$ ). Nie wykazano zmian w poziomie di-metylacji histonu H3K27. W hipokampie poziom białek acH3K9/14, H3K27me2, HDAC2 oraz Sin3a nie uległy zmianom. W tabeli 14 przedstawiono przykładowe membrany z metody Western blot.

Tabela.14. Przykładowe/reprezentacyjne bloty wybranych czynników epigenetycznych w korze czołowej szczurów po procedurze OB; Sh-Sham NaCl; Ob- OB NaCl, ShF- Sham Fluoksetyna; ObF- OB Fluoksetyna; ShA- Sham Amitryptylina; ObA- OB Amitryptylina; ShW-Sham Wenlafaksyna; ObW- OB Wenlafaksyna; ShO- Sham Olanzapina; ObO- OB Olanzapina

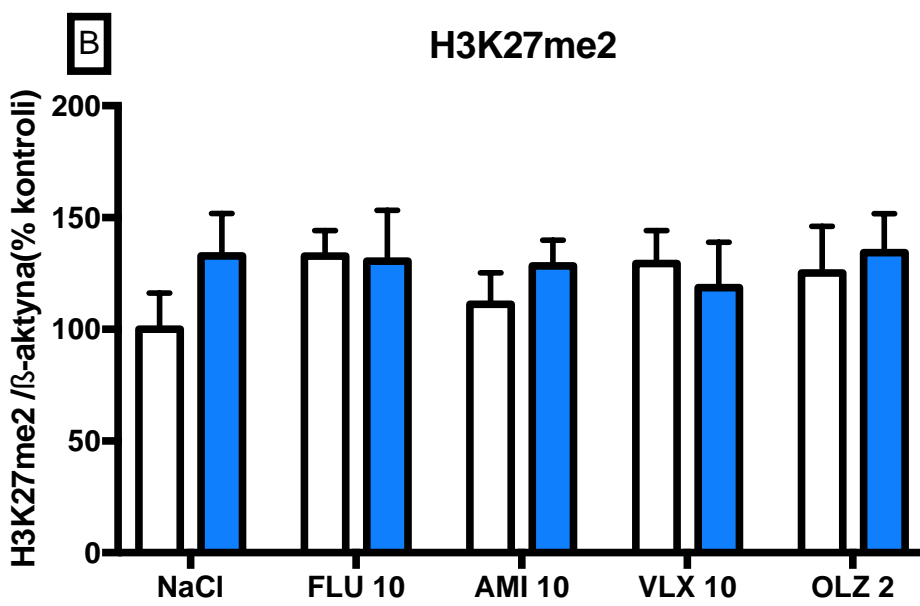
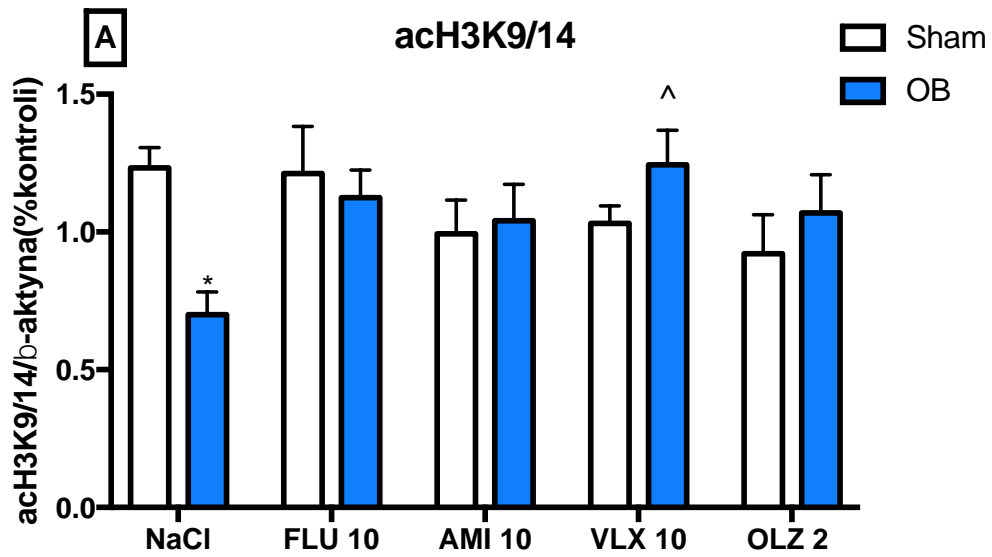
| Białko          | Kora czołowa |    |     |     |     |         |     |     |     |    | Hipokamp  |     |     |     |     |         |     |     |    |    |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------|--------------|----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|----|-----------|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | Sham (Sh)    |    |     |     |     | OB (Ob) |     |     |     |    | Sham (Sh) |     |     |     |     | OB (Ob) |     |     |    |    |     |     |     |     |     |     |     |
| acH3K9/14       | Sh           | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO | Sh | Ob        | ShF | ObF | ShA | ObA | ShW     | ObW | ShO | Sh | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA | ShW | ObW | ShO |
| $\beta$ -aktyna |              |    |     |     |     |         |     |     |     |    |           |     |     |     |     |         |     |     |    |    |     |     |     |     |     |     |     |
| H3k27me2        | Sh           | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO | Sh | Ob        | ShF | ObF | ShA | ObA | ShW     | ObW | ShO | Sh | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA | ShW | ObW | ShO |
| $\beta$ -aktyna |              |    |     |     |     |         |     |     |     |    |           |     |     |     |     |         |     |     |    |    |     |     |     |     |     |     |     |
| Sin3a           | Sh           | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO | Sh | Ob        | ShF | ObF | ShA | ObA | ShW     | ObW | ShO | Sh | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA | ShW | ObW | ShO |
| $\beta$ -aktyna |              |    |     |     |     |         |     |     |     |    |           |     |     |     |     |         |     |     |    |    |     |     |     |     |     |     |     |
| HDAC2           | Sh           | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA     | ShW | ObW | ShO | Sh | Ob        | ShF | ObF | ShA | ObA | ShW     | ObW | ShO | Sh | Ob | ShF | ObF | ShA | ObA | ShW | ObW | ShO |
| $\beta$ -aktyna |              |    |     |     |     |         |     |     |     |    |           |     |     |     |     |         |     |     |    |    |     |     |     |     |     |     |     |

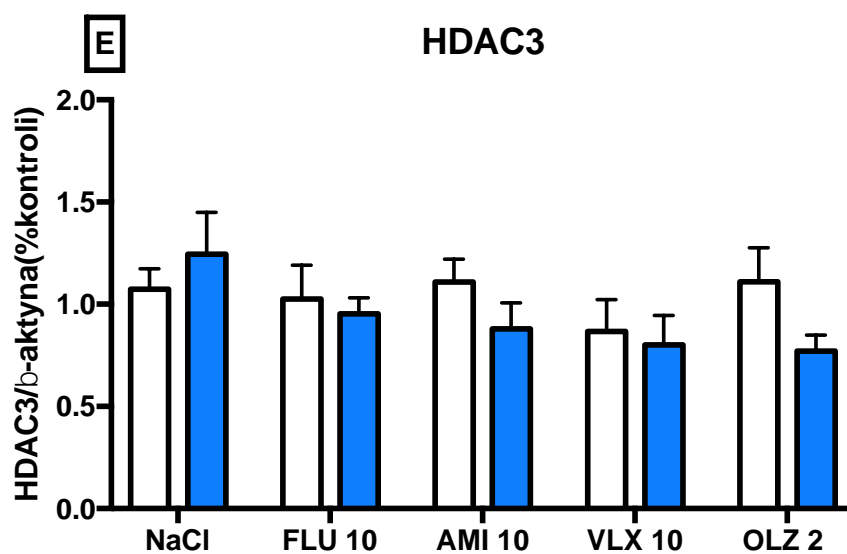
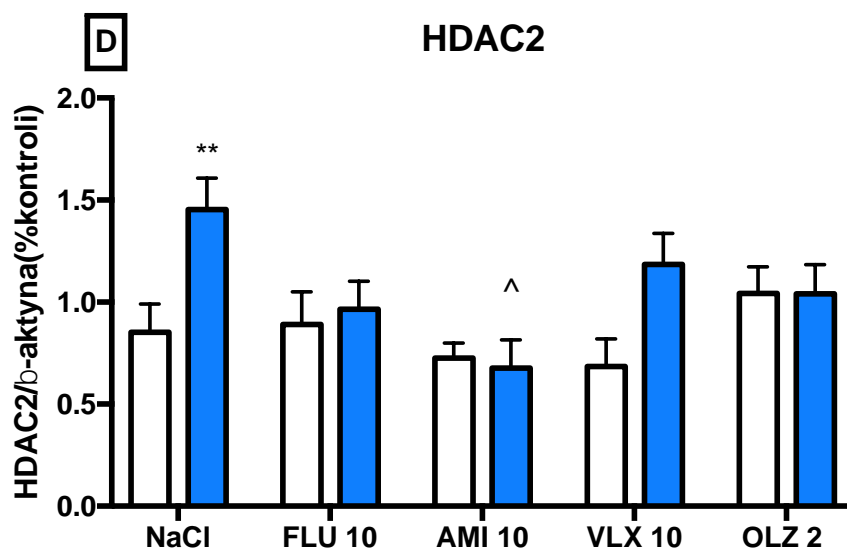
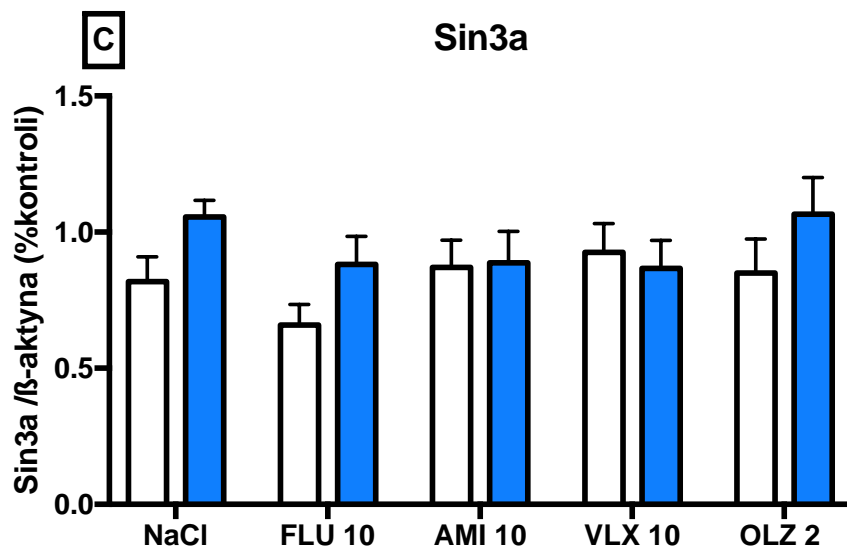






Ryc.23. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek acH3K9/14 (A) H3K27me2 (B) Sin3a (C) HDAC2 (D) w hipokampie szczurów OB; Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)





Ryc.24. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10)

oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek acH3K9/14 (A) H3K27me2 (B) Sin3a (C) HDAC2 (D) oraz HDAC3 (E) w korze czołowej szczurów OB; Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=7-8). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*\* p<0,001 vs Sham NaCl; ^ p<0,05 vs OB NaCl*



#### 4. Podsumowanie Wyników

Zarówno w korze czołowej jak i hipokampie w tkankach ludzkich obserwowano spadki poziomu białek BDNF i acetylacji H3K9/14 oraz wzrosty poziomu białek MeCP2, H3K27me2 oraz HDAC3. W hipokampie osób, które popełniły samobójstwo poziom białka p-S421-MeCP2 uległ obniżeniu, a Sin3a wzrósł. W korze czołowej w tkankach ludzkich zanotowano wzrost poziomu HDAC2.

Przewlekły łagodny stres zmniejsza poziom ekspresji BDNF, ale nie MeCP2 w hipokampie. Z drugiej strony poziom białka p-S421-MeCP2 i acetylacji H3 lizynie 9/14 ulegają obniżeniu po zastosowaniu procedury stresowania w korze czołowej. W hipokampie jedynie di-metylacja histonu H3 uległa zwiększeniu w grupie stresowanej kontrolnej w stosunku do niestresowanej kontrolnej.

W modelu Usunięcia Opuszek Węchowych poziom białek BDNF, p-S421-MeCP2 i acetylacji histonu 3 na lizynie 9/14 ulegają obniżeniu natomiast poziom białka MeCP2 oraz HDAC2 wzrosł.

Tabela 15. Zmiany poziomu genów w modelach CMS, OB. i tkankach ludzkich; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

| Geny         | CMS |    | OB  |    |
|--------------|-----|----|-----|----|
|              | FCX | HP | FCX | HP |
| <i>mecp2</i> | -   | -  | -   | -  |
| <i>bdnf</i>  | ↓   | -  | -   | -  |

Tabela 16. Zmiany poziomu białek w modelach CMS, OB. i tkankach ludzkich; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

| Białka | Tkanki Ludzkie |    | CMS |    | OB  |    |
|--------|----------------|----|-----|----|-----|----|
|        | FCX            | HP | FCX | HP | FCX | HP |
|        |                |    |     |    |     |    |

|              |   |   |   |   |   |   |
|--------------|---|---|---|---|---|---|
| MeCP2        | ↑ | ↑ | - | - | ↑ | - |
| p-S421-MeCP2 | - | ↓ | ↓ | - | ↓ | - |
| BDNF         | ↓ | ↓ | - | - | N | N |
| acH3K9/14    | ↓ | ↓ | ↓ | - | ↓ | - |
| H3K27me2     | ↑ | ↑ | - | ↑ | N | - |
| Sin3a        | - | ↑ | - | - | - | - |
| HDAC2        | ↑ | - | - | - | ↑ | - |
| HDAC3        | ↑ | ↑ | N | N | - | N |

W modelach CMS jak i OB poziom białka p-S421-MeCP2 w korze czołowej uległ podwyższeniu po zastosowaniu leków przeciwdepresyjnych z grupy SSRI, SSNRI i TLPD. W modelu Przewlekłego łagodnego stresu poziom acetylacji H3K9/14 uległ podwyższeniu po zastosowaniu wenlafaksyny ale tylko w grupie niestresowanej. Ekspresja BDNF w CMS w hipokampie i korze czołowej zwiększyła się po podaniach imipraminy i wenlafaksyny oraz escitalopramu w korze czołowej. Escitalopram również obniżał ekspresję MeCP2 w korze czołowej u zwierząt nie stresowanych. W hipokampie po podaniach imipraminy i escitalopramu zanotowano podwyższony poziom fosforylacji S421 dla MeCP2. Podania wenlafaksyny zmniejszyły poziom HDAC2 w stosunku do grupy stresowanej NaCl.

W modelu OB w korze czołowej po podaniach fluoksetyny stwierdzono zmniejszony poziom białka MeCP2 oraz HDAC2 po podaniach amitryptyliny. Wenlafaksyna podwyższała poziom białka acH3K9/14 w korze czołowej. W hipokampie fluoksetyna i wenlafaksyna podwyższały ekspresję genu BDNF, a fluoksetyna w korze czołowej obniżała ekspresję MeCP2.

Tabela 17. Zmiany ekspresji geów w modelach CMS, OB. po podaniach leków; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności,

| Geny  | CMS                     |                  | OB        |                      |
|-------|-------------------------|------------------|-----------|----------------------|
|       | FCX                     | HP               | FCX       | HP                   |
| MeCP2 | ↓ ESCIT kontrola        | -                | ↓ FLU OB. | -                    |
| BDNF  | ↑ IMI, ESCIT, VLX stres | ↑ IMI, VLX stres | -         | ↑ FLU OB<br>↑ VLX OB |

Tabela 18. Zmiany poziomu białek w modelach CMS, OB. po podaniach leków; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

| Białka       | CMS                    |                   | OB                |           |
|--------------|------------------------|-------------------|-------------------|-----------|
|              | FCX                    | HP                | FCX               | HP        |
| MeCP2        | -                      | -                 | ↓ FLU OB          | ↑AMI Sham |
| p-S421-MeCP2 | ↑IMI, ESCIT, VLX stres | ↑ IMI , ESC stres | ↑AMI, FLU, VLX OB | -         |
| BDNF         | -                      | -                 | N                 | -         |
| acH3K9/14    | ↑ VLX kontrola         | -                 | ↑ VLX OB          | -         |
| HDAC2        | -                      | ↓ VLX stres       | ↓AMI OB           | -         |
| Sin3a        | -                      | -                 | N                 | -         |

|          |   |   |   |   |
|----------|---|---|---|---|
| H3K27me2 | - | - | N | - |
|----------|---|---|---|---|

W zwierzęcych modelach depresji oznaczono miRNA mające wpływ na regulację MeCP2 takie jak miR132 oraz miR212.

W modelu CMS w korze czołowej nie zaobserwowano zmian w obrębie ekspresji mir132 ale stres powodował wzrosty w obrębie miR212\*. Olanzapina skutkowała zmniejszeniem ekspresji miR212\* w korze czołowej. W hipokampie w modelu CMS stres zwiększał poziom mir132\* i 212\*, a podania leków escitalopramu, Wenlafaksyny i olanzapiny powodowały obniżenie tych miR-ów.

W modelu OB w korze czołowej nie wykazano zmian miRNA 132\* oraz 212\*. W hipokampie usunięcie opuszek węchowych zwiększa ekspresję miRNA 212\*, ale nie wpływa na miRNA 132\*. Podania leków amitryptyliny, wenlafaksyny oraz olanzapiny skutkuje spadkiem ekspresji zarówno miRNA 132\* jak i miRNA212\*.

Tabela 19. Zmiany ekspresji miRNA w modelach CMS, OB. po podaniach leków; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

| miRNA   | CMS              |                               | OB  |                            |
|---------|------------------|-------------------------------|-----|----------------------------|
|         | FCX              | HP                            | FCX | HP                         |
| miR132* | -                | ↑ Stres<br>↓ ESC,<br>VLX, OLZ | -   | ↓ AMI,<br>VLX, OLZ         |
| miR212* | ↑ Stres<br>↓ OLZ | ↑ Stres<br>↓ ESC,<br>VLX, OLZ | -   | ↑ OB<br>↓ AMI,<br>VLX, OLZ |

## DYSKUSJA:

Powszechnie wiadomo iż samobójstwa towarzyszą chorobom psychicznym takim jak m.in. psychozy, schizofrenia choroby związane ze stresem oraz depresja. Szacuje się iż największy odsetek samobójstw wśród chorób psychicznych towarzyszy depresji a szczególnie MDD (Mandelli and Serretti, 2013). Wiadomo również iż depresja związana jest z myślami samobójczymi szczególnie u młodych osób w wieku produkcyjnym (Lewis *et al.*, 2019; Lippard *et al.*, 2019). Oprócz badań opartych na analizie genomu coraz częściej skupia się na opracowywaniu profilu epigenetycznego. Ostatnie badania wskazują na udział hypermetylacji BDNF oraz małych niekodujących RNA w zachowaniach samobójczych (Kang *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018). Dlatego też w naszych badaniach skupiliśmy się na analizie MeCP2 jako czynnika wpływającego na poziom BDNF oraz wybranych czynników epigenetycznych biorących udział w jego regulacji (Maussion *et al.*, 2015).

W pracy wykonano oznaczenia poziomu białka w korze czołowej i hipokampie osób, które popełniły samobójstwo. W badaniach stwierdziliśmy zmniejszony poziom białka BDNF i acH3K9/14 zarówno w korze czołowej i hipokampie oraz zwiększony poziom H3K27me2, MeCP2 i HDAC3 w tych strukturach. Ponadto zanotowaliśmy wzrost Sin3a i HDAC2 w hipokampie przy spadku p-S421-MeCP2. W korze czołowej nie wykazaliśmy zmian w Sin3a i fosforylacji S421 MeCP2. Sugeruje to iż zachowania samobójcze wiążą się z daleko idącymi zmianami w profilu czynników epigenetycznych, a ponadto BDNF w korze czołowej może być regulowany inaczej niż w hipokampie. W korze czołowej zmiany BDNF mogą być regulowane na drodze niezależnej od fosforylacji S421 MeCP2. Wzrost H3K27me2 oraz MeCP2 i HDAC3 może sugerować powstawanie kompleksu represorowego związanego ze zwiększeniem metylacji oraz deacetylacji BDNF. Badania sugerują iż poziom HDAC3/MeCP2 powoduje upregulację deacetylacji genów (Nott *et al.*, 2016), a wzrost H3K27me2 może się wiązać z metylacją DNA genu BDNF (Sweatt, 2013). W hipokampie BDNF wydaje się być regulowany poprzez spadki S421 oraz zwiększeniu sprzężenia kompleksu MeCP2/Sin3a/HDAC2/3 z BDNF. Aktywny proces deacetylacji oraz metylacji wraz ze spadkiem fosforylacji wskazuje na udział hipokampalnego BDNF w procesy powstawania prób samobójczych.

W literaturze można znaleźć prace dotyczące roli metylacji DNA oraz metylacji histonów u ludzi popełniających samobójstwa. Sugeruje się zwiększony poziom metylacji w tej grupie w mózgu (Haghighi *et al.*, 2014; Lockwood, Su and Youssef, 2015; Roy and Dwivedi, 2017b). Badania wskazują również na znaczący wpływ spadku poziomu metylacji dwóch loci cg19035496 oraz cg23409074 na promotorze genu CRH (Jokinen *et al.*, 2018). Ponadto u pacjentów samobójczych stwierdzono zwiększony poziom trimetylacji H3K27 genu SMOX oraz H3K9me3 CX30 i 40 (Roy and Dwivedi, 2017a). Prace badawcze jak dotychczas skupiły się na udziale metylacji DNA na zmianę ekspresji genów w mózgach ludzkich, dlatego też należy poszerzyć wiedzę o inne czynniki epigenetyczne mogące mieć wpływ na kreowanie się myśli samobójczych.

Ponadto znany jest wpływ leków na zmiany epigenetyczne w mózgu gryzoni co może przełożyć się na mózg ludzki (Choi *et al.*, 2015b). Dlatego też kolejnym krokiem było przeprowadzenie analiz MeCP2 jego fosforylacji S421 oraz innych białek epigenetycznych w modelach zwierzęcych. W pracy wykorzystano dwa różne modele zwierzęce. W modelu przewlekłego łagodnego stresu zachowania depresyjne kształtowane są przez stosowanie bodźców stresowych. W modelu usunięcia opuszek węchowych do wywołania zachowań depresyjnych stosowane jest mechaniczne/operacyjne usunięcie opuszek węchowych. Dwa odrębne modele miały dostarczyć wyników porównawczych dla analizowanych białek.

Model Przewlekłego łagodnego stresu jest jednym z najczęściej wykorzystywanych modeli naśladujących zachowania typu depresyjnego u zwierząt. Celem zainicjowania u gryzoni objawów podobnych do depresji u ludzi stosuje się przez określony czas różne bodźce stresowe. Do CMS wybrano szczury szczepu Wistar, których tło genetyczne pozwala na wykorzystanie ich w wielu modelach, nie tylko dotyczących stresu ale również otyłości, starzenia i w onkologii (Balyan *et al.*, 2018; Chaby *et al.*, 2019; He *et al.*, 2019; O'Flaherty, Neigh and Rainnie, 2019). Przewlekły łagodny stres prowadzi do pojawienia się u zwierząt anhedonii, której odzwierciedleniem jest obniżenie spożycia 1% roztworu sacharozy. W naszych badaniach wykazano spadek spożycia sacharozy u szczurów stresowanych w stosunku do kontroli, a po podaniach leków przeciwdepresyjnych o różnym profilu działania niwelowało skutki stresu. Należy zwrócić uwagę iż anhedonia u szczurów stresowanych wykształciła się już w pierwszym tygodniu stosowania bodźców stresowych i utrzymywała się u szczurów stresowanych otrzymujących NaCl przez cały czas trwania procedury. W modelu CMS walidowanym przez Papp i wsp. bodźce stresowe podawane są przez 7 tygodni nawet podczas podań leków. Leki imipramina, wenlafaksyna i escitalopram w dawce 10 mg/kg zwiększały spożycie sacharozy u szczurów stresowanych w stosunku do stresowanych kontrolnych (podana sól fizjologiczna). W teście SPT pomimo aktywności wszystkich zastosowanych leków stwierdzono różną ich skuteczność. Najslabiej działającym lekiem była olanzapina a najszybciej wenlafaksyna. Podania olanzapiny (2 mg/kg) również prowadziły do zwiększenia spożycia sacharozy co świadczy o działaniu anty-anhedonicznym w tym modelu. Olanzapina jako antagonist receptorów D2 i 5-HT2 jest stosowana głównie w leczeniu schizofrenii, epizodów maniакаlnych jak również wraz z fluoksetyną w leczeniu BPI w Stanach Zjednoczonych. Jednym ze skutków ubocznych leków przeciwdepresyjnych jest utrata masy ciała (Fernstrom, Krowinski and Kupfer, 1986; Serretti and Mandelli, 2010). Nasze badania wykazały niewielki spadek wagi u szczurów stresowanych, którym podawano imipraminę co jest zgodne z danymi literaturowymi. Natomiast podania olanzapiny w dawce 2 mg/kg nie miały wpływu na wahania masy ciała (spadki) co jest charakterystyczne dla wyższych dawek tego związku (Gumuslu *et al.*, 2013; Bilgic *et al.*, 2018; Reynolds *et al.*, 2019). Orsetti i współpracownicy natomiast potwierdzili, że olanzapina

podawana chronicznie w CMS w dawce 0.1 i 0.5 mg/kg nie wpływa na pobór sacharozy w SPT (Orsetti *et al.*, 2007). Zastosowanie olanzapiny jako atypowego leku przeciwpsychotycznego używanego w leczeniu BPI pozwoliło wskazać czy badane przez nas mechanizmy są charakterystyczne jedynie dla leków o profilu przeciwdepresyjnym czy również obejmują leki stosowane w leczeniu depresji.

Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego jest jednym z wielu potencjalnych markerów depresji. W badaniach przedklinicznych ulega on obniżeniu w układzie limbicznym, a leki przeciwdepresyjne przywracają jego kontrolny poziom. Nasze badania wykazały brak zmian w ekspresji genu *bdnf* w hipokampie między grupom stresowaną, a kontrolną. Podania Imipraminy i wenlafaksyny zwiększały ekspresję tego genu. Również wzrost poziomu genu *bdnf* w stosunku do grupy stresowanej NaCl wykazano w grupie kontrolnej po podaniach imipraminy i escitalopramu. W korze czołowej stres obniżał ekspresję dla *bdnf*, a podania leków imipraminy, wenlafaksyny oraz escitalopramu zwiększały jego ekspresję, co świadczy o zaangażowaniu *bdnf* w procesy zachodzące w korze czołowej przekładające się na wywołanie anhedonii u szczurów poddanych procedurze CMS. Co ciekawe wszystkie zastosowane leki przeciwdepresyjne w grupach kontrolnej + odpowiedni lek zwiększały poziom tego genu w stosunku do grupy stresowanej NaCl. Poziom ekspresji genu *bdnf* między grupami stresowane + lek, a kontrola + lek uplasował się na podobnym poziomie. Może to świadczyć o braku istotnie statystycznego wpływu leków na ekspresję tego genu u zwierząt kontrolnych, ale wpływ leków na wzrost BDNF u zwierząt z wywołanymi zachowaniami depresyjno-podobnymi. Wyniki dotyczące braku zmian ekspresji *bdnf* w hipokampie są zgodne z przeprowadzonymi badaniami w modelu CMS przez Sowa-Kućma i wsp. (Sowa-Kućma *et al.*, 2008). Papp i wsp. również nie wykazali zmian ekspresji genu *bdnf* w hipokampie w modelu CMS, a jedynie spadek poziomu białka dla receptora TRK $\beta$  (kinaza B związana z tropomiozyną o wysokim powinowactwie) (Papp *et al.*, 2018). Mature BDNF wiąże się z TRK $\beta$  co prowadzi do aktywacji wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałowej zwiększającej poziom NDMA (kwas N-metylo-D-asparaginowy). Aktywacja BDNF/ TRK $\beta$  może odbywać się na trzech poziomach aktywacji poprzez ścieżkę PI3K, MAPK/ERK i PLC $\gamma$  (Autry and Monteggia, 2012). Nadekspresja genu *bdnf* w korze czołowej po lekach przeciwdepresyjnych może skutkować poprawą przeżywalności neuronów w tej strukturze jednak należy przeprowadzić dalsze badania aby potwierdzić te przypuszczenia. Nie zaobserwowano również istotnie statystycznych zmian ekspresji genu *mecp2* zarówno w korze czołowej jak i hipokampie, co może świadczyć o braku wpływu MeCP2 na regulację BDNF. Ze względu na brak zmian *bdnf* w hipokampie do analizy białek nie wybrano tej struktury. W korze czołowej stwierdzono spadek acetylacji histonu H3 na lizynie 9/14 po przeprowadzonej procedurze CMS, a jedynie Wenlafaksyna powodowała wzrost tej acetylacji. Wpływ warunków środowiskowych na zmiany epigenetyczne jest dobrze udokumentowany w literaturze. Stres wpływa na zaburzenie

poziomu acetylacji histonu H3 jak i HDAC1 oraz DNMT1 (Zheng *et al.*, 2016), a podania chroniczne leków przeciwdepresyjnych zwiększają poziom acetylacji H3. W przedkładanej pracy doktorskiej wzrost poziomu acetylacji H3 po wenlafaksynie będącej inhibitorem wychwytu SERT i NET, a nie po innych zastosowanych lekach przeciwdepresyjnych (inhibitory SERT i lek z grupy TLPD-inhibitory wychwytu zwrotnego SERT i NET) pozwala na stwierdzenie iż acetylacji H3Lys9/14 może być markerem dla tego typu leku stosowanej procedurze CMS. Inne prace sugerują iż chroniczne podania Imipraminy, Fluoksetyny zwiększają acetylacji H3 promotora 4 i 6 dla BDNF w hipokampie (Duclot and Kabbaj, 2015), a podania citalopramu i amitryptyliny modelują poziomy metylacji DNA (Peedicayil, Grayson and Avramopoulos, 2014). Poziom białka MeCP2 nie uległ zmianie w korze czołowej jednak zaobserwowano zmniejszenie poziomu fosforylacji S421 po stresie co normalizowały leki przeciwdepresyjne. Jak wspomniano wcześniej BDNF może być regulowany poprzez fosforylację MeCP2 na serynie 421 i aktywację transkrypcji. Nasze badania sugerują iż w korze czołowej szczurów poddanych CMS zwiększona ekspresja BDNF może odbywać się poprzez fosforylację MeCP2. Nie oznaczono jednak poziomu białek Sin3a/HDAC2 w celu potwierdzenia tej hipotezy. Jednakże badania wskazują na możliwą regulację BDNF poprzez fosforylację S421 w NAc po podaniach citalopramu ale nie reboksetyny oraz niezbędny jej udział w antydepresyjnej aktywności Imipraminy (Zimmermann *et al.*, 2015). W hipokampie szczurów stresowanych zaobserwowaliśmy zwiększony poziom di-metylacji histonu H3K27. Di jak i Tri metylacja histonu H3K27 jest związana z silną represją genów. W komórkach nowotworowych zaangażowana jest w ścieżkę cAMP-PKA, procesy zapalne, a wzrost poziomu H3K27me<sub>2/3</sub> powoduje zahamowanie czynników transkrypcyjnych takich jak CREB (Illiano *et al.*, 2018). Subbanna i wsp. wykazali iż nadekspresja H3K27me<sub>2</sub> wzmacnia procesy neurodegeneracyjne w mózgu poprzez wyciszenie genów niezbędnych dla przeżywalności komórek (Subbanna *et al.*, 2013). W naszych badaniach di metylacją H3 wzrosła u szczurów stresowanych w hipokampie. Może to sugerować iż czynniki stresowe poprzez dimetylację H3 hamują ekspresję genów w hipokampie. Możemy tylko przypuszczać iż będą to geny odpowiedzialne za neuroplastyczność i przeżywalność neuronów. Ponadto leki imipramina i escitalopram skutkowały podwyższonym poziomem białka dla fosforylacji S421 MeCP2, ale nie MeCP2 total oraz BDNF. Wyniki takie mogą sugerować iż Fosforylacji MeCP2 po podaniach Imipraminy i Escitalopramu ale nie innych związków LPD może być niezbędna dla ich odpowiedzi antydepresyjnej ale nie poprzez regulację BDNF, a innych genów. W hipokampie stwierdziliśmy również działanie hamujące wenlafaksyny dla poziom HDAC2 w szczurów CMS. Aktywacja HDAC2 związana jest ze zwiększonym procesem apoptozy poprzez zaangażowanie czynnika p53. Ponadto HDAC2 wraz z HDAC1 hamują wzrost komórek oraz ich nadekspresja może być zaangażowana w oporność chemioterapeutyków w różnych typach nowotworów (Singh, Bishayee and Pandey, 2018). W naszych badaniach działanie hamujące wenlafaksyny na poziom



HDAC2 może wiązać się z jej właściwościami anty-apoptocznymi na komórki hipokampa. Wiadomo jest iż Wenlafaksyna wykazuje działanie hamujące apoptozę u szczurów (Huang *et al.*, 2014; El-Kashef and Sharawy, 2018). W korze czołowej nie zanotowaliśmy zmian w białek dla BDNF, HDAC2, Sin3a i H3K27me2.

W naszych badaniach wykazaliśmy w hipokampie zwierząt stresowanych spadek ekspresji klasteru miR212/132 oraz zwiększenie jego ekspresji po podaniach ecitalopramu, wenlafaksyny i olanzapiny. Klaster miR212/132 jak już wspomniano reguluje poziom MeCP2 w mózgu oraz związany jest z aktywacją neuronalną (Mendoza-Viveros, Chiang, Jonathan L K Ong, *et al.*, 2017). Co ciekawe sam MeCP2 może również regulować poziom ekspresji klasteru (Im *et al.*, 2010). Nasze badania wykazały iż zwiększona ekspresję klasteru w grupie stresowanej co korelowało z brakiem zmian genu *mecp2*. Co więcej zastosowane leki z wyjątkiem Imipraminy zmniejszały ekspresję klasteru i nie wpływały na ekspresję *mecp2*. Jedynie Imipramina podwyższała ekspresję *mecp2* co wiązało się z brakiem zmian ekspresji klasteru. Sugeruje to iż klaster miR212/132 reguluje ekspresję *mecp2* w hipokampie po zastosowaniu procedury stresowania jak i po podaniach leków. Imipramina będąca lekiem z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych jedynie wpływała na wzrost ekspresji genu *mecp2* poprzez braku wpływu na ekspresję klasteru co sugeruje inny poziom regulacji ekspresji tego genu w przypadku TLPD. W korze czołowej nie zaobserwowaliśmy żadnych zmian w poziomie ekspresji miR132, jednak poziom miR212 w grupie stresowanej uległ podwyższeniu, a po podaniach olanzapiny obniżeniu. miR212 jak i mir132 odgrywa znaczącą funkcję w układzie nerwowym jak transmisja synaptyczna, procesy zapalne oraz różnicowanie neuronów. Szacuje się iż mir132 może być negatywnie regulowany przez mir212 (Garcia-Concejo, Jimenez-Gonzalez and Rodríguez, 2016). Ostatnie badania sugerują udział mir212 w autofagii komórkowej szczególnie w nowotworach prostaty (Ojalvo *et al.*, 2015). W badaniach nad mechanizmem i leczeniem depresji rola klasteru miR212/132 jest opisywana jako regulacja ekspresji wielu genów. Sama rola mir212 nie jest znana czy szczegółowo opisywana. Jednak ostatnie badania sugerują jego rolę w ścieżce mTOR poprzez jego pozytywną regulację (Ojalvo *et al.*, 2015) oraz regulację ekspresję genu *bdnf* (Dwivedi, 2016). Zwiększenie poziomu miR212 w grupie stresowanej może sugerować powiązanie tego miR-a z ekspresją genu *bdnf* jednak nie wyjaśnia szczegółowo jego roli w regulacji tego genu. Nie ma badań dotyczących zależności mir212, a MeCP2 i BDNF bez brania pod uwagę miR132. Może się to wiązać z obecnością zbliżonego regionu „seeds” tych miR-ów.

Usunięcie Opuszek Węchowych modeluje depresję agitowaną u zwierząt charakteryzującą się zwiększonym poziomem ruchliwości, agresji, zaburzeniem pamięci, i redukcją aktywności seksualnej (Morales-Medina *et al.*, 2017). Ablacja opuszek węchowych u szczura wiąże się z degeneracją nerwów w opuszcę węchowej i układzie limbicznym, co wpływa na zaburzenia w stężeniu neuroprzekazników serotoniny i noradrenaliny (Padilla *et al.*, 2018). Powyższa

charakterystyka modelu pozwala na odniesienie go do zachowań ludzi cierpiących na depresję, a szczególnie związaną z pojawieniem się myśli i prób samobójczych. Według metodyki zastosowanej w powyższej pracy doktorskiej szczury z usuniętymi opuszkami węchowymi charakteryzował się nadaktywnością lokomotoryczną co stwierdzono w teście Wolnego pola. Leki przeciwdepresyjne z grupy SSNRI, SSRI i TLPD normalizowały nadaktywność motoryczną. Po podaniach olanzapina nie stwierdzono jakichkolwiek zmian istotnych statystycznie. W literaturze jednak pojawiają się dane dotyczące działania olanzapiny na aktywność lokomotoryczną. Podania olanzapiny w dawce 1; 2.75 oraz 7.5 mg/kg szczurom szczepu Sprague Dowlay przez dziewięć dni w fazie ciemnej obniża aktywność lokomotoryczną liczoną liczoną w klatkach domowych za pomocą sygnałów radiowych (van der Zwaal *et al.*, 2010). Olanzapina podawana doustnie w dawce 6 mg/kg w modelu manii u myszy szczepu Swiss albino indukowanej MPD (ang. methylphenidate) redukuje hiperaktywność lokomotoryczną w teście OFT (Tamilselvan *et al.*, 2017). Pomimo to w model OB Olanzapina nie wydaje się zmieniać nadaktywności motorycznej szczurów co może świadczyć o zmniejszonym udziale epizodów manii w a tym modelu na aktywność motoryczną. Oczywiście aktywność motoryczną mierzono za pomocą OFT tylko w cyklu dzień/noc w przedziale od 8:00 do 14:00. Do lepszego zrozumienia działania OLZ na aktywność motoryczną należałoby przeanalizować lokomotoryczność dobową zwierząt. W literaturze leki przeciwdepresyjne normalizują hiperaktywność w modelu OB w teście OFT (Jindal *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Jastrzębska-Więsek *et al.*, 2015), co również zaobserwowano w naszych badaniach. Jedynie wenlafaksyna nie powodowała zmian w teście OFT co jednak zostało również potwierdzone przez inny zespół badawczy (Lapmanee *et al.*, 2017).

W modelu usunięcia opuszek węchowych ekspresja genu MeCP2 w korze czołowej zmniejszyła się po podaniach fluoksetyny. W korze czołowej stwierdzono spadek acetylacji histonu H3K9/14 oraz p-S421-MeCP2 oraz zwiększenie poziomu HDAC2 i MeCP2. MeCP2 tworzy rekrutuje HDAC2 oraz inne corepresory transkrypcji co blokuje aktywność genów. HDAC2 bierze udział w regulacji ścieżki Ras/MAPK oraz NOTCH (bierze udział w przeżywalności komórek rakowych, różnicowaniu i specyfikacji) (H. Li *et al.*, 2019). Badania Dorfman i wsp. wykazały zależność między receptorami NOTCH, a TRK $\beta$  oraz neurotrofinami w komórkach raka jajników (Dorfman *et al.*, 2011) oraz niedokrwieniu mózgu (Tao *et al.*, 2014). Nie ma badań dotyczących poziomu HDAC2 w modelu OB i CMS jednakże stwierdzono podwyższony poziom HDAC2 w hipokampie u szczurów na etapie odstawienia alkoholu (Chen *et al.*, 2019), który normalizował się po podaniach inhibitora deacetylazy histonowej - SAHA. Nasze wyniki sugerują udział MeCP2 i HDAC2 w kontroli genów w korze czołowej. Zmniejszona dostępność czynników transkrypcyjnych do chromatyny i w rezultacie zahamowanie ekspresji genów po operacji może wpływać na aktywację apoptozy i ścieżki zapalnej oraz zmniejszeniu poziomu BDNF. Po podaniach amitryptyliny będącej

lekiem z grupy trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych zanotowano spadek poziomu białka HDAC2 ale braku jakichkolwiek różnic w poziomie białka MeCP2, co może świadczyć o udziale tego leku w zmiany poziomu deacetylacji histonów a nie jest związane MeCP2. Badania na komórkach szpiczaka wykazały wpływ amitryptyliny na zmiany poziomu HDACs ale nie na HDAC2 (Mao *et al.*, 2011). Nie ma badań wpływu amitryptyliny na poziom HDACs w modelach zwierzęcych. Ponadto nasze badania wykazały spadki poziomu MeCP2 po podaniach fluoksetyny (SSRI). W badaniach Cassel i wsp. podania fluoksetyny 10 mg/kg oraz kokainy 20 mg/kg przez 10 dni szczurom szczepu Wistar zwiększały poziom MeCP2 w korze czołowej. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt iż nasze badania przeprowadzono na modelu zwierzęcym co może skutkować otrzymaniem odmiennych wyników. Sugeruje się bowiem iż zmiany środowiskowe wpływają na czynniki epigenetyczne. Podania leków zwierzętom naiwnym może wpływać odmiennie niż na zwierzęta które poddane zostały eksperymentom z udziałem procedur modelowania zachowań depresji. W modelu OB zanotowaliśmy również zwiększenie poziomu fosforylacji S421 MeCP2 po podaniach wszystkich badanych leków przeciwdepresyjnych. Jak wspomniano poziom fosforylacji S421 wiąże się z regulacją genu BDNF. W naszym przypadku regulacja BDNF może odbywać się poprzez udział p-S421-MeCP2 po zastosowaniu leków przeciwdepresyjnych. Olanzapina nie powodowała zmiany poziomu tej fosforylacji co sugeruje słuszność tego stwierdzenia. Ponadto wiadomo iż do działania citalopramu i imipraminy niezbędna jest fosforylacja S421 (Hutchinson *et al.*, 2012b). Nasze badania wykazały podwyższony poziom genu dla BDNF w hipokampie, czego nie odnotowano w korze czołowej po podaniach fluoksetyny i wenlafaksyny. Ekspresja *bdnf* w grupie Sham +leki przeciwdepresyjne charakteryzowała się istotnie statystycznym wzrostem w stosunku do grupy OB NaCl co dało podobne wyniki jak w przypadku modelu chronicznego łagodnego stresu. Nasze wcześniejsze badania (Pochwat *et al.*, 2015b; Jastrzębska-Więsek *et al.*, 2018b) oraz grupy Luo i wsp. (Luo *et al.*, 2010) sugerują zmniejszony poziom białka BDNF w modelu OB. Dlatego też w niniejszej pracy postanowiono oznaczyć tylko wybrane czynniki epigenetyczne mogące regulować poziom BDNF.

W modelu usunięcia opuszek węchowych w korze czołowej nie zanotowaliśmy zmian klasteru miRNA. W hipokampie u szczurów operowanych poziom ekspresji miRNA 212\* wzrósł w stosunku do szczurów pozornie operowanych. Wykazaliśmy również spadek ekspresji klasteru po podaniach leków amitryptylina, wenlafaksyny oraz olanzapiny. Nie ma danych literaturowych dotyczących zmiany klasteru miRNA212/132w modelu OB u szczurów. Jak już wspomniano miRNA132 jest zaangażowany w kontrolę ścieżki zapalnej oraz neurotroficznej w mózgu. Ostatnie badania wskazują iż obniżenie poziomu miRNA 132 jest niezbędne w uzyskaniu odpowiedzi przeciwdepresyjnej na leki, a podwyższenie jego poziomu wywołuje zachowania typu depresyjnego u myszy po podaniach LPS (Li *et al.*, 2016). Inne badania również wykazały zwiększenie poziomu

mir-132 w hipokampie u myszy CUMS, co było odwracane przez podania duloksetyny (Pan and Liu, 2015). Ponadto sugeruje się iż klaster miRNA212/132 może być potencjalnym biomarkerem działania leków przeciwdepresyjnych (Oved *et al.*, 2012) co potwierdzają wyżej prezentowane wyniki. Model Usunięcia opuszek węchowych cechuje się podwyższonym poziomem cytokin zapalnych oraz stresem oksydacyjnym (Bansal *et al.*, 2018). Podwyższenie poziomu mir212 u szczurów operowanych w naszych badaniach może być związane z aktywacją ścieżki prozapalnej. Podania leków korelują z obniżeniem poziomu ekspresji klasteru miRNA212/132 ale nie poziomem białka dla BDNF czy MeCP2. Zmniejszenie poziomu ekspresji klasteru może być związane z przeciwzapalnymi właściwościami stosowanych leków.

W naszych badaniach wenlafaksyna będąca lekiem z grupy SSNRI zwiększa poziom acetylacji H3K9/14 w modelu OB. Co więcej lek ten również wpłynął na wzrosty tej acetylacji w modelu CMS co może być markerem na aktywne działanie tego leku w powyższych modelach. Zwiększenie poziomu p-S421-MeCP2 po podaniach leków przeciwdepresyjnych zarówno w modelu OB jak i CMS może sugerować iż skuteczna terapia LPD (leki przeciwdepresyjne) podwyższa poziom S421 niezależnie od zastosowanego modelu. Należy jeszcze wykonać badania dotyczące S421 z udziałem nieefektywnych dawek powyższych leków aby potwierdzić powyższe stwierdzenie. Ponadto spadek poziomu fosforylacji u szczurów stresowanych oraz z usuniętymi opuszkami węchowymi potwierdza iż S421 MeCP2 może brać udział w kontroli genów związanych ze stresem i operacyjnie wywołaną depresją oraz dać możliwość molekularnej walidacji stosowanych modeli, co należy jeszcze potwierdzić badaniami.

Jak stwierdzono wcześniej model Usunięcia opuszek węchowych jest modelem depresji agitowanej zbliżonym do tej u ludzi z epizodami samobójczymi. Porównując nasze wyniki stwierdzamy iż w modelu OB jak i u osób które popełniły samobójstwo w korze czołowej obserwowaliśmy obniżenie poziomu białka BDNF, acetylacji H3 na lizynie 9/14 oraz podwyższenie poziomu MeCP2. Może to świadczyć o podobnych mechanizmach regulacji BDNF u szczurów z usuniętymi opuszkami węchowymi oraz u osób z myślami samobójczymi. Jednak osoby z myślami samobójczymi nie posiadają obniżony poziom S421 Mecp2 co obserwujemy u szczurów z usuniętymi opuszkami węchowymi, a za to charakteryzują się podwyższeniem poziomu HDAC3. Nie jest jednak możliwa szczegółowa interpretacja tej zależności ze względu na brak dalszych analiz czynników epigenetycznych. Można jednak przypuszczać iż podobny profil epigenetyczny u szczurów OB i samobójców może sugerować zbliżone mechanizmy będące podłożem depresji.

## PODSUMOWANIE:

Podsumowując, wykazano liczne zmiany w regulacji epigenetycznej u zwierząt z zaindukowanymi objawami depresji (CMS, OB) oraz u ludzi, którzy popełnili samobójstwo. Ponadto stosowanie leków przeciwdepresyjnych wpływało na normalizację niektórych zmian wywołanych czynnikami środowiskowymi. Może to sugerować istotne znaczenie czynników epigenetycznych zarówno w patofizjologii jak i terapii zaburzeń depresyjnych.

Rola MeCP2 w zwierzęcych modelach depresji jak i u ludzi z myślami samobójczymi nie jest jednoznacznie potwierdzona. Wpływ regulacji MeCP2 na BDNF może być wyjaśniony na drodze aktywacji kompleksu represorowego, bądź udziału tego białka w innych interakcjach niezwiązanych bezpośrednio z metylacją DNA. MeCP2 jest szeroko rozpowszechniony w mózgu. Jednakże, jak wykazują nasze badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych, jego ekspresja nie jest taka sama we wszystkich strukturach mózgowych. Udział MeCP2 w zachowaniach typu depresyjnego wykazano szczególnie w modelu OB oraz u osób które popełniły samobójstwo. W modelu CMS nie wykazano wpływu MeCP2 na kształtowanie się zachowań typu depresyjnego u zwierząt. Prawdopodobnie większe znaczenie należy przypisać nie zmianom poziomu całkowitego MeCP2 a jego fosforylacji na serynie 421. W większości badanych tkanek wykazano bowiem istotne obniżenie poziomu p-S421-MeCP2, które korelowało z występowaniem behawioru depresyjnego/samobójczego. Nieliczne dane literaturowe sugerowały znaczenie fosforylacji S421 w działaniu niektórych leków przeciwdepresyjnych, jak np. escitalopram. Nasze badania potwierdziły natomiast, znaczenie p-S421-MeCP2 również w aktywności LPD z innych grup terapeutycznych.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż różne czynniki środowiskowe indukują odmienne zmiany w epigenomie, co uwidacznia się przy porównaniu dwóch modeli – CMS i OB. Najbardziej miarodajne analizy porównawcze między wykorzystaną w badaniach tkanką ludzką a zwierzęcą dotyczą modelu OB. Model Przewlekłego łagodnego stresu opiera się na innych zależnościach środowiskowych, co przekłada się na aktywację/dezaktywację odmiennych czynników epigenetycznych.

Tabela.20. Podsumowanie wyników w poziomie białek między zastosowanymi modelami i tkankami ludzkimi; ↑↓ - wzrost, spadek poziomu białka; - brak zmian

| <b>Białka</b>       | <b>Tkanki ludzkie FCX</b> | <b>OB FCX</b> | <b>CMS FCX</b> |
|---------------------|---------------------------|---------------|----------------|
| <b>MeCP2</b>        | ↑                         | ↑             | -              |
| <b>p-S421-MeCP2</b> | -                         | ↓             | ↓              |
| <b>HDAC2</b>        | ↑                         | ↑             | -              |
| <b>acH3K9/14</b>    | ↓                         | ↓             | ↓              |
| <b>BDNF</b>         | ↓                         | ↓             | ↓              |

Wyniki wskazują na podobne mechanizmy epigenetyczne zachodzące w korze czołowej osób, które popełniły samobójstwo jak i szczurów z usuniętymi opuszkami węchowymi. Podobne zmiany między modelem OB a tkankami ludzkimi również w poziomie BDNF pozwalają na świadomy wybór modelu OB do badań nad depresją której towarzyszą myśli samobójcze. Model CMS oparty na czynnikach stresowych różni się poziomem zmian epigenetycznych co świadczy iż stres w tym modelu nie jest wystarczająco dotkliwy do wywołania znacznych zmian epigenetycznych jak model OB czy tkanki ludzkie.

## WNIOSKI:

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono że:

- MeCP2 wykazuje różną ekspresję w strukturach mózgowych w modelach zwierzęcych
- Fosforylacja MeCP2 na serynie 421 bierze udział w aktywności leków przeciwdepresyjnych o różnym profilu działania
- MeCP2 wpływa na regulację ekspresji BDNF u samobójców oraz w modelu OB.
- Poziom białka czynników epigenetycznych takich jak acetylacji histonu H3 na lizynie 9/14, dimetylacji H3K27, Sin3a, HDAC2/3 ulegają zmianom u osób które popełniły samobójstwo oraz w zwierzęcych modelach depresji
- W modelu usunięcia opuszek węchowych oraz u samobójców w korze czołowej wykazano podobny profil zmian epigenetycznych co świadczy o kompatybilności tego modelu z zachowaniami samobójczymi
- Model CMS oparty na łagodnym stresie nie warunkował dalekoidących zmian epigenetycznych co sugeruje iż stosowany w naszych badaniach łagodny stres nie wpływa na epigenom.

## WYKAZ SKRUTÓW:

5-HT<sub>1A</sub>- receptor serotoninowy 1A (ang. *serotonin 1A receptor*)

AMPA – receptor dla kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazoloopropionowy (ang.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*)

aNPC - progenitorowe komórki nerwowe (ang. *neural progenitor cells*)

ASDs - choroby autystyczne (ang. *Autism spectrum disorder*)

ATP - adenozylo-5'-trifosforan (ang. *Adenosine-5'-triphosphate*)

A $\beta$ PP - prekursorowy amyloid- $\beta$  (ang. *amyloid- $\beta$  protein precursor*)

BCA – procedura oznaczenia kwasu bichinonowego (ang. *bicinchoninic acid assay*)

BCBS - Blue Cross Blue Shield

BD I – Depresja jednobiegunową (ang. *Unipolar depression*)

BD II – Depresja dwubiegunowa (ang. *Bipolar depression*)

BDNF – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. *Brain-derived neurotrophic factor*)

CaMK2 – zależna od jonów wapnia i kalmoduliny kinaza 2 (ang. *calmodulin-dependent protein kinase II is a*)

CMS – przewlekły łagodny stres (ang. *Chronic mild stress*)

CREB – białko wiążące element odpowiedzi cAMP (ang. *cAMP response element binding protein*)

CRH – kortykoliberyna (ang. *corticotropin-releasing hormone*)

CTD  $\alpha$  i  $\beta$  - domena C- terminalna (ang. *C-terminal binding domain*)

CX 30 i 40 – koneksyny 30 i 40 (ang. *Connexin 30 i 40*)

DALY- wskaźnik DALY (ang. *Disability-Adjusted Life Year*)

DNMT1 – DNA metylotransferaza typu 1 (ang. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase*)



DSM-4 – klasyfikacja zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego

(ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4<sup>th</sup> Edition*)

DSM-5 – klasyfikacja zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego

(ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5<sup>th</sup> Edition*)

ELS – wczesny stres (ang. *Early life stress*)

EPSP - pobudzający potencjał postsynaptyczny (ang. *excitatory postsynaptic potential*)

fALEF – amplituda fluktuacji niskiej częstotliwości (ang. *Amplitude of low-frequency fluctuation*)

FGF - Czynniki wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*)

GABA – kwas gamma-aminomasłowy (ang. *gamma-aminobutyric acid*)

GNDF - Glejowy czynnik neurotroficzny pochodzenia komórkowego (ang. *Glial cell line-derived neurotrophic factor*)

GLY<sub>B</sub> – wiązania glicynowe (ang. *Glycine binding*)

GR – glikokortykosteroidy (ang. *glucocorticoids*)

H3 , H4 – histony H3 i H4 (ang. *histone 3 and 4*)

HAMD - skala Hamiltona (ang. *Hamilton scale*)

HAT – enzymy acetylotransferazy histonów (ang. *histone acetyltransferases*)

HDAC – enzymy deacetylazy histonów (ang. *histone deacetylases*)

HDAC5 – deacetylaza histonowa 5 (ang. *Histone deacetylases 5*)

HPA - oś podwzgórze-przysadka- nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal*)

ID - domena interwiniująca (ang. *intervening domain*)

IGF - Insulinopodobny czynnik wzrostu ( ang. *insulin-like growth factor*)

iGluR – receptory jonotropowe dla glutaminianu (ang. *Ionotropic glutamate receptors*)

IL-1a – interleukina 1a (ang. *Interleukin 1 alpha*)

IL-1b – interleukina 1b (ang. *Interleukin 1 beta*)

IL-6 - interleukina 6 (ang. *Interleukin 6*)

IPSP -hamujący potencjał postsynaptyczny (ang. *inhibitory postsynaptic potential*)

IZWOZ - Instytutu Zarządzania w Ochronie Zdrowia

L-VSCC – kanał typu L Ca<sub>2</sub>p (ang. *L-type Ca<sub>2</sub>p channel*)

LIF - Białaczkowy czynnik hamujący (ang. *Leukemia factor inhibitory*)

LPD – leki przeciwdepresyjne (ang. *antidepressants drugs*)

LTD - długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *long term depression*)

LTP – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *Long Term Potentiation*)

m4C – N4-metylocytozyna (ang. *N4-methylcytosine*)

m5C – C5-metylocytozyna (ang. *C5-methylcytosine*)

m6C – N6-metylocytozyna (ang. ang. *N6-methylcytosine*)

MAOI – Inhibitory monoaminooksydazy (ang. *monoamine oxidase inhibitors*)

MAPK - Kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*)

MBD - domena wiążąca się do metylacji (ang. *Methyl binding domain*)

MDD - Ciężkie Zaburzenia Depresyjne (ang. *Major depressive disorders*)

MeCP2 – białko wiążące metylo-CpG (ang. *methyl-CpG-binding protein*)

MeCPdup – duplikacja MeCP2 (ang. *Duplication of MeCP2*)

mGluR – metabotropowy receptor dla glutaminianu (ang. *Metabotropic glutamate receptor*)

MK-801 – Dizocylpina (ang. *dizocilpine*)

MPD – 2-Methyl-2,4-pentanediol (ang. *2-Methyl-2,4-pentanediol*)

MRI – rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*)

NaCl – chlorek sodu (ang. *sodium chloride*)

NAD<sup>+</sup> - forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NDRI - Inhibitory Wychwytu Zwrotnego Noradrenaliny i Dopaminy (ang. *norepinephrine-dopamine reuptake inhibitor*)

NGF – Czynn timerostu nerwów (ang. *Nerve growth factor*)

NMDA - Kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. *N-methyl-D-aspartate acid*)

NMDAR – receptor N-metylo-D-asparaginowy (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*)

NT – nurotrofina (ang. *neurotrophin*)

NTD – domena N-terminalna (ang. *N-terminal domain*)

OB – model usunięcia opuszek węchowych (ang. *olfactory bulbectomy model*)

OFT – test wolnego pola (ang. *Open field test*)

PAMs – pozytywne modulatory allosteryczne (ang. *Positive allosteric modulators*)

PTSD – zespół stresu pourazowego (ang. *posttraumatic stress disorder*)

Real-time PCR – reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real-time polymerase chain reaction*)

REST – Czynn timeryciszający transkrypcje RE1 (ang. *RE1 Silencing Transcription Factor*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive oxygen species*)

RPM – jednostka miary częstotliwości obrotu, obroty na minute (ang. *revolutions per minute*)

RTT – Zespół Retta (ang. *Rett syndrome*)

SAHA – Suberoilolanilid kwasu hydroksamowego (ang. *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*)

SB – maślan sodu (ang. *sodium butyrate*)

SDS – sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS -PAGE – elektroforeza poliakrylamidowa z SDS (ang. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*)

Sham – w tym przypadku szczury pozornie operowane

sIL-1RA – rozpuszczalny receptor interleukiny 1a (ang. *Soluble IL-1a receptor*)

sIL-6R - rozpuszczalny receptor interleukiny 6 (ang. *Soluble IL-6 receptor*)

SMOX – Oksydaza sperminy (ang. *Spermine Oxidase*)

SNRI - inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (ang. *serotonin norepinephrine reuptake inhibitor*)

SPT – test spożycia 1% roztworu sacharozy (ang. *Sucrose preference test*)

SSRI - Inhibitory Wychwyty Zwrotnego Serotoniny (ang. *Selective serotonin reuptake inhibitors*)

sTNF-R1 - rozpuszczalny receptor dla TNF (ang. *Soluble TNF-1 receptor*)

TBARS – kwas tiobarbiturowy (ang. *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TBST – bufor Tris z Tween 20 (ang. *Tris-Buffered Saline and Tween 20*)

TLPD - Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (ang. *Tricyclic antidepressants*)

TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* )

TRD - domena represjonująca transkrypcję (ang. *Transcriptional repression domain*)

VPA – kwas walproinowy (ang. *valproic acid*)

WHO - Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

$\alpha$ 1-AR - receptory  $\alpha$ -adrenergiczne (ang.  *$\alpha$ -adrenergic receptors*)

## STRESZCZENIE:

Depresja jest jedną z najpowszechniejszych chorób psychicznych dotykających ludzi w różnym przedziale wiekowym i o statusie ekonomicznym. Częściej niż dotychczas depresja dotyka ludzi coraz młodszych, a leczenie farmakologiczne w tej grupie wiekowej nie jest łatwe. Pomimo licznych badań nad mechanizmem powstawania depresji nie udało się do końca wyjaśnić jej powstawania. Wiadomo jest że depresja towarzyszy licznym chorobom układu nerwowego przez co czasami utrudnione jest jej leczenie i diagnostyka. Ostatnie lata skupiają się nad wyznaczeniem potencjalnych genetycznych markerów tej choroby, jednakże wydaje się iż nie jest ona tak silnie skorelowana z genetyką jak inne choroby psychiczne. Poszukiwanie nowych mechanizmów łączących wszystkie dotychczasowe teorie depresji zaprowadziło do wskazania potencjalnej roli czynników epigenetycznych jako łączników między genami a oddziaływaniem środowiska. Nasze badania skupiły się na potencjalnej roli MeCP2 w regulacji genu BDNF oraz wpływu innych czynników epigenetycznych jak acH3K9/14, H3K27me2, Sin3a, HDAC2 i HDAC3 na mechanizm powstawania depresji oraz ich wpływ na farmakoterapie tej choroby. W pracy wykorzystano tkanki ludzkie *post mortem* oraz zwierzęce modele depresji: przewlekły łagodny stres (CMS) i usunięcie opuszek węchowych (OB).

W tkankach ludzkich wykonano oznaczenia białek metodą Western blot. Zarówno w korze czołowej jak i hipokampie poziom białka MeCP2 uległ podwyższeniu u osób które popełniły samobójstwo. Wzrosty MeCP2 skorelowane są z jednoczesnym spadkiem białka BDNF w badanych strukturach. Jedynie w hipokampie stwierdzono wzrost fosforylacji S421 dla MeCP2. W obydwóch strukturach stwierdzono wzrosty HDAC3 czynnika tworzącego kompleks represorowy z białkiem MeCP2. Ponadto w hipokampie jak i korze czołowej w grupie badanej odnotowano spadki acH3K9/14. Podwyższenie białka Sin3a w hipokampie i HDAC2 w korze czołowej może sugerować odmienny wpływ epigenomu w strukturach mózgu samobójców.

Model przewlekłego łagodnego stresu charakteryzował się brakiem zmian w poziomie białka i genu MeCP2 przy jednoczesnym spadku poziomu ekspresji genu *bdnf* i poziomu białka dla fosforylacji S421 w korze czołowej. Wśród oznaczonych czynników epigenetycznych w korze czołowej poziom acetylacji histonu H3 na lizynie 9/14 ulegał zmniejszeniu natomiast w hipokamp charakteryzował się zwiększonym poziomem dimetylacji H3K27. Podania escitalopramu powodowały spadek ekspresji genu *mecp2* w korze czołowej w grupie kontrolnej. Wzrost poziomu białka p-S421-MeCP2 w hipokampie jak i korze czołowej wywołany został przez podania imipraminy i escitalopramu. Również podania wenlafaksyny skutkowały wzrostem poziomu białka p-S421-MeCP2 w korze czołowej w grupie stresowanej +lek. Podania imipraminy i wenlafaksyny w badanych strukturach zwiększały ekspresję genu *bdnf*. Podwyższony poziom genu *bdnf* w korze czołowej zanotowaliśmy po podaniach escitalopramu. Podania wenlafaksyny zwiększały poziom

białka acH3K9/14 w korze czołowej oraz zmniejszały poziom białka HDAC2 w hipokampie. Stres wpływał na zwiększenie poziomu miRNA 132\* i 212\* w hipokampie. W korze czołowej podwyższeniu ulegała również ekspresja miRNA 212\*. Podania leków escitalopramu, wenlafaksyny i olanzapiny regulowało poziom mir132\* i 212\* w hipokampie. Olanzapina wpływała na spadki miRNA 212\* w korze czołowej.

W modelu usunięcia opuszek węchowych tylko w korze czołowej stwierdzono wzrosty białka MeCP2 oraz spadki jego fosforylacji. W korze czołowej również stwierdzono spadek poziomu białka acH3K9/14 i wzrost białka HDAC2. Podania amitryptyliny prowadziły do spadku poziomu białka MeCP2 w hipokampie, a podania fluoksetyny obniżały poziom tego białka w korze czołowej. Zmiany fosforylacji S421 stwierdzono w korze czołowej po podaniach amitryptyliny, fluoksetyny i wenlafaksyny. Podania wenlafaksyny i fluoksetyny wpływały na podwyższenie poziomu genu *bdnf* w hipokampie szczurów operowanych. Podania wenlafaksyny zmniejszały poziom białka acH3K9/14 w korze czołowej szczurów OB. Amitryptylina natomiast zmniejszała poziom białka HDAC2 w korze czołowej. Usunięcie opuszek węchowych skutkowało wzrostem ekspresji miR212\* w hipokampie. Podania amitryptyliny, Wenlafaksyny i Olanzapiny zmniejszały ekspresję zarówno miRNA 212\* jak i 132\* w hipokampie szczurów modelowanych.

Podsumowując u osób które popełniły samobójstwo jak i u szczurów z usuniętymi opuszkami węchowymi stwierdzono wzrost poziomu MeCP2 oraz HDAC2 przy spadku acetylacji histonu 3 na lisylinie 9/14 i białka BDNF. Model CMS rzutował spadkami acetylacji histonu 3 na lisylinie 9/14 i białka BDNF przy braku zmian w poziomie białka MeCP2. Zależność ta sugeruje podobny mechanizm działania wytworzenia zachowań depresyjnych w modelu OB i samobójców. Ponadto wykazano iż czynniki epigenetyczne, a w szczególności acetylacji histonu H3 odgrywają istotną rolę w mechanizmach powstawania depresji. MeCP2 bierze udział w regulacji BDNF, a badania jego fosforylacji mogą być kolejnym krokiem do wyznaczenia biomarkerów skuteczności terapii przeciwdepresyjnej.

## SUMMARY:

Depression is one of the most common mental diseases affecting people of different ages and economic status. Moreover, depression affects younger and younger people, and pharmacological treatment in this group is not easy. Despite of numerous studies on the mechanism of depression, it is not fully understand and explained yet. It is known that depression accompanies many diseases of the nervous system, which sometimes makes its treatment and diagnostics difficult. Recent years have focused on the determination of potential genetic markers of this disease, however, it seems that it is not as strongly correlated with genetics as other mental diseases. The search for new mechanisms combining all current theories of depression led to the indication of the potential role of epigenetic factors as linkers between genes and the impact of the environment. Our research focused on the potential role of MeCP2 in the regulation of the BDNF gene and the influence of other epigenetic factors like acH3K9/14, H3K27me2, Sin3a, HDAC2 and HDAC3 on the mechanism of depression and their effect on the pharmacotherapy of this disease. Human post-mortem and animal models of depression like: chronic mild stress (CMS) and removal of olfactory bulbs (OB) were used in the work.

In human tissues, Western blot protein determinations were performed. Both in the frontal cortex and the hippocampus, the level of MeCP2 protein was increased in people who committed suicide. MeCP2 increases are correlated with the simultaneous decrease of BDNF protein in the examined structures. Only in the hippocampus was the increase in phosphorylation of S421 for MeCP2. In both structures, the HDAC3 the factor forming the repressor complex with the MeCP2 protein was increase. Moreover, in the hippocampus and frontal cortex, the acH3K9/14 was decreased in the study group. The increase of the Sin3a protein in the hippocampus and HDAC2 in the frontal cortex may suggest a different effect of the epigenome in this structures of the suicide brain.

The model of chronic mild stress was characterized by the lack of changes in the protein and MeCP2 gene levels with a simultaneous decrease in the expression level of the *bdnf* gene and the protein level for phosphorylation of S421 in the frontal cortex. Among the exanimated epigenetic factors in the frontal cortex, the level of histone H3 acetylation on lysine 9/14 was decreased while the hippocampus was characterized by an increased level of H3K27 dimethylation. Administration of escitalopram caused a downregulation *mecp2* gene expression in the frontal cortex in the control group.

The increase protein level of p-S421-MeCP2 in the hippocampus and frontal cortex was caused by administration of imipramine and escitalopram. Also, venlafaxine administration resulted in an increase in p-S421-MeCP2 protein in the frontal cortex in the stress group + drug. Administration of imipramine and venlafaxine in the examined structures upregulate the expression of the *bdnf* gene. The elevated level of the *bdnf* gene in the frontal cortex was noted after the

administration of escitalopram. Venlafaxine administration increased the level of acH3K9/14 protein in the frontal cortex and decreased HDAC2 protein in the hippocampus. Stress influenced the increase of 132 \* and 212 \* miRNA levels in the hippocampus. In the frontal cortex, miRNA 212 \* expression was also increased. Administration of drugs escitalopram, venlafaxine and olanzapine regulated the level of mir132 \* and 212 \* in the hippocampus. Olanzapine affected the 212 \* miRNA declines in the frontal cortex.

In the model of removal of olfactory bulbs only in the frontal cortex, increases in MeCP2 protein and decreases in its phosphorylation were found. In the frontal cortex, the protein level of acH3K9/14 and HDAC2 was increased. Administration of amitriptyline led to a decrease protein level of MeCP2 in the hippocampus, and administration of fluoxetine reduced the level of this protein in the frontal cortex. Changes in phosphorylation of S421 were found in the frontal cortex after administration of amitriptyline, fluoxetine and venlafaxine. Administration of venlafaxine and fluoxetine upregulate the level of the *bdnf* gene in the hippocampus of operated rats. Venlafaxine dosing reduced the level of acH3K9/14 in the frontal cortex of OB rats. Amitriptyline, on the other hand, reduced the HDAC2 protein level in the frontal cortex. Removal of the olfactory bulbs resulted in an increase in miR212\* expression in the hippocampus. Administration of amitriptyline, venlafaxine and olanzapine reduced the expression of both 212\* and 132\* miRNAs in the hippocampus of modeled rats.

In summary, in suicide as well as in rats with removed of olfactory bulbs there was increase protein level of MeCP2 and HDAC2 with decrease protein of histone 3 acetylation on 9/14 and BDNF. The CMS model was influenced by the decreases in acetylation of histone 3 on 9/14 and BDNF protein in the absence of changes in the level of MeCP2 protein. This dependence suggests a similar mechanism of action for depressive behaviors in the OB model and suicides. In addition, it has been demonstrated that epigenetic factors, in particular histone H3 acetylation, play an important role in the mechanisms of depression. MeCP2 is involved in the regulation of BDNF, and studies on its phosphorylation may be the next step to determine the biomarkers of the effectiveness of antidepressant therapy.



## SPIS RYCIN:

Ryc.1. Strukturalne domeny MeCP2: NTD, MBD, ID, TRD, CTD, E1;E2 – wariant splicingu-izoforma 1 i 2. MeCP2\_E1 transkrybowany bardziej efektywnie w mózgu niż E2 (Sheikh *et al.*, 2013)

Ryc.2. Aktywacja BDNF poprzez fosforylację MeCP2/CaMKII lub/i CDKL5 oraz pętla zwrotna regulacji MeCP2 poprzez wzrost miR-132 (Díaz de León-Guerrero *et al.* 2011)

Ryc.3. Schemat doświadczenia z wykorzystaniem procedury przewlekłego łagodnego stresu.

Ryc.4. Schemat doświadczenia z wykorzystaniem modelu usunięcia opuszek węchowych.

Ryc.5. Poziom białka MeCP2 (A); p-S421-MeCP2 (B) i BDNF (C) w korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw i odpowiedniej kontroli. *Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią ± SEM ze stosunku intensywności sygnału badanego białka/β-aktyny. Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu t-Studenta. \*p<0.05; \*\*\*p<0.001 vs. Kontrola.*

Ryc.6. Poziom białka H3K27me2 (A); HDAC3 (B); acH3K9/14 (C); HDAC2 (D); Sin3a (E) w korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw i odpowiedniej kontroli. *Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią ± SEM ze stosunku intensywności sygnału badanego białka/β-aktyny. Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu t-Studenta. \*p<0.05; \*\*p<0.01 vs. Kontrola.*

Ryc.7. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na: spożycie 1% roztworu sacharozy mierzone w odstępach tygodniowych od momentu rozpoczęcia eksperymentu (A), całkowite spożycie 1% roztworu sacharozy w okresie ostatnich 5 tygodni eksperymentu (B) oraz masę ciała zwierząt (C). *Wartości przedstawiają średnią ±SEM. Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \* p< 0,05 , \*\* p< 0,001, \*\*\* p< 0,0001 vs kontrola, ^ p< 0,05 , ^^ p< 0,001 vs stres*

Ryc.8. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom mRNA dla MeCP2 (A) oraz BDNF (B) w hipokampie. *Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości*

przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)  $^{\wedge} p < 0,05$ ,  $^{\wedge\wedge} p < 0,001$  vs stres

Ryc.9. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom mRNA dla MeCP2 (A) oraz BDNF (B) w korze czołowej. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*  $p < 0,05$  vs. kontrola NaCl;  $^{\wedge} p < 0,05$ ;  $^{\wedge\wedge} p < 0,01$  vs. stres NaCl

Ryc.10. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom miRNA 132\* (A); miRNA 212\* (B); w hipokampie szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*  $p < 0,05$  vs. kontrola NaCl;  $^{\wedge} p < 0,05$ ;  $^{\wedge\wedge} p < 0,01$ ;  $^{\wedge\wedge\wedge} p < 0,001$  vs. stres NaCl

Ryc.11. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom miRNA 132\* (A); miRNA 212\* (B); w korze czołowej szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*  $p < 0,05$  vs. kontrola NaCl;  $^{\wedge} p < 0,05$  vs. stres NaCl.

Ryc.12. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek MeCP2 (A); p-S421-MeCP2 (B); BDNF (C) w hipokampie szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. W artości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM ( $n=7-8$ ). ). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)  $^{\wedge} p < 0,05$ ;  $^{\wedge\wedge} p < 0,001$  vs. stres NaCl.

Ryc.13. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN

10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek MeCP2 (A); p-S421-MeCP2 (B); BDNF (C) w korze czołowej szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=7-8).* Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \* p<0,05 vs kontrola NaCl; ^p<0,05; ^^ p<0,001 vs. stres NaCl.

Ryc.14. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek acH3K9/14 (A); Sin3a (B); H3K27me2 (C); HDAC2 (D) w hipokampie szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=7-8).* Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \* p<0,05 vs kontrola NaCl; ^p<0,05 vs. stres NaCl.

Ryc.15. Wpływ procedury przewlekłego łagodnego stresu i/lub podań: imipraminy w dawce 10 mg/kg (IMI 10), escitalopramu w dawce 10 mg/kg (ESC 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek acH3K9/14 (A); Sin3a (B); H3K27me2 (C); HDAC2 (D) w korze czołowej szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=7-8).* Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \* p<0,05 vs kontrola NaCl; ^p<0,05; ^p<0,001 vs. stres NaCl.

Ryc.16. Test Wolnego Pola: Sham- szczury pozornie operowane; OB -szczury po usunięciu opuszek węchowych; AMI -Amitryptylina 10 mg/kg; FLU - Fluoksetyna 10 mg/kg; VLX– Wenlafaksyna 10 mg/kg; OLZ – Olanzapina 2 mg/kg; *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=48).* Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*\* p<0,001 vs Sham NaCl; ^p<0,05; vs OB NaCl

Ryc.17. Ekspresja genu *mecp2* a) i *bdnf* b) w hipokampie; Sham- szczury pozornie operowane; OB -szczury po usunięciu opuszek węchowych; AMI -Amitryptylina 10 mg/kg; FLU - Fluoksetyna 10 mg/kg; VLX – Wenlafaksyna 10 mg/kg; OLZ – Olanzapina 2 mg/kg; *Wartości przedstawiają średnią ± SEM (n=7-8).* Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) ^p<0,05; ^^p<0,001; vs OB NaCl

Ryc.18. Ekspresja genu *mecp2* a) i *bdnf* b) w korze czołowej; Sham- szczury pozornie operowane; OB -szczury po usunięciu opuszek węchowych; AMI -Amitryptylina 10 mg/kg; FLU - Fluoksetyna 10 mg/kg; VLX – Wenlafaksyna 10 mg/kg; OLZ– Olanzapina 2 mg/kg; ). Zmienność statystyczną

wyznaczono przy użyciu *Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)* \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  vs Sham NaCl; ^  $p < 0,05$  vs OB NaCl

Ryc.19. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom mir-212\* (A); mir-132\* (B) w hipokampie szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM (n=7-8). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)* \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Sham NaCl; ^  $p < 0,05$ ; ^^  $p < 0,001$ ; ^^^  $p < 0,00001$  vs OB NaCl

Ryc.20. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom mir-212\* (A); mir-132\* (B) w korze czołowej szczurów. Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM (n=7-8). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)* \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Sham NaCl; ^  $p < 0,05$ ; ^^  $p < 0,001$ ; ^^^  $p < 0,00001$  vs OB NaCl

Ryc.21. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek MeCP2 (A) p-S421-MeCP2 (B) oraz BDNF (C) w hipokampie szczurów OB; Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM (n=7-8). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)* \*\*  $p < 0,001$  vs Sham NaCl

Ryc.22. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek MeCP2 (A) p-S421-MeCP2 (B) w korze czołowej szczurów OB; Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM (n=7-8). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)* \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Sham NaCl; ^  $p < 0,05$ ; ^^  $p < 0,001$ ; ^^^  $p < 0,00001$  vs OB NaCl

Ryc.23. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek acH3K9/14 (A) H3K27me2 (B) Sin3a (C)

HDAC2 (D) w hipokampie szczurów OB; Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM (n=7-8). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls)*

Ryc.24. Wpływ usunięcia opuszek węchowych i/lub podań: amitryptyliny w dawce 10 mg/kg (AMI 10), fluoksetyny w dawce 10 mg/kg (FLU 10), wenlafaksyny w dawce 10 mg/kg (VEN 10) oraz olanzapiny w dawce 2 mg/kg (OLZ) na poziom białek acH3K9/14 (A) H3K27me2 (B) Sin3a (C) HDAC2 (D) oraz HDAC3 (E) w korze czołowej szczurów OB; Poszczególne oznaczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. *Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SEM (n=7-8). Zmienność statystyczną wyznaczono przy użyciu Two-way ANOVA (test porównawczy Newman-Keuls) \*\* p<0,001 vs Sham NaCl; ^ p<0,05 vs OB NaCl*

## SPIS TABEL:

Tabela.1. Niektóre leki przeciwdepresyjne wykorzystywane w terapii

Tabela 2. Ogólna charakterystyka demograficzna tkanek post portem wykorzystanych w badaniach biochemicznych (K-kobieta; M-meżczyzna) (Sowa-Kućma *et al.*, 2013)

Tabela 3. Charakterystyka grup eksperymentalnych w modelu przewlekłego łagodnego stresu

Tabela 4. Charakterystyka grup eksperymentalnych w modelu usunięcia opuszek węchowych

Tabela.5. Przeciwciała I rzędowe wykorzystane do analizy Western blot.

Tabela.6. Zastosowanie sond TaqMan wykorzystywanych do analizy ekspresji genów oraz miRNA.

Tabela.7. Przykładowe/reprezentatywne bloty dla MeCP2, p-S421-MeCP2, BDNF oraz  $\beta$ -aktyny w korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw i odpowiednich kontroli.

Tabela.8. Przykładowe/reprezentatywne bloty dla H3K27me2, acH3K9/14, Sin3a, HDAC2 i HDAC3 oraz  $\beta$ -aktyny w korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw i odpowiednich kontroli.

Tabela.9. Przykładowe/reprezentacyjne Western bloty BDNF, MeCP2 oraz p-S421-MeCP2 w korze czołowej szczurów po procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW- kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

Tabela.10. Reprezentacyjne Western bloty BDNF, MeCP2 oraz p-S421-MeCP2 w hipokampie szczurów po procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW- kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

Tabela.11. Reprezentacyjne Western bloty białek B acH3K9/14, H3k27me2, Sin3a oraz HDAC2 w Hipokampie szczurów poddanych procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW-kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

Tabela.12. Reprezentacyjne Western bloty białek acH3K9/14, H3k27me2, Sin3a oraz HDAC2 w korze czołowej szczurów poddanych procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola

Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW-kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

Tabela.13. Przykładowe/reprezentacyjne bloty wybranych czynników epigenetycznych w korze czołowej szczurów po procedurze CMS; K-kontrola NaCl; S- stres NaCl, KI- kontrola Imipramina; SI- stres Imipramina; KE- kontrola Escitalopram; SE- stres Escitalopram; KW- kontrola Wenlafaksyna; SW- stres Wenlafaksyna; KO- kontrola Olanzapina; SO- stres Olanzapina

Tabela.14. Przykładowe/reprezentacyjne bloty wybranych czynników epigenetycznych w korze czołowej szczurów po procedurze OB; Sh-Sham NaCl; Ob- OB NaCl, ShF- Sham Fluoksetyna; ObF- OB Fluoksetyna; ShA- Sham Amitryptylina; ObA- OB Amitryptylina; ShW- Sham Wenlafaksyna; ObW- OB Wenlafaksyna; ShO- Sham Olanzapina; ObO- OB Olanzapina

Tabela 15. Zmiany poziomu genów w modelach CMS, OB. i tkankach ludzkich; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

Tabela 16. Zmiany poziomu białek w modelach CMS, OB. i tkankach ludzkich; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

Tabela 17. Zmiany ekspresji genów w modelach CMS, OB. po podaniach leków; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

Tabela 18. Zmiany poziomu białek w modelach CMS, OB. po podaniach leków; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

Tabela 19. Zmiany ekspresji miRNA w modelach CMS, OB. po podaniach leków; ↓ ↑ - spadek wzrost, N- nie oznaczono, - brak istotności

Tabela.20. Podsumowanie wyników w poziomie białek między zastosowanymi modelami i tkankami ludzkimi; ↑↓ - wzrost, spadek poziomu białka

## BIBLIOGRAFIA:

- Abelaira, H. M. *et al.* (2017) 'Effects of ketamine administration on mTOR and reticulum stress signaling pathways in the brain after the infusion of rapamycin into prefrontal cortex', *Journal of Psychiatric Research*, 87, pp. 81–87. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.12.002.
- Anderson, E. M. *et al.* (2018) 'It is a complex issue: emerging connections between epigenetic regulators in drug addiction', *European Journal of Neuroscience*. doi: 10.1111/ejn.14170.
- Antidepressants: Options, Advantages, and Precautions* (no date). Available at: <https://www.drugs.com/article/antidepressants.html> (Accessed: 24 January 2019).
- Ausió, J. (2016) 'MeCP2 and the enigmatic organization of brain chromatin. Implications for depression and cocaine addiction', *Clinical Epigenetics*, 8(1), p. 58. doi: 10.1186/s13148-016-0214-5.
- Autry, A. E. and Monteggia, L. M. (2012) 'Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders.', *Pharmacological reviews*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 64(2), pp. 238–58. doi: 10.1124/pr.111.005108.
- Balyan, R. *et al.* (2018) 'Repeated restraint stress upregulates rat sulfotransferase 1A1', *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 0(0). doi: 10.1515/jbcpp-2016-0038.
- Bansal, Y. *et al.* (2018) 'Naringenin protects against oxido-inflammatory aberrations and altered tryptophan metabolism in olfactory bulbectomized-mice model of depression', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 355, pp. 257–268. doi: 10.1016/j.taap.2018.07.010.
- Barbacid, M. (1995) 'Neurotrophic factors and their receptors.', *Current opinion in cell biology*, 7(2), pp. 148–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7612265> (Accessed: 1 March 2019).
- Benazzi, F. (2006) 'Various forms of depression.', *Dialogues in clinical neuroscience*. Les Laboratoires Servier, 8(2), pp. 151–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889102> (Accessed: 24 January 2019).
- Bennabi, D. *et al.* (2015) 'Risk factors for treatment resistance in unipolar depression: A systematic review', *Journal of Affective Disorders*, 171, pp. 137–141. doi: 10.1016/j.jad.2014.09.020.
- Bhagwagar, Z., Hafizi, S. and Cowen, P. J. (2005) 'Increased salivary cortisol after waking in depression', *Psychopharmacology*, 182(1), pp. 54–57. doi: 10.1007/s00213-005-0062-z.
- Bilgic, S. *et al.* (2018) 'The protective effect of thymoquinone over olanzapine-induced side effects in liver, and metabolic side effects', *Bratislava Medical Journal*, 118(10), pp. 618–625. doi: 10.4149/BLL\_2017\_119.
- Caldarone, B. J., Zachariou, V. and King, S. L. (2015) 'Rodent models of treatment-resistant depression', *European Journal of Pharmacology*, 753, pp. 51–65. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.063.



- Campbell, R. R. and Wood, M. A. (2019) 'How the epigenome integrates information and reshapes the synapse', *Nature Reviews Neuroscience*. doi: 10.1038/s41583-019-0121-9.
- Chaby, L. E. *et al.* (2019) 'Cognitive Flexibility Training Improves Extinction Retention Memory and Enhances Cortical Dopamine With and Without Traumatic Stress Exposure', *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, p. 24. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00024.
- Chahrour, M. *et al.* (2008) 'MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription.', *Science (New York, N.Y.)*. Howard Hughes Medical Institute, 320(5880), pp. 1224–9. doi: 10.1126/science.1153252.
- Chen, W.-Y. *et al.* (2019) 'The Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Alleviates Depression-Like Behavior and Normalizes Epigenetic Changes in the Hippocampus During Ethanol Withdrawal', *Alcohol*. doi: 10.1016/j.alcohol.2019.02.005.
- Choi, J. *et al.* (2019) 'Hyperoxygenation revitalizes Alzheimer's disease pathology through the upregulation of neurotrophic factors', *Aging Cell*, 18(2), p. e12888. doi: 10.1111/accel.12888.
- Choi, M. *et al.* (2015a) 'Ketamine produces antidepressant-like effects through phosphorylation-dependent nuclear export of histone deacetylase 5 (HDAC5) in rats', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), p. 201513913. doi: 10.1073/pnas.1513913112.
- Choi, M. *et al.* (2015b) 'Ketamine produces antidepressant-like effects through phosphorylation-dependent nuclear export of histone deacetylase 5 (HDAC5) in rats', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), p. 201513913. doi: 10.1073/pnas.1513913112.
- Claveria-Gimeno, R. *et al.* (2017) 'The intervening domain from MeCP2 enhances the DNA affinity of the methyl binding domain and provides an independent DNA interaction site.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 7, p. 41635. doi: 10.1038/srep41635.
- Cotto, B. *et al.* (2018) 'Cocaine-mediated activation of microglia and microglial MeCP2 and BDNF production', *Neurobiology of Disease*, 117, pp. 28–41. doi: 10.1016/j.nbd.2018.05.017.
- Covington, Herbert E *et al.* (2009) 'Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(37), pp. 11451–60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1758-09.2009.
- Covington, H. E. *et al.* (2009) 'Antidepressant Actions of Histone Deacetylase Inhibitors', *Journal of Neuroscience*, 29(37), pp. 11451–11460. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1758-09.2009.
- Covington, H. E. *et al.* (2011) 'Hippocampal-dependent antidepressant-like activity of histone deacetylase inhibition.', *Neuroscience letters*, 493(3), pp. 122–6. doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.022.
- Damen, D. and Heumann, R. (2013) 'MeCP2 phosphorylation in the brain: from transcription to behavior', *Biological Chemistry*, 394(12), pp. 1595–605. doi: 10.1515/hsz-2013-0193.
- Deng, J. V. *et al.* (2018) 'MeCP2 Expression in a Rat Model of Risky Decision Making', *Neuroscience*, 369, pp. 212–221. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.11.016.

- Depresja - analiza kosztów ekonomicznych i społecznych* (no date). Available at: <https://izwoz.lazarski.pl/projekty-badawcze/raport-nt-depresji/> (Accessed: 22 May 2019).
- Depression is the no. 1 cause of ill health and disability worldwide | World Economic Forum* (no date). Available at: <https://www.weforum.org/agenda/2018/05/depression-prevents-many-of-us-from-leading-healthy-and-productive-lives-being-the-no-1-cause-of-ill-health-and-disability-worldwide/> (Accessed: 22 May 2019).
- Díaz de León-Guerrero, S., Pedraza-Alva, G. and Pérez-Martínez, L. (2011) 'In sickness and in health: the role of methyl-CpG binding protein 2 in the central nervous system', *European Journal of Neuroscience*, 33(9), pp. 1563–1574. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07658.x.
- Doboszewska, U. *et al.* (2016) 'Alterations of Bio-elements, Oxidative, and Inflammatory Status in the Zinc Deficiency Model in Rats', *Neurotoxicity Research*, 29(1), pp. 143–154. doi: 10.1007/s12640-015-9571-7.
- Dong, C. *et al.* (2016) 'Rapid and Sustained Antidepressant Action of the mGlu2/3 Receptor Antagonist MGS0039 in the Social Defeat Stress Model: Comparison with Ketamine', *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20(3), p. pyw089. doi: 10.1093/ijnp/pyw089.
- Dorfman, M. D. *et al.* (2011) 'Neurotrophins acting via TRKB receptors activate the JAGGED1-NOTCH2 cell-cell communication pathway to facilitate early ovarian development.', *Endocrinology*. The Endocrine Society, 152(12), pp. 5005–16. doi: 10.1210/en.2011-1465.
- Duclot, F. and Kabbaj, M. (2015) 'Epigenetic mechanisms underlying the role of brain-derived neurotrophic factor in depression and response to antidepressants.', *The Journal of experimental biology*. Company of Biologists, 218(Pt 1), pp. 21–31. doi: 10.1242/jeb.107086.
- Dwivedi, T. and Zhang, H. (2015) 'Lithium-induced neuroprotection is associated with epigenetic modification of specific BDNF gene promoter and altered expression of apoptotic-regulatory proteins', *Frontiers in Neuroscience*, 8, p. 457. doi: 10.3389/fnins.2014.00457.
- Dwivedi, Y. (2016) 'Pathogenetic and therapeutic application of microRNAs in major depressive disorder', *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. NIH Public Access, 64, p. 341. doi: 10.1016/J.PNPBP.2015.02.003.
- El-Kashef, D. H. and Sharawy, M. H. (2018) 'Venlafaxine mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity via down-regulating apoptotic pathway in rats', *Chemico-Biological Interactions*, 290, pp. 110–118. doi: 10.1016/j.cbi.2018.05.015.
- Fagerberg, L. *et al.* (2014) 'Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 13(2), pp. 397–406. doi: 10.1074/mcp.M113.035600.
- Fang, H. *et al.* (2019) 'Depression in sleep disturbance: A review on a bidirectional relationship,

- mechanisms and treatment', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. doi: 10.1111/jcmm.14170.
- Feinberg, A. P. and Tycko, B. (2004) 'The history of cancer epigenetics.', *Nature reviews. Cancer*, 4(2), pp. 143–53. doi: 10.1038/nrc1279.
- Ferland, C. L. and Schrader, L. A. (2011) 'Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: a potential role of sirtuins.', *Neuroscience*, 174, pp. 104–14. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.077.
- Fernstrom, M. H., Krowinski, R. L. and Kupfer, D. J. (1986) 'Chronic imipramine treatment and weight gain', *Psychiatry Research*. Elsevier, 17(4), pp. 269–273. doi: 10.1016/0165-1781(86)90074-0.
- Fisher, N. M. *et al.* (2018) 'Metabotropic Glutamate Receptor 7: A New Therapeutic Target in Neurodevelopmental Disorders.', *Frontiers in molecular neuroscience*. Frontiers Media SA, 11, p. 387. doi: 10.3389/fnmol.2018.00387.
- Garcia-Concejo, A., Jimenez-Gonzalez, A. and Rodríguez, R. E. (2016) 'μ Opioid Receptor Expression after Morphine Administration Is Regulated by miR-212/132 Cluster', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(7), p. e0157806. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0157806.
- Gassen, N. C. *et al.* (2015) 'Chaperoning epigenetics: FKBP51 decreases the activity of DNMT1 and mediates epigenetic effects of the antidepressant paroxetine', *Science Signaling*, 8(404), pp. ra119–ra119. doi: 10.1126/scisignal.aac7695.
- Giurgescu, C. *et al.* (2019) 'Neighborhood Environment and DNA Methylation: Implications for Cardiovascular Disease Risk', *Journal of Urban Health*. doi: 10.1007/s11524-018-00341-1.
- Grosse, S. D. *et al.* (2009) 'Disability and disability-adjusted life years: not the same.', *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)*. SAGE Publications, 124(2), pp. 197–202. doi: 10.1177/003335490912400206.
- Grova, N. *et al.* (2019) 'Epigenetic and Neurological Impairments Associated with Early Life Exposure to Persistent Organic Pollutants', *International Journal of Genomics*, 2019, pp. 1–19. doi: 10.1155/2019/2085496.
- Grygiel-Górniak, B., Limphaibool, N. and Puszczewicz, M. (2019) 'Cytokine secretion and the risk of depression development in patients with connective tissue diseases', *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, p. pcn.12826. doi: 10.1111/pcn.12826.
- Gumuslu, E. *et al.* (2013) 'The Effects of Tianeptine, Olanzapine and Fluoxetine on the Cognitive Behaviors of Unpredictable Chronic Mild Stress-exposed Mice', *Drug Research*, 63(10), pp. 532–539. doi: 10.1055/s-0033-1347237.
- Guo, K. *et al.* (2016) 'Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on expression of 5-HT1AR and neurotransmitters in rats with vascular dementia', *Genetics and Molecular Research*, 15(4). doi:

10.4238/gmr15049031.

Haghighi, F. *et al.* (2014) 'Increased DNA methylation in the suicide brain.', *Dialogues in clinical neuroscience*, 16(3), pp. 430–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25364291> (Accessed: 25 March 2019).

Hall, B. K. (2004) 'In search of evolutionary developmental mechanisms: The 30-year gap between 1944 and 1974', *Journal of Experimental Zoology*. John Wiley & Sons, Ltd, 302B(1), pp. 5–18. doi: 10.1002/jez.b.20002.

Han A, Sung YB, Chung SY, K. M. (2014) 'Possible additional antidepressant-like mechanism of sodium butyrate: targeting the hippocampus.', *Neuropharmacology*, 81, pp. 292–302. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.02.017.

Handy, D. E., Castro, R. and Loscalzo, J. (2011) 'Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease.', *Circulation*. NIH Public Access, 123(19), pp. 2145–56. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839.

He, Y. *et al.* (2019) 'Intervention mechanism of repeated oral GABA administration on anxiety-like behaviors induced by emotional stress in rats', *Psychiatry Research*, 271, pp. 649–657. doi: 10.1016/j.psychres.2018.12.025.

Herbel, B. L. and Stelmach, H. (2007) 'Involuntary medication treatment for competency restoration of 22 defendants with delusional disorder.', *The journal of the American Academy of Psychiatry and the Law*. Journal of the American Academy of Psychiatry and the Law Online, 35(1), pp. 47–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389345> (Accessed: 24 January 2019).

Hisaoka, K. *et al.* (2011) 'Tricyclic Antidepressant Amitriptyline Activates Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling in Glial Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), pp. 21118–21128. doi: 10.1074/jbc.M111.224683.

*Historical Understandings of Depression* (no date). Available at:

<https://www.mentalhelp.net/articles/historical-understandings-of-depression/> (Accessed: 22 May 2019).

Hu, H., Li, B. and Duan, S. (2019) 'The Alteration of Subtelomeric DNA Methylation in Aging-Related Diseases', *Frontiers in Genetics*, 9, p. 697. doi: 10.3389/fgene.2018.00697.

Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001) 'Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function', *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), pp. 677–736. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.677.

Huang, X. *et al.* (2014) 'Venlafaxine inhibits apoptosis of hippocampal neurons by up-regulating brain-derived neurotrophic factor in a rat depression model.', *Die Pharmazie*, 69(12), pp. 909–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25951665> (Accessed: 28 May 2019).

- Hutchinson, A. N. *et al.* (2012a) 'Phosphorylation of MeCP2 at Ser421 Contributes to Chronic Antidepressant Action', *Journal of Neuroscience*, 32(41), pp. 14355–14363. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2156-12.2012.
- Hutchinson, A. N. *et al.* (2012b) 'Phosphorylation of MeCP2 at Ser421 Contributes to Chronic Antidepressant Action', *Journal of Neuroscience*, 32(41), pp. 14355–14363. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2156-12.2012.
- Iga, J.-I. *et al.* (2007) 'Altered HDAC5 and CREB mRNA expressions in the peripheral leukocytes of major depression.', *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 31(3), pp. 628–32. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.12.014.
- Illiano, M. *et al.* (2018) 'Forskolin Sensitizes Human Acute Myeloid Leukemia Cells to H3K27me2/3 Demethylases GSKJ4 Inhibitor via Protein Kinase A.', *Frontiers in pharmacology*. Frontiers Media SA, 9, p. 792. doi: 10.3389/fphar.2018.00792.
- Im, H.-I. *et al.* (2010) 'MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212.', *Nature neuroscience*. NIH Public Access, 13(9), pp. 1120–7. doi: 10.1038/nn.2615.
- Jastrzębska-Więsek, M. *et al.* (2015) 'Antidepressant-like activity of EMD 386088, a 5-HT6 receptor partial agonist, following systemic acute and chronic administration to rats', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 388(10), pp. 1079–1088. doi: 10.1007/s00210-015-1141-2.
- Jastrzębska-Więsek, M. *et al.* (2018a) 'Chronic antidepressant-like effect of EMD386088, a partial 5-HT6 receptor agonist, in olfactory bulbectomy model may be connected with BDNF and/or CREB signalling pathway', *Pharmacological Reports*, 70(6), pp. 1047–1056. doi: 10.1016/j.pharep.2018.05.009.
- Jastrzębska-Więsek, M. *et al.* (2018b) 'Chronic antidepressant-like effect of EMD386088, a partial 5-HT6 receptor agonist, in olfactory bulbectomy model may be connected with BDNF and/or CREB signalling pathway', *Pharmacological Reports*, 70(6), pp. 1047–1056. doi: 10.1016/j.pharep.2018.05.009.
- Jindal, A. *et al.* (2012) 'Antidepressant-like effect of etazolate, a cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 inhibitor—an approach using rodent behavioral antidepressant tests battery', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 689(1–3), pp. 125–131. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2012.05.051.
- Jokinen, J. *et al.* (2018) 'Epigenetic Changes in the CRH Gene are Related to Severity of Suicide Attempt and a General Psychiatric Risk Score in Adolescents', *EBioMedicine*. Elsevier, 27, p. 123. doi: 10.1016/J.EBIOM.2017.12.018.
- Joseph, D. B., Strand, D. W. and Vezina, C. M. (2018) 'DNA methylation in development and

- disease: an overview for prostate researchers.’, *American journal of clinical and experimental urology*, 6(6), pp. 197–218. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30697577> (Accessed: 14 February 2019).
- Ka, M. and Kim, W.-Y. (2018) ‘ANKRD11 associated with intellectual disability and autism regulates dendrite differentiation via the BDNF/TrkB signaling pathway’, *Neurobiology of Disease*, 111, pp. 138–152. doi: 10.1016/j.nbd.2017.12.008.
- Kang, H.-J. *et al.* (2018) ‘BDNF Methylation and Suicidal Ideation in Patients with Acute Coronary Syndrome.’, *Psychiatry investigation*. Korean Neuropsychiatric Association, 15(11), pp. 1094–1097. doi: 10.30773/pi.2018.09.20.
- Kautzky, A. *et al.* (2019) ‘Epistasis of HTR1A and BDNF risk genes alters cortical 5-HT1A receptor binding: PET results link genotype to molecular phenotype in depression’, *Translational Psychiatry*, 9(1), p. 5. doi: 10.1038/s41398-018-0308-2.
- Keller, J. *et al.* (2017) ‘HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition.’, *Molecular psychiatry*. NIH Public Access, 22(4), pp. 527–536. doi: 10.1038/mp.2016.120.
- Klein, J. A. and Ackerman, S. L. (2003) ‘Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration.’, *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 111(6), pp. 785–93. doi: 10.1172/JCI18182.
- Klose, R. J. *et al.* (2005) ‘DNA Binding Selectivity of MeCP2 Due to a Requirement for A/T Sequences Adjacent to Methyl-CpG’, *Molecular Cell*, 19(5), pp. 667–678. doi: 10.1016/j.molcel.2005.07.021.
- Klose, R. J. and Bird, A. P. (2006) ‘Genomic DNA methylation: the mark and its mediators’, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends, 31(2), pp. 89–97. doi: 10.1016/J.TIBS.2005.12.008.
- Koenig, A. M. and Thase, M. E. (no date a) ‘First-line pharmacotherapies for depression - what is the best choice?’, *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*, 119(7–8), pp. 478–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776688> (Accessed: 24 January 2019).
- Koenig, A. M. and Thase, M. E. (no date b) ‘First-line pharmacotherapies for depression - what is the best choice?’, *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*, 119(7–8), pp. 478–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776688> (Accessed: 18 February 2019).
- Koo, J. W. and Duman, R. S. (2009) ‘Evidence for IL-1 receptor blockade as a therapeutic strategy for the treatment of depression.’, *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*. NIH Public Access, 10(7), pp. 664–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19579172> (Accessed: 7 June 2019).
- Kreiner, G. *et al.* (2016) ‘A lack of  $\alpha$ 1A-adrenergic receptor-mediated antidepressant-like effects of

- S-(+)-niguldipine and B8805-033 in the forced swim test', *Behavioural Pharmacology*, 27(4), pp. 397–401. doi: 10.1097/FBP.0000000000000204.
- Lagger, S. *et al.* (2017) 'MeCP2 recognizes cytosine methylated tri-nucleotide and di-nucleotide sequences to tune transcription in the mammalian brain.', *PLoS genetics*. Public Library of Science, 13(5), p. e1006793. doi: 10.1371/journal.pgen.1006793.
- Lapmanee, S. *et al.* (2017) 'Agomelatine, venlafaxine, and running exercise effectively prevent anxiety- and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats', *PLOS ONE*. Edited by J. Homberg, 12(11), p. e0187671. doi: 10.1371/journal.pone.0187671.
- Lewis, S. J. *et al.* (2019) 'The epidemiology of trauma and post-traumatic stress disorder in a representative cohort of young people in England and Wales', *The Lancet Psychiatry*, 6(3), pp. 247–256. doi: 10.1016/S2215-0366(19)30031-8.
- Li, C.-T., Yang, K.-C. and Lin, W.-C. (2019) 'Glutamatergic Dysfunction and Glutamatergic Compounds for Major Psychiatric Disorders: Evidence From Clinical Neuroimaging Studies', *Frontiers in Psychiatry*, 9, p. 767. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00767.
- Li, H.-D. *et al.* (2019) 'Noncoding RNAs in alcoholic liver disease', *Journal of Cellular Physiology*. doi: 10.1002/jcp.28229.
- Li, H. *et al.* (2019) 'Nuclear orphan receptor NR2F6 confers cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer cells by activating the Notch3 signaling pathway', *International Journal of Cancer*, p. ijc.32293. doi: 10.1002/ijc.32293.
- Li, M. *et al.* (2016) 'Hesperidin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in Mice by Promoting the miRNA-132 Pathway', *Inflammation*. Springer US, 39(5), pp. 1681–1689. doi: 10.1007/s10753-016-0402-7.
- Lin, H. *et al.* (2012) 'Molecular mechanisms associated with the antidepressant effects of the class I histone deacetylase inhibitor MS-275 in the rat ventrolateral orbital cortex', *Brain Research*, 1447, pp. 119–125. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.053.
- Lippard, E. T. C. *et al.* (2019) 'Preliminary examination of gray and white matter structure and longitudinal structural changes in frontal systems associated with future suicide attempts in adolescents and young adults with mood disorders', *Journal of Affective Disorders*, 245, pp. 1139–1148. doi: 10.1016/j.jad.2018.11.097.
- Liu, R. *et al.* (2015) 'SIRT2 is involved in the modulation of depressive behaviors', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5, p. 8415. doi: 10.1038/srep08415.
- Lockwood, L. E., Su, S. and Youssef, N. A. (2015) 'The role of epigenetics in depression and suicide: A platform for gene–environment interactions', *Psychiatry Research*, 228(3), pp. 235–242. doi: 10.1016/j.psychres.2015.05.071.
- Luo, K.-R. *et al.* (2010) 'Differential regulation of neurotrophin S100B and BDNF in two rat

- models of depression’, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier, 34(8), pp. 1433–1439. doi: 10.1016/J.PNPBP.2010.07.033.
- Lyst, M. J. *et al.* (2013) ‘Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor.’, *Nature neuroscience*. Europe PMC Funders, 16(7), pp. 898–902. doi: 10.1038/nn.3434.
- Mandelli, L. and Serretti, A. (2013) ‘Gene environment interaction studies in depression and suicidal behavior: An update’, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(10), pp. 2375–2397. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.011.
- Mao, X. *et al.* (2011) ‘The tricyclic antidepressant amitriptyline inhibits D-cyclin transactivation and induces myeloma cell apoptosis by inhibiting histone deacetylases: in vitro and in silico evidence.’, *Molecular pharmacology*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 79(4), pp. 672–80. doi: 10.1124/mol.110.068122.
- Massart, R., Mongeau, R. and Lanfumey, L. (2012) ‘Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression.’, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. The Royal Society, 367(1601), pp. 2485–94. doi: 10.1098/rstb.2012.0212.
- Maussion, G. *et al.* (2015) ‘Investigation of genes important in neurodevelopment disorders in adult human brain’, *Human Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, 134(10), pp. 1037–1053. doi: 10.1007/s00439-015-1584-z.
- McFarland, K. N. *et al.* (2014) ‘MeCP2: a novel Huntingtin interactor’, *Human Molecular Genetics*, 23(4), pp. 1036–1044. doi: 10.1093/hmg/ddt499.
- Mendoza-Viveros, L., Chiang, C.-K., Ong, Jonathan L K, *et al.* (2017) ‘miR-132/212 Modulates Seasonal Adaptation and Dendritic Morphology of the Central Circadian Clock.’, *Cell reports*. NIH Public Access, 19(3), pp. 505–520. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.057.
- Mendoza-Viveros, L., Chiang, C.-K., Ong, Jonathan L.K., *et al.* (2017) ‘miR-132/212 Modulates Seasonal Adaptation and Dendritic Morphology of the Central Circadian Clock’, *Cell Reports*, 19(3), pp. 505–520. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.057.
- Misztak, P., Pańczyszyn-Trzewik, P. and Sowa-Kućma, M. (2018) ‘Histone deacetylases (HDACs) as therapeutic target for depressive disorders’, *Pharmacological Reports*, 70(2), pp. 398–408. doi: 10.1016/j.pharep.2017.08.001.
- Młyniec, K. *et al.* (2014) ‘The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims.’, *Neuropharmacology*, 79, pp. 290–7. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.001.
- Modell, S. *et al.* (1997) ‘Corticosteroid Receptor Function Is Decreased in Depressed Patients’, *Neuroendocrinology*, 65(3), pp. 216–222. doi: 10.1159/000127275.



- Montoya, A. *et al.* (2016) 'The noradrenergic paradox: implications in the management of depression and anxiety.', *Neuropsychiatric disease and treatment*. Dove Press, 12, pp. 541–57. doi: 10.2147/NDT.S91311.
- Morales-Medina, J. C. *et al.* (2017) 'The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: The hippocampal pathway', *Behavioural Brain Research*, 317, pp. 562–575. doi: 10.1016/j.bbr.2016.09.029.
- Mottamal, M. *et al.* (2015) 'Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents', *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 20(3), pp. 3898–3941. doi: 10.3390/molecules20033898.
- Müller, M. (2019) 'Disturbed redox homeostasis and oxidative stress: Potential players in the developmental regression in Rett syndrome', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 98, pp. 154–163. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.12.009.
- Muñoz-Cobo, I. *et al.* (2018) 'Nucleocytoplasmic export of HDAC5 and SIRT2 downregulation: two epigenetic mechanisms by which antidepressants enhance synaptic plasticity markers', *Psychopharmacology*, 235(10), pp. 2831–2846. doi: 10.1007/s00213-018-4975-8.
- Nott, A. *et al.* (2016) 'Histone deacetylase 3 associates with MeCP2 to regulate FOXO and social behavior', *Nature Neuroscience*, 19(11), pp. 1497–1505. doi: 10.1038/nn.4347.
- Nowak, G. *et al.* (1993) 'Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 265(3), pp. 1380–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099620> (Accessed: 7 March 2019).
- Number of people with depression, by region - Our World in Data* (no date). Available at: <https://ourworldindata.org/grapher/number-suffering-from-depression-by-region> (Accessed: 22 May 2019).
- O'Flaherty, B., Neigh, G. N. and Rainnie, D. (2019) 'High-fructose diet initiated during adolescence does not affect basolateral amygdala excitability or affective-like behavior in Sprague Dawley rats', *Behavioural Brain Research*, 365, pp. 17–25. doi: 10.1016/j.bbr.2019.02.042.
- Ojalvo, L. *et al.* (2015) 'Discovery medicine medicine on the leading edge.', *Discov Med*. Discovery Medicine, 20, pp. 97–109. Available at: <http://www.discoverymedicine.com/Changxue-Ji/2018/06/mir-212-and-mtor-modulate-autophagy-in-colorectal-adenoma-hs-29-cells/> (Accessed: 29 April 2019).
- Ooi, L. and Wood, I. C. (2008) 'Regulation of gene expression in the nervous system', *Biochemical Journal*, 414(3), pp. 327–341. doi: 10.1042/BJ20080963.
- Orsetti, M. *et al.* (2007) 'Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and

- anhedonic rats', *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 10(03), p. 345. doi: 10.1017/S1461145706006705.
- Oved, K. *et al.* (2012) 'Genome-wide miRNA expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies tentative SSRI antidepressant response biomarkers', *Pharmacogenomics*, 13(10), pp. 1129–1139. doi: 10.2217/pgs.12.93.
- Padilla, K. M. *et al.* (2018) 'Behavioral changes induced through adenosine A2A receptor ligands in a rat depression model induced by olfactory bulbectomy', *Brain and Behavior*, 8(5), p. e00952. doi: 10.1002/brb3.952.
- Pan, B. and Liu, Y. (2015) 'Effects of duloxetine on microRNA expression profile in frontal lobe and hippocampus in a mouse model of depression.', *International journal of clinical and experimental pathology*. e-Century Publishing Corporation, 8(11), pp. 15454–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26823914> (Accessed: 5 June 2019).
- Pandey, D. *et al.* (2014) 'Effect of combination of ketanserin and escitalopram on behavioral anomalies after olfactory bulbectomy: Prediction of quick onset of antidepressant action', *Indian Journal of Pharmacology*, 46(6), p. 639. doi: 10.4103/0253-7613.144935.
- Papp, M. *et al.* (2018) 'Effects on brain-derived neurotrophic factor signalling of chronic mild stress, chronic risperidone and acute intracranial dopamine receptor challenges', *Behavioural Pharmacology*, 29(6), p. 1. doi: 10.1097/FBP.0000000000000392.
- Peedicayil, J., Grayson, D. R. and Avramopoulos, D. (2014) *Epigenetics in psychiatry*. Academic Press. Available at: [https://books.google.pl/books?id=4mFzAwAAQBAJ&pg=PA487&lpg=PA487&dq=acetylation+H3+Escitalopram&source=bl&ots=8LaGhYu\\_ZF&sig=ACfU3U3DuiDWdqDpY\\_UnAP5pJFeThxoZCQ&hl=pl&sa=X&ved=2ahUKEwj6jbDS55DhAhVJiYsKHWSfBakQ6AEwAHoECAgQAQ#v=onepage&q=acetylation H3 Escitalopram&f=false](https://books.google.pl/books?id=4mFzAwAAQBAJ&pg=PA487&lpg=PA487&dq=acetylation+H3+Escitalopram&source=bl&ots=8LaGhYu_ZF&sig=ACfU3U3DuiDWdqDpY_UnAP5pJFeThxoZCQ&hl=pl&sa=X&ved=2ahUKEwj6jbDS55DhAhVJiYsKHWSfBakQ6AEwAHoECAgQAQ#v=onepage&q=acetylation H3 Escitalopram&f=false) (Accessed: 20 March 2019).
- Peyrovan, B. *et al.* (2019) 'The glycine site of NMDA receptors: A target for cognitive enhancement in psychiatric disorders', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier, 92, pp. 387–404. doi: 10.1016/J.PNPBP.2019.02.001.
- Philippe, T. J. *et al.* (2018) 'Loss of MeCP2 in adult 5-HT neurons induces 5-HT1A autoreceptors, with opposite sex-dependent anxiety and depression phenotypes', *Scientific Reports*, 8(1), p. 5788. doi: 10.1038/s41598-018-24167-8.
- Pochwat, B. *et al.* (2015a) 'Antidepressant-like activity of magnesium in the olfactory bulbectomy model is associated with the AMPA/BDNF pathway.', *Psychopharmacology*, 232(2), pp. 355–67. doi: 10.1007/s00213-014-3671-6.
- Pochwat, B. *et al.* (2015b) 'Antidepressant-like activity of magnesium in the olfactory bulbectomy model is associated with the AMPA/BDNF pathway', *Psychopharmacology*. Springer Berlin

- Heidelberg, 232(2), pp. 355–367. doi: 10.1007/s00213-014-3671-6.
- Qi, S. *et al.* (2018) ‘MicroRNA132 associated multimodal neuroimaging patterns in unmedicated major depressive disorder’, *Brain*, 141(3), pp. 916–926. doi: 10.1093/brain/awx366.
- Rajaprakash, M., Richer, J. and Sell, E. (2018) ‘Valproic acid as a monotherapy in drug-resistant methyl-CpG-binding protein 2 gene (MECP2) duplication-related epilepsy’, *Epilepsy & Behavior Case Reports*, 10, pp. 133–136. doi: 10.1016/j.ebcr.2018.09.009.
- Rang, H. P. *et al.* (no date) *Rang and Dale’s pharmacology*.
- Razavi, B. M. *et al.* (2017) ‘Study of the Role of CREB, BDNF, and VGF Neuropeptide in Long Term Antidepressant Activity of Crocin in the Rat Cerebellum.’, *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, 16(4), pp. 1452–1462. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29552054> (Accessed: 29 January 2019).
- Reddy, M. S. (2010) ‘Depression: the disorder and the burden.’, *Indian journal of psychological medicine*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 32(1), pp. 1–2. doi: 10.4103/0253-7176.70510.
- Réus, G. Z. *et al.* (2013) ‘Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors’, *Behavioural Brain Research*, 256, pp. 451–456. doi: 10.1016/j.bbr.2013.08.041.
- Reynolds, G. P. *et al.* (2019) ‘Adjunctive Lurasidone Suppresses Food Intake and Weight Gain Associated with Olanzapine Administration in Rats’, *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 17(2), pp. 314–317. doi: 10.9758/cpn.2019.17.2.314.
- Román, G., Mancera-Páez, O. and Bernal, C. (2019) ‘Epigenetic Factors in Late-Onset Alzheimer’s Disease: MTHFR and CTH Gene Polymorphisms, Metabolic Transsulfuration and Methylation Pathways, and B Vitamins’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), p. 319. doi: 10.3390/ijms20020319.
- Rong, C. *et al.* (2018) ‘Predictors of Response to Ketamine in Treatment Resistant Major Depressive Disorder and Bipolar Disorder’, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(4), p. 771. doi: 10.3390/ijerph15040771.
- Roy, B. and Dwivedi, Y. (2017a) ‘Understanding epigenetic architecture of suicide neurobiology: A critical perspective.’, *Neuroscience and biobehavioral reviews*. NIH Public Access, 72, pp. 10–27. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.10.031.
- Roy, B. and Dwivedi, Y. (2017b) ‘Understanding epigenetic architecture of suicide neurobiology: A critical perspective’, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 72, pp. 10–27. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.10.031.
- Salim, S. (2017) ‘Oxidative Stress and the Central Nervous System.’, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. American Society for Pharmacology and Experimental

Therapeutics, 360(1), pp. 201–205. doi: 10.1124/jpet.116.237503.

Schulz, W. A. *et al.* (2019) ‘The histone demethylase UTX/KDM6A in cancer: Progress and puzzles’, *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.32116.

Seo, M. K. *et al.* (2016) ‘Early life stress increases stress vulnerability through BDNF gene epigenetic changes in the rat hippocampus.’, *Neuropharmacology*, 105, pp. 388–97. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.009.

Serretti, A. and Mandelli, L. (2010) ‘Antidepressants and Body Weight’, *The Journal of Clinical Psychiatry*, 71(10), pp. 1259–1272. doi: 10.4088/JCP.09r05346blu.

Sheikh, T. I. *et al.* (2013) ‘A synonymous change, p.Gly16Gly in MECP2 Exon 1, causes a cryptic splice event in a Rett syndrome patient.’, *Orphanet journal of rare diseases*. BioMed Central, 8, p. 108. doi: 10.1186/1750-1172-8-108.

Shovlin, S. and Tropea, D. (2018a) ‘Transcriptome level analysis in Rett syndrome using human samples from different tissues.’, *Orphanet journal of rare diseases*. BioMed Central, 13(1), p. 113. doi: 10.1186/s13023-018-0857-8.

Shovlin, S. and Tropea, D. (2018b) ‘Transcriptome level analysis in Rett syndrome using human samples from different tissues’, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), p. 113. doi: 10.1186/s13023-018-0857-8.

Singh, A., Bishayee, A. and Pandey, A. (2018) ‘Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy’, *Nutrients*, 10(6), p. 731. doi: 10.3390/nu10060731.

Singh, P. K. (2019) ‘Histone methyl transferases: A class of epigenetic opportunities to counter uncontrolled cell proliferation’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, pp. 351–368. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.069.

Siwek, M. *et al.* (2013) ‘Oxidative stress markers in affective disorders.’, *Pharmacological reports : PR*, 65(6), pp. 1558–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553004> (Accessed: 1 March 2019).

Skaper, S. D. (2012) ‘The Neurotrophin Family of Neurotrophic Factors: An Overview’, in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 1–12. doi: 10.1007/978-1-61779-536-7\_1. *Sodium valproate* | *C8H15NaO2* - *PubChem* (no date). Available at: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium\\_valproate#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium_valproate#section=Top) (Accessed: 13 March 2019).

Sowa-Kućma, M. *et al.* (2008) ‘Antidepressant-like activity of zinc: further behavioral and molecular evidence.’, *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 115(12), pp. 1621–8. doi: 10.1007/s00702-008-0115-7.

Sowa-Kućma, M. *et al.* (2013) ‘Zinc, magnesium and NMDA receptor alterations in the

- hippocampus of suicide victims', *Journal of Affective Disorders*, 151(3), pp. 924–931. doi: 10.1016/j.jad.2013.08.009.
- Sowa-Kućma, M. *et al.* (2018) 'Lipid Peroxidation and Immune Biomarkers Are Associated with Major Depression and Its Phenotypes, Including Treatment-Resistant Depression and Melancholia', *Neurotoxicity Research*, 33(2), pp. 448–460. doi: 10.1007/s12640-017-9835-5.
- Stenz, L. *et al.* (2018) 'Intergenerational Transmission of DNA Methylation Signatures Associated with Early Life Stress', *Current Genomics*, 19(8), pp. 665–675. doi: 10.2174/1389202919666171229145656.
- SU, M. *et al.* (2015) 'MeCP2 controls hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression via homeostatic interactions with microRNA-132 in rats with depression', *Molecular Medicine Reports*, 12(4), pp. 5399–5406. doi: 10.3892/mmr.2015.4104.
- Subbanna, S. *et al.* (2013) 'G9a-mediated histone methylation regulates ethanol-induced neurodegeneration in the neonatal mouse brain.', *Neurobiology of disease*, 54, pp. 475–85. doi: 10.1016/j.nbd.2013.01.022.
- Subbanna, S. *et al.* (2014) 'Ethanol induced acetylation of histone at G9a exon1 and G9a-mediated histone H3 dimethylation leads to neurodegeneration in neonatal mice.', *Neuroscience*. NIH Public Access, 258, pp. 422–32. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.043.
- Sullivan, P. F., Daly, M. J. and O'Donovan, M. (2012) 'Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications', *Nature Reviews Genetics*, 13(8), pp. 537–551. doi: 10.1038/nrg3240.
- Sundar, I. K. *et al.* (2010) 'Oxidative stress, thiol redox signaling methods in epigenetics.', *Methods in enzymology*, 474, pp. 213–44. doi: 10.1016/S0076-6879(10)74013-1.
- Sweatt, J. D. (2013) *Epigenetic regulation in the nervous system : basic mechanisms and clinical impact*. Elsevier Science.
- Szewczyk, B. *et al.* (2014) 'Stress-induced alterations in 5-HT1A receptor transcriptional modulators NUDR and Freud-1.', *The international journal of neuropsychopharmacology*. PMC Canada manuscript submission, 17(11), pp. 1763–75. doi: 10.1017/S146114571400100X.
- Takekita, Y. *et al.* (2015) 'HTR1A Gene Polymorphisms and 5-HT1A Receptor Partial Agonist Antipsychotics Efficacy in Schizophrenia', *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 35(3), pp. 220–227. doi: 10.1097/JCP.0000000000000304.
- Tamilselvan, T. *et al.* (2017) 'Behavioral and neurochemical evaluation of ethanol on olanzapine treated methylphenidate induced manic like behaviors in swiss albino mice', *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. No longer published by Elsevier, 6(1), pp. 48–56. doi: 10.1016/J.BJBAS.2017.01.001.
- Tao, J. *et al.* (2014) 'Electroacupuncture enhances hippocampal NSCs proliferation in cerebral

- ischemia-reperfusion injured rats via activation of notch signaling pathway', *International Journal of Neuroscience*, 124(3), pp. 204–212. doi: 10.3109/00207454.2013.840781.
- Tolentino, J. C. and Schmidt, S. L. (2018) 'DSM-5 Criteria and Depression Severity: Implications for Clinical Practice.', *Frontiers in psychiatry*. Frontiers Media SA, 9, p. 450. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00450.
- Tsankova, N. M. *et al.* (2006) 'Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action', *Nature Neuroscience*, 9(4), pp. 519–525. doi: 10.1038/nn1659.
- Tuck, A. N. and Ghazali, D. H. (2017) 'Ketamine as a Rapid-Acting Antidepressant: Promising Clinical and Basic Research', *American Journal of Psychiatry Residents' Journal*. American Psychiatric Association Arlington, VA, 12(3), pp. 3–5. doi: 10.1176/appi.ajp-rj.2017.120302.
- Uys, M. M. *et al.* (2017) 'The  $\alpha_2C$ -adrenoceptor antagonist, ORM-10921, exerts antidepressant-like effects in the Flinders Sensitive Line rat', *Behavioural Pharmacology*, 28(1), pp. 9–18. doi: 10.1097/FBP.0000000000000261.
- Vaccaro, T. *et al.* (2018) 'Alterations in the MicroRNA of the Blood of Autism Spectrum Disorder Patients: Effects on Epigenetic Regulation and Potential Biomarkers', *Behavioral Sciences*, 8(8), p. 75. doi: 10.3390/bs8080075.
- Vashi, N. and Justice, M. J. (2019a) 'Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies', *Mammalian Genome*. doi: 10.1007/s00335-019-09793-5.
- Vashi, N. and Justice, M. J. (2019b) 'Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies', *Mammalian Genome*. Springer US, pp. 1–21. doi: 10.1007/s00335-019-09793-5.
- Wanet, A. *et al.* (2012) 'miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 40(11), pp. 4742–53. doi: 10.1093/nar/gks151.
- Wang, S. *et al.* (2009) 'Decreased expression of serotonin 1A receptor in the dentate gyrus in association with chronic mild stress: A rat model of post-stroke depression', *Psychiatry Research*, 170(2–3), pp. 245–251. doi: 10.1016/j.psychres.2008.07.006.
- Wapenaar, H. *et al.* (2016) 'Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes', *Clinical Epigenetics*. BioMed Central, 8(1), p. 59. doi: 10.1186/s13148-016-0225-2.
- Wen, Z. *et al.* (2017) 'Identification of autism-related MECP2 mutations by whole-exome sequencing and functional validation', *Molecular Autism*, 8(1), p. 43. doi: 10.1186/s13229-017-0157-5.
- Wilkinson, S. T. *et al.* (2018) 'Serum and plasma brain-derived neurotrophic factor and response in a randomized controlled trial of riluzole for treatment resistant depression', *Journal of Affective Disorders*, 241, pp. 514–518. doi: 10.1016/j.jad.2018.08.075.

- Xiao, N. and Le, Q.-T. (2016) 'Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration.', *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. NIH Public Access, 64(2), pp. 89–99. doi: 10.1007/s00005-015-0376-4.
- Xie, T. *et al.* (2013) 'Is X-linked methyl-CpG binding protein 2 a new target for the treatment of Parkinson's disease.', *Neural regeneration research*, 8(21), pp. 1948–57. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.003.
- Xie, Z.-M. *et al.* (2017) 'Alterations in the inflammatory cytokines and brain-derived neurotrophic factor contribute to depression-like phenotype after spared nerve injury: improvement by ketamine', *Scientific Reports*, 7(1), p. 3124. doi: 10.1038/s41598-017-03590-3.
- Xiong, S. *et al.* (2019) 'Neuroprotective effects of MK-801 on auditory cortex in salicylate-induced tinnitus: Involvement of neural activity, glutamate and ascorbate', *Hearing Research*. doi: 10.1016/j.heares.2019.01.021.
- Xu, L., Natarajan, R. and Chen, Z. (2019) 'Epigenetic Risk Profile of Diabetic Kidney Disease in High-Risk Populations', *Current Diabetes Reports*, 19(3), p. 9. doi: 10.1007/s11892-019-1129-2.
- Yamawaki, Y. *et al.* (2012) 'Antidepressant-like effect of sodium butyrate (HDAC inhibitor) and its molecular mechanism of action in the rat hippocampus', *The World Journal of Biological Psychiatry*, 13(6), pp. 458–467. doi: 10.3109/15622975.2011.585663.
- Yan, B. *et al.* (2017) 'MiR-218 targets MeCP2 and inhibits heroin seeking behavior', *Scientific Reports*, 7(1), p. 40413. doi: 10.1038/srep40413.
- Yang, S.-J. *et al.* (2014) 'Antidepressant-like effects of salidroside on olfactory bulbectomy-induced pro-inflammatory cytokine production and hyperactivity of HPA axis in rats', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, pp. 451–457. doi: 10.1016/j.pbb.2014.07.015.
- Zhang, R. *et al.* (2016) 'Association study of 5-HT1A, 5-HT2A polymorphisms with schizophrenia and major depressive disorder in the Han Chinese population', *Neuroscience Letters*, 635, pp. 39–43. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.018.
- Zheng, W. *et al.* (2018) 'Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated-dose intravenous ketamine for patients with unipolar and bipolar depression', *Journal of Psychiatric Research*, 106, pp. 61–68. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.09.013.
- Zheng, Y. *et al.* (2016) 'Gestational stress induces depressive-like and anxiety-like phenotypes through epigenetic regulation of BDNF expression in offspring hippocampus', *Epigenetics*. Taylor & Francis, 11(2), p. 150. doi: 10.1080/15592294.2016.1146850.
- Zhong, X. *et al.* (2018) 'Regulation of neural differentiation, synaptic scaling and animal behavior by MeCP2 phosphorylation', *Neurobiology of Learning and Memory*. doi: 10.1016/j.nlm.2018.04.014.
- Zhou, Y. *et al.* (2018) 'Suicide and suicide behaviors: A review of transcriptomics and multiomics

studies in psychiatric disorders', *Journal of Neuroscience Research*. doi: 10.1002/jnr.24367.

Zhou, Z. *et al.* (2006) 'Brain-Specific Phosphorylation of MeCP2 Regulates Activity-Dependent Bdnf Transcription, Dendritic Growth, and Spine Maturation', *Neuron*, 52(2), pp. 255–269. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.037.

Zimmermann, C. A. *et al.* (2015) 'Role of mecp2 in experience-dependent epigenetic programming.', *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 6(1), pp. 60–86. doi: 10.3390/genes6010060.

Zurawek, D. *et al.* (2017) 'Reciprocal MicroRNA Expression in Mesocortical Circuit and Its Interplay with Serotonin Transporter Define Resilient Rats in the Chronic Mild Stress', *Molecular Neurobiology*, 54(8), pp. 5741–5751. doi: 10.1007/s12035-016-0107-9.

van der Zwaal, E. M. *et al.* (2010) 'Olanzapine affects locomotor activity and meal size in male rats', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(1), pp. 130–137. doi: 10.1016/j.pbb.2010.05.009.