

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

FIZIOLOGIE



*Impactul dietei materne în encefalopatia hipoxic-
ischemică. Abordare clinică, biochimică și
epigenetică.*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Coordonator științific:

PROF. UNIV. DR. ZĂGREAN LEON

Doctorand:

ISAC SEBASTIAN

Cuprins

INTRODUCERE.....	12
PARTEA GENERALĂ.....	16
1. Encefalopatia hipoxic-ischemică secundară asfixiei perinatale- entitate clinică și fiziopatologică	17
1.1. Epidemiologie	17
1.2 Etiopatogenie. Factori de risc.....	19
1.3. Fiziopatologia encefalopatiei hipoxic-ischemice	19
1.4. Tablou clinic.....	25
1.5. Diagnostic paraclinic.....	28
1.6. Aspecte histopatologice	34
1.7. Algoritm de diagnostic al encefalopatiei hipoxic-ischemice	37
1.8. Terapie intensivă specifică.....	38
1.9. Perspective	41
2. Dieta maternă peripartum- promotorul complexului lezional neuronal secundar asfixiei perinatale.....	43
2.1. Actualități legate de dieta maternă peripartum: deficiențe nutriționale	43
2.2. Impactul dietei grase în sarcină.....	46
2.3. Trans-resveratrolul. Aplicații clinice	48
2.4. Rolul administrării materne a citicolinei asupra produsului de concepție	51
3. Dezvoltarea hipocampică. Noțiuni de embriologie comparată.....	54
4. Modele experimentale de asfixie perinatală	59
PARTEA SPECIALĂ	64
5. Ipoteză de lucru și obiective generale	65

6. Metodologia generală a cercetării științifice	67
6.1. Etapele studiului.....	67
6.2. Prelucrarea statistică a datelor.....	70
7. Impactul dietei materne în encefalopatia hipoxic-ischemică- abordare	
biochimică	71
7.1 Introducere	71
7.2. Materiale și metode	72
7.2.1 Prelevarea de ser în vederea determinării lactatului seric	72
7.2.2 Prelevare de țesut hipocampic pentru determinarea biomarkerilor specifici	
neuroinflamației și injuriei neuronale prin teste ELISA.....	72
7.2.3. Prelevarea de țesut hipocampic în vederea cuantificării metabolismului hipocampic	
.....	75
7.3. Rezultate	76
7.3.1. Concentrația lactatului seric în loturile C și A	76
7.3.2. Concentrația hipocampică a TNF α , IL-1B, S-100B la 24-48 de ore postexpunere ..	77
7.3.3. Obiectivarea " <i>in vitro</i> " a activității metabolice celulare hipocampice prin testul la	
resazurin	83
7.3.4. Descriere viabilității celulare hipocampice în colorația tripan-blue	84
7.4. Discuții	89
7.4.1. Modificări biochimice neuronale în encefalopatia hipoxic-ischemică.....	89
7.4.2. Rolul aditiv nociv al nutriției grase materne asupra markerilor biochimici neuronali	
din encefalopatia hipoxic-ischemică	91
7.4.3. Rolul trans-resveratrolului matern asupra modificărilor biochimice neuronale din	
encefalopatia hipoxic-ischemică	92
7.4.4. Rolul citicolinei materne în modificările biochimice neuronale din encefalopatia	
hipoxic-ischemică.....	93
8. Impactul dietei materne în encefalopatia hipoxic-ischemică- abordare	
epigenetică.....	95
8.1 Introducere	95
8.2. Materiale și metode	100
8.3 Rezultate.....	102

8.4. Discuții	107
8.4.1. Evidențierea unui profil epigenetic neuronal în encefalopatia hipoxic-ischemică..	107
8.4.2. Modificări epigenetice neuronale din encefalopatia hipoxic-ischemică induse de nutriția grasă maternă	108
8.4.3. Rolul modulator al trans-resveratrolului administrat matern asupra profilului epigenetic neuronal din encefalopatia hipoxic-ischemică.....	109
8.4.4. Rolul modulator al citicolinei administrate matern asupra profilului epigenetic neuronal din encefalopatia hipoxic-ischemică	111

9. Impactul dietei materne în encefalopatia hipoxic-ischemică- abordare clinică și comportamentală..... 112

9.1. Introducere	112
9.2. Materiale și metode	115
9.3. Rezultate.....	122
9.3.1. Variația LRR între loturi	122
9.3.2. Teste comportamentale specifice: OFT, NORT, T-Maze, FST	123
9.4. Discuții	130
9.4.1. Modificări clinice și comportamentale induse de encefalopatia hipoxic-ischemică	130
9.4.2. Rolul nociv al nutriției grase materne în modificările clinice și comportamentale induse de encefalopatia hipoxic-ischemică	131
9.4.3. Impactul suplimentării cu trans-resveratrol a dietei materne asupra modificărilor clinice și comportamentale induse de encefalopatia hipoxic-ischemică	131
9.4.4. Impactul suplimentării cu citicolină a dietei materne asupra modificărilor clinice și comportamentale induse de encefalopatia hipoxic-ischemică.....	132

CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....134

BIBLIOGRAFIE139

ANEXE159

LISTĂ CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ARTICOLE IN EXTENSO

1. A.M. Panaitescu, **S. Isac**, B. Pavel, A.S. Ilie, M. Ceanga, A. Totan, L. Zagrean, G. Peltecu, A.M. Zagrean. OXYTOCIN REDUCES SEIZURE BURDEN AND HIPPOCAMPAL INJURY IN A RAT MODEL OF PERINATAL ASPHYXIA. Acta Endocrinologica (Buc), vol. XIV, no. 3, p. 315-319, 2018. (BDI). <http://dx.doi.org/10.4183/aeb.2018.315>.
2. **Sebastian Isac**, Anca Maria Panaitescu, Mara Iesanu, Ioana Florentina Grigoraș, Alexandra Totan, Amalia Udriste, Natalia Cucu, Gheorghe Peltecu, Leon Zagrean, Ana-Maria Zagrean. Maternal High-Fat Diet Modifies the Immature Hippocampus Vulnerability to Perinatal Asphyxia in Rats. Neonatology 2018;114:355–361. (ISI- IF=2.8) <http://dx.doi.org/10.1159/000491383>.
3. **Sebastian Isac**, Anca Maria Panaitescu, Ana Spataru, Mara Iesanu, Alexandra Totan, Amalia Udriste, Natalia Cucu, Gheorghe Peltecu, Leon Zagrean, Ana-Maria Zagrean. Trans-resveratrol enriched maternal diet protects the immature hippocampus from perinatal asphyxia in rats. Neuroscience Letters 653 (2017) 308–313. (ISI- IF=2.2) <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.003>.

POSTERE LA CONGRESE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE

1. **Sebastian Isac**, Anca Maria Panaitescu, Ana Spataru, Mara Iesanu, Alexandra Totan, Gheorghe Peltecu, Leon Zagrean, Ana-Maria Zagrean. The preventive effect of trans-resveratrol supplemented maternal diet on the hippocampal damage after perinatal asphyxia in rats. Medical International Conference for Students, România, București, 2017.
2. **Sebastian Isac**, Mara Ieșanu, Anca Maria Panaitescu, Ana Spataru, Alexandra Totan, Amalia Udriste, Natalia Cucu, Gheorghe Peltecu, Leon Zagrean, Ana-Maria Zagrean. The neuroprotective effect of trans-resveratrol enriched maternal diet in immature hippocampus exposed to perinatal asphyxia. The 8th Conference of the National Neuroscience Society of Romania, București, 2017.

3. Ana-Maria Zagrean, Anca Maria Panaitescu, **Sebastian Isac**, Mihai Ceanga, Alexandru Paslaru, Mihai Stancu, Bogdan Pavel, Denise Carmen Mihaela Zahiu, Leon Zagrean, Mihai Moldovan. Neuroprotective effect of oxytocin during in vivo neonatal hypoxia/hypercapnia in rats. Physiology 2016- Joint Meeting of the American Physiological Society and the Physiological Society. Irland, Dublin, 2016

4. **Sebastian Isac**, Anca Maria Panaitescu, Nikos Zygaropoulos, Bogdan Pavel, Denise Carmen Zahiu, Gheorghe Peltecu, Leon Zăgrean, Ana-Maria Zăgrean. Mild and severe perinatal asphyxia- an experimental model in rat. The 6th Conference of the National Neuroscience Society of Romania, București, 2015.

PREZENTĂRI ORALE

1. Mara I. Iesanu, **Sebastian Isac**, Anca Maria Panaitescu, Artsiom Klimko, Alexandra Totan, Natalia Cucu, Leon Zagrean, Ana-Maria Zagrean. Citicoline supplemented maternal diet protects the offspring hippocampus in perinatal asphyxia in rat. The 9th Conference of the National Neuroscience Society of Romania, București, 2018

2. **Isac S.**, Panaitescu A., Udriste A., Cucu N., Totan A., Peltecu G., Zagrean L., Zagrean AM. A novel biochemical and epigenetic approach quantifying the hippocampus injury after perinatal asphyxia in rats. The 7th Conference of the National Neuroscience Society of Romania, București, 2016.

BURSE OBȚINUTE

1. Această lucrare doctorală a fost cofinanțată în cadrul Programului Operațional Sectorial pentru Program Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane (POS DRU), finanțat din Fondul Social European și Guvernul României prin contractul nr. POS DRU 187/1.5/S/156069.

INTRODUCERE

Encefalopatia hipoxic-ischemică (EHI) este o patologie neonatală complexă cu impact socio-economic important. Datorită recuperării incomplete în formele moderat-severe, strategiile de diagnostic și tratament inovativ precoce trebuie prioritizate. Conform statisticilor OMS, EHI este a doua cauză de mortalitate la nivel mondial la copiii cu vârsta sub 1 an. Din punct de vedere fiziopatologic, se produce o neuroliză accentuată secundară unei activări astrocito-microgliale exacerbate cu producția de citokine proinflamatorii, specii reactive de oxigen și mediatori variați implicați în necroza și/sau apoptoza neuronală.

Pe de altă parte, ritmul de viață alert al femeilor aflate la vârsta fertilă predispune la obiceiuri alimentare diverse, multe dintre ele, nesănătoase. Acestea ar putea agrava un potențial episod asfixic la naștere.

Principalul obiectiv al tezei de doctorat este de a evalua impactul nutriției materne în EHI. Dintre dietele materne studiate se numără: dieta grasă maternă (obicei alimentar frecvent întâlnit în zilele noastre), suplimentarea alimentară cu trans-resveratrol (polifenol cu acțiune antioxidantă puternică, întâlnit într-o gamă variată de produse alimentare) și suplimentarea maternă cu citicolină (precursor al lecitinei cu rol structural neuronal important). Influența lor asupra severității encefalopatiei hipoxic-ischemice se explică printr-o potențială transmitere și potențare *in utero* a moleculelor active din dietele materne respective.

Teza de doctorat își propune, în consecință, să evalueze felul în care dieta maternă modulează din punct de vedere biochimic răspunsul neuroinflamator hipocampic și gradul injuriei neuronale, influențează *in vitro* metabolismul hipocampic, modifică potențialul convulsiv imediat postexpunere și profilul cognitiv la maturitate, modulează la nivel epigenetic procese neuronale precum plasticitatea sinaptică, vulnerabilitatea la ischemie, neuroinflamația și maturarea dendritică.

Metodologia cercetării științifice a presupus două etape. O etapă antenatală și o etapă postnatală. În etapa antenatală s-au constituit patru loturi formate din femele șobolan rasa Wistar incluse în una din cele patru diete: dietă standard, nutriție grasă, dietă suplimentată cu trans-resveratrol și dietă suplimentată cu citicolină (CDP-colină). Dietele au fost continuate până la sacrificarea produșilor de concepție în diferitele etape de studiu.

Etapa postnatală a inclus formarea a cinci loturi de pui de șobolan Wistar, proveniți din femelele incluse anterior în dietele studiate respectiv expunerea acestora fie la normoxie (lot

control), fie la asfixie (pui a căror mame au primit dietă standard/ nutriție grasă/ trans-resveratrol/citicolină).

Ulterior în trei etape successive au fost evaluate clinic, biochimic și epigenetic modificările survenite în modelul experimental de encefalopatie hipoxic-ischemică secundare dietelor materne.

În prima etapă s-au dozat lactatul seric imediat și la 24 de ore postexpunere, concentrația hipocampică a citokinele proinflamatorii IL-1b și TNF α , la 24-48 de ore, respectiv a proteinei S-100B la 24 de ore postexpunere, marker al injuriei hipocampice (prin teste ELISA). Tot în această etapă, activitatea metabolică hipocampică *in vitro* a fost evaluată atât cantitativ cât și calitativ cu ajutorul testului la rezaurin respectiv cu ajutorul colorației tripan-blue.

În a doua etapă s-a evaluat la 24 de ore postexpunere, expresia hipocampică a miR124, miR132, miR134, miR146, miR15a, markeri epigenetici de control al unor procese neuronale de adaptare postasfixie prin qRT-PCR.

În a treia etapă a tezei de doctorat s-au evidențiat clinic, imediat postexpunere, activitatea convulsivă din EHI prin cuantificarea numărului pierderilor reflexului postural-loss of righting reflex (LRR), echivalent de criză convulsivă și la distanță, la maturitate, disfuncțiile cognitive modulate hipocampic precum: depresia, resemnarea, anxietatea, memoria lucrativă, memoria de scurtă și lungă durată, capacitatea motrică generală.

Caracterul interdisciplinar al tezei de doctorat este evidențiat de multiplele perspective diagnostice abordate precum și de potențialul translational important pe care lucrarea de față îl comportă. Subiectul de față este relevant pentru numeroase specialități medicale sau chirurgicale cum ar fi: neonatologie, ATI, obstetrică-ginecologie, neurologie pediatrică, medicină de recuperare, diabet și boli de nutriție.

Teza de doctorat este structurată în două părți: o parte generală și o parte specială.

Partea generală a tezei de doctorat include patru capitole. Primul capitol redă într-o manieră detaliată EHI ca entitate fiziopatologică. Sunt abordate în acest capitol informații referitoare la factori de risc, fiziopatologia bolii, tablou clinic, diagnostic paraclinic, stadializare în funcție de gradele de severitate, algoritmi diagnostici, aspecte histopatologice caracteristice, actualități referitoare la terapia intensivă specifică, perspective terapeutice.

Cel de-al doilea capitol oferă o imagine de ansamblu asupra necesarului nutrițional diferit în sarcină cu accent pe nutriția grasă maternă, trans-resveratrol, polifenol cu proprietăți antioxidante și citicolină, fosfolipid precursor al lecitinei implicat în structura membranelor neuronale.

În cel de-al treilea capitol al părții generale au fost abordate câteva aspecte generale referitoare la neuroembriologia comparată om-șobolan Wistar, dezvoltând neuroembriologia hipocampică, structură nervoasă cunoscută ca având o capacitate regenerativă aparte dar și neuroplasticitate importantă.

Cel de-al patrulea capitol al părții generale trece în revistă cele două mari modele experimentale de encefalopatie hipoxic-ischemică: modelul Vannucci și modelul Kaila și motivează alegerea modelului experimental de expunere din teza de doctorat luată în discuție aici.

Partea specială include cinci capitole originale care fac referire la ipoteza de lucru și obiectivele generale, metodologia generală a cercetării științifice care include și detalii cu privire la prelucrarea statistică precum și la trei părți experimentale care abordează pe rând cele trei perspective de cercetare luate în discuție: clinică, biochimică și epigenetică.

Fiecare parte experimentală este compusă dintr-o scurtă introducere, materiale și metode specifice, rezultate, discuții și concluzii de etapă.

În final sunt structurate concluziile tezei de doctorat. Au fost precizate obiectivele confirmate dar și ipotezele infirmate. Au fost evidențiate contribuțiile proprii dar și rezultatele concordante cu literatura de specialitate. S-a accentuat potențialul translational al subiectului cercetat aici.

Au fost evidențiate o serie de limitări ale tezei de doctorat cu accent pe direcțiile viitoare de cercetare. Necesarul unor studii clinice de confirmare a rezultatelor obținute în condițiile experimentale date a fost invocat în această parte.

PARTEA SPECIALĂ

Ipoteză de lucru și obiective generale

Asfixia perinatală este o condiție clinică variabilă ca severitate și durată cu afectare multisistemică, având un deosebit impact psihoemoțional și social.

Sistemul nervos central este unul din cele mai vulnerabile organe expuse la asfixia perinatală. Din acest motiv, lucrarea științifică de față își propune evidențierea unor potențiale corelații între dieta maternă peripartum și gradul deficitului neurologic fetal postpartum în urma unei suferințe asfixice la naștere. În studiul de față s-a apreciat din punct de vedere clinic și comportamental, biochimic și epigenetic pe un model animal de EHI, gradul disfuncției neuronale secundare asfixiei perinatale, luând în calcul dieta maternă.

Din punct de vedere clinic s-a realizat o apreciere obiectivă imediată a activității convulsive și tardivă (la maturitate) prin teste de comportament specifice. Din punct de vedere biochimic s-a evaluat activitatea metabolică celulară hipocampică, gradul neuroinflamației și a injuriei neuronale postexpunere. Din punct de vedere epigenetic s-a realizat un profil epigenetic specific în EHI și s-a observat variația lui în funcție de condițiile dietetice maternelor studiate.

Principalele obiective ale studiului de față sunt:

- Confirmarea viabilității modelului animal de asfixie perinatală.
- Evidențierea unor modificări clinice, biochimice și epigenetice într-un model animal de EHI.
- Evidențierea influenței negative, aditive a nutriției grase maternelor peripartum asupra produsului de concepție care suferă de EHI.
- Stabilirea unui potențial efect benefic al trans-resveratrolului administrat matern asupra evoluției EHI.
- Verificarea unui potențial efect benefic al suplimentării dietei maternelor cu citicolină asupra EHI.

Metodologia generală a cercetării științifice

Studiul de față include o etapă antenatală și o etapă postnatală.

Etapa antenatală presupune expunerea femelelor la dietele studiate: nutriție grasă, dietă suplimentată cu trans-resveratrol și dietă suplimentată cu citicolină. Etapa postnatală implică testări clinice (imEDIATE), comportamentale (la distanță), biochimice și epigenetice ale produșilor de concepție.

Cronologia studiului experimental propus este redată rezumativ în fig.1.

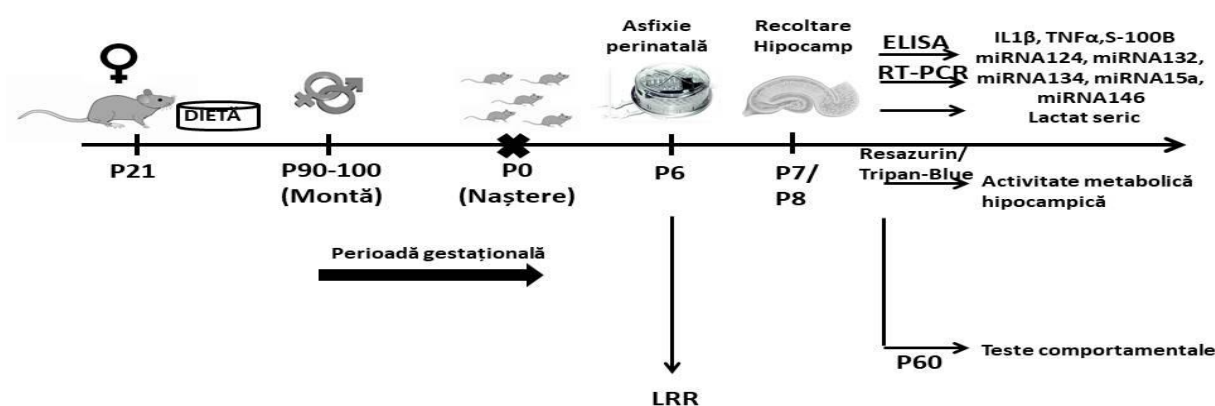


Fig.1 Desfășurarea cronologică a activității experimentale. P= ziua postnatal, LRR= loss of righting reflexes

Un număr total de 25 de femele, cu vârste cuprinse între 21 și 30 de zile au fost împărțite, după înțarcare, în 4 loturi în funcție de dieta aplicată după cum urmează:

1. lot cu dietă standard- 15% proteine, 15% lipide și 50% glucide (n=10)
2. lot cu dietă grasă-15% proteine, 50% lipide, 15% glucide (n=5)
3. lot cu dietă suplimentată cu 50mg/kgc/zi tRESV dizolvat în 0.5% DMSO (dimetil sulfoxid) (n=5)
4. lot cu dietă suplimentată cu 200 mg/kgc/zi citicolină în apă. (n=5)

Dietele respective au fost inițiate la femele în ziua 21-30 postpartum și administrate p.o. Mâncarea și apa au fost oferite *ad libitum* păstrând condițiile standard de temperatură și

umiditate. De asemenea, s-a menținut ritmul circadian alternând 12 ore lumină cu 12 ore întuneric. Când au ajuns la maturitate (ziua 90-100 postnatal) femelele au fost împerecheate iar produșii de concepție au constituit în ziua 6 postnatal loturile propriu-zise de studiu.

Dietele au continuat până la sacrificarea puilor acestora (ziua 7 sau 8 postnatal) conform protocolului. S-a înregistrat decesul unei femele din lotul cu dietă grasă.

Puii de șobolan Wistar ce au constituit loturile de studiu au fost expuși în ziua 6 postnatal fie normoxiei, fie asfixiei (9% O₂ și 20% CO₂ în N₂) pentru o perioadă de 90 de minute într-o cameră izolată în condiții standard de temperatură.

Loturile formate din pui de șobolan Wistar în ziua 6 postnatal, femele și masculi, sunt după cum urmează:

1. Lot control (n=46) format din pui, ziua 6 postnatal, ale căror mame au primit nutriție standard și care au fost expuși normoxiei. (C)
2. Lot asfixie (n=46) format din pui, ziua 6 postnatal, ale căror mame au primit nutriție standard și care au fost expuși asfixiei. (A)
3. Lot nutriție grasă (n=36) format din pui, ziua 6 postnatal, ale căror mame au primit nutriție grasă și care au fost expuși asfixiei. (A-HFD)
4. Lot tRESV (n=36) format din pui, ziua 6 postnatal, ale căror mame au primit tRESV 50mg/kgc/zi dizolvat în 0.5% DMSO p.o. din ziua 21 postnatal până la sacrificarea puilor acestora și care au fost expuși asfixiei. (A-tRESV)
5. Lot citicolină (n=36) format din pui, ziua 6 postnatal, ale căror mame au primit 200mg/kgc/zi citicolină p.o. din ziua 21 postnatal până la sacrificarea puilor acestora și care au fost expuși asfixiei. (A-CDP)

Ulterior, cronologic, animalele de experiență au fost supuse următoarelor teste clinice și paraclinice:

- Imediat postexpunere- evaluarea activității convulsive (LRR) și a lactatului seric.
- La 24 de ore postexpunere- evaluare biochimică prin teste ELISA (IL-1b, TNF α , S-100B), de metabolism hipocampic (testul la resazurină, colorația cu tripan-blue), epigenetică prin qRT-PCR (miR124, miR132, miR134, miR15a, miR146) precum și dozarea lactatului seric.

- La 48 de ore postexpunere- evaluare biochimică.
- La 60 de zile postexpunere (maturitate)- evaluare comportamentală prin teste specifice: OFT (eng. Open Field Test), NORT (eng. Novel Object Recognition Test), T-Maze Test, FST (eng. Forced Swimming Test)

Impactul dietei materne în encefalopatia hipoxic-ischemică- abordare biochimică

Din punct de vedere biochimic, EHI poate fi cuantificată imediat postinjurie prin aprecierea magnitudinii neuroinflamației, a injuriei neuronale și a metabolismului hipocampic. Aceste determinări imediate au rol prognostic dar și de apreciere a severității expunerii asfixice.

O potențială creștere concomitentă a citokinelor proinflamatorii, IL-1b și TNF α , și a proteinei S-100B, ca marker biochimic de injurie neuronală ar explica eventualitatea unui proces intens de neuroliză specific EHI (Batlle, et al., 2015).

Suplimentar, lactatul seric este un marker facil, utilizat în clinică, de apreciere globală a gradului disfuncției multisistemice postasfixie perinatală, corelându-se cu severitatea episodului respectiv (Saugstad, 2002).

Rezultate

Lactatul seric în loturile C și A determinat imediat postexpunere și la 24 de ore postexpunere este redat în fig.2. Imediat postexpunere, se observă o creștere semnificativă statistic în lotul A comparativ cu lotul C (1.15 ± 0.08 vs. 0.56 ± 0.03 , $p < 0.0001$).

Diferența între loturile A și C se observă și la 24 de ore postexpunere, ea devenind și mai mare. (1.61 ± 0.137 vs. 0.336 ± 0.001 , $p = 0.0002$)

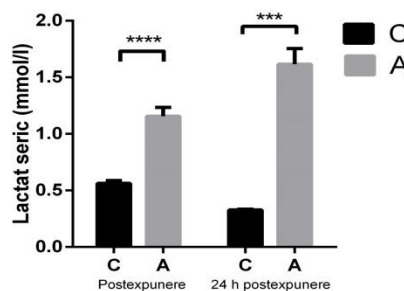


Fig.2. Lactatul seric în loturile C și A imediat și la 24 de ore postexpunere

Concentrația hipocampică a IL-1b, 24 de ore postexpunere, exprimată în pg/mg proteină totală este redată în fig.3. Se observă o creștere semnificativă statistic a nivelului hipocampic de IL-1b comparativ cu lotul control (49.86 ± 10.3 vs. 24.43 ± 5.14 , $p < 0.0001$). De asemenea, dieta grasă maternă asociată asfîxiei perinatale crește nivelul IL-1b comparativ cu asfîxia perinatală asociată dietei materne standard (69.59 ± 11.32 vs. 49.86 ± 10.3 , $p = 0.0002$).

Se observă, suplimentar, o scădere semnificativă statistic a IL-1b hipocampic în lotul A-tRESV comparativ cu lotul A (24.53 ± 3.74 vs. 49.86 ± 10.3 , $p < 0.0001$). Și în lotul A-CDP s-a observat o scădere a concentrației IL-1b comparativ cu lotul A (38.8 ± 1.93 vs. 49.86 ± 10.3 , $p = 0.02$).

Nivelul hipocampic al IL-1b, 48 de ore postexpunere în loturile studiate este redat în fig.4. S-a obținut o creștere semnificativă statistic postasfîxie perinatală comparativ cu lotul C (47.83 ± 5.42 vs. 24.73 ± 2.9 , $p = 0.002$). De asemenea, se observă o creștere suplimentară și susținută și la 48 de ore a concentrației hipocampice de IL-1b în lotul A-HFD comparativ cu lotul A (57.15 ± 1.52 vs. 47.83 ± 5.42 , $p = 0.003$).

Nivelul IL-1b se menține scăzut în lotul A-tRESV comparativ cu lotul A și la 48 de ore postexpunere (32.74 ± 3.63 vs. 47.83 ± 5.42 , $p = 0.0017$). Nu s-a observat o diferență semnificativă statistică a IL-1b hipocampic la 48 de ore postexpunere între loturile A-CDP și A (50.92 ± 0.93 vs. 47.83 ± 5.42 , $p = \text{NS}$).

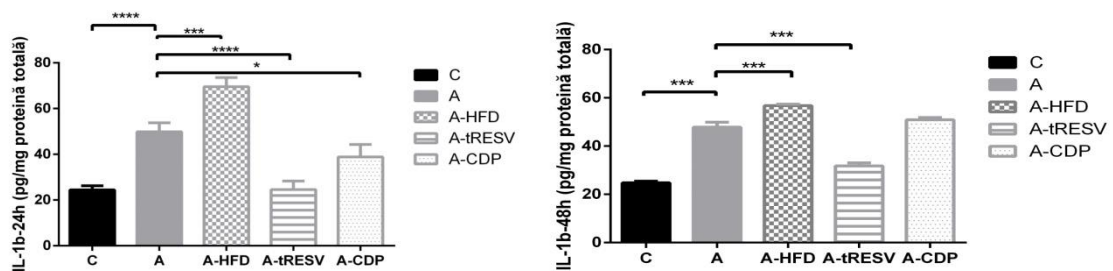


Fig.3 (stânga) Concentrația hipocampică a IL-1b la 24 h postexpunere perinatală. C= lot control, A= lot asfîxie, A-HFD= lot asfîxie cu dietă grasă maternă, A-CDP= lot asfîxie cu citicolină maternă, A-tRESV= lot asfîxie cu trans-resveratrol matern

Fig.4 (dreapta) Concentrația hipocampică a IL-1b la 48 de ore postexpunere

Nivelul hipocampic al TNF α la 24 de ore postexpunere, exprimat în pg/mg proteină totală, în loturile de studiu este ilustrat în fig.5. Se observă o creștere semnificativă statistic post asfîxie perinatală comparativ cu lotul C (136.47 ± 22.4 vs. 113.55 ± 19.76 , $p = 0.03$). De

asemenea, nivelul hipocampic al TNF α la 24 de ore postexpunere este mai mare în lotul A-HFD față de lotul A (189.1 \pm 23.85 vs. 136.47 \pm 22.4, p<0.0001).

Concentrații mai mici s-au obținut atât în lotul A-tRESV comparativ cu lotul A (105.6 \pm 3.45 vs. 136.47 \pm 22.4, p=0.015) cât și în lotul A-CDP față de lotul A (110.1 \pm 10.26 vs. 136.47 \pm 22.4, p=0.012).

Nivelul hipocampic al TNF α la 48 de ore postexpunere este ilustrat în fig.6. Se poate observa o creștere semnificativă statistic în lotul A comparativ cu lotul C (131.74 \pm 6.47 vs. 105.86 \pm 2.8, p<0.0001). În lotul A-HFD s-a remarcat o creștere a TNF α hipocampic la 48 de ore postexpunere comparativ cu lotul A, fără semnificație statistică însă. (139.3 \pm 12.01 vs. 131.74 \pm 6.47, p=NS).

O scădere semnificativă statistic s-a obținut în lotul A-tRESV față de lotul A (116.06 \pm 6.87 vs. 131.74 \pm 6.47, p=0.005). În lotul A-CDP, diferența nu a fost semnificativă statistic (138.1 \pm 8.72 vs. 131.74 \pm 6.47, p=NS).

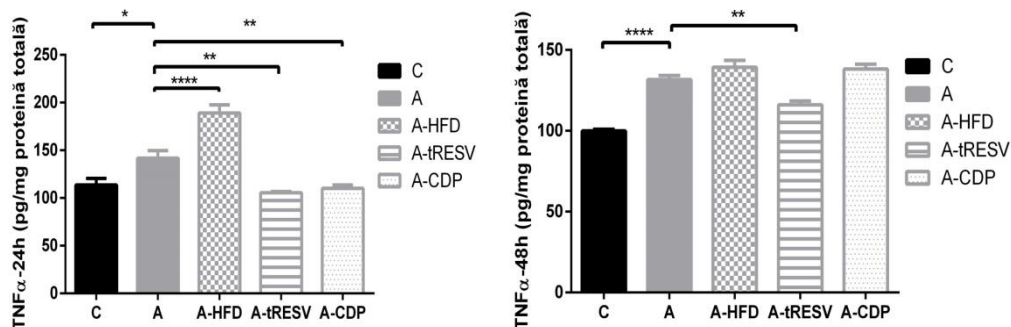


Fig.5 (stânga) Nivelul hipocampic al TNF α la 24 de ore postexpunere

Fig.6 (dreapta) Nivelul hipocampic al TNF α la 48 de ore postexpunere

Nivelul proteinei S-100B din supernatantul hipocampic, recoltat la 24 de ore postexpunere, exprimat în pg/mg proteină totală este redat în fig.7. S-a observat o creștere semnificativă statistic post asfixie (lot A) față de control (lot C) (492.53 \pm 98.48 vs. 185.63 \pm 21.64, p<0.0001). De asemenea, nivelul hipocampic al S-100B la 24 de ore post asfixie perinatală a fost mai mare în lotul A-HFD față de lotul A (615.73 \pm 67.26 vs. 492.53 \pm 98.48, p=0.02).

În lotul A-tRESV s-a remarcat o scădere semnificativă statistic a proteinei S-100B față de lotul A (228 \pm 23.28 vs. 492.53 \pm 98.48, p<0.0001). O tendință de scădere a valorii

hipocampice a proteinei S-100B la 24 de ore postasfixie perinatală s-a observat și în cazul lotului A-CDP comparativ cu lotul A, însă fără semnificație statistică (414.8 ± 13.88 vs. 492.53 ± 98.48).

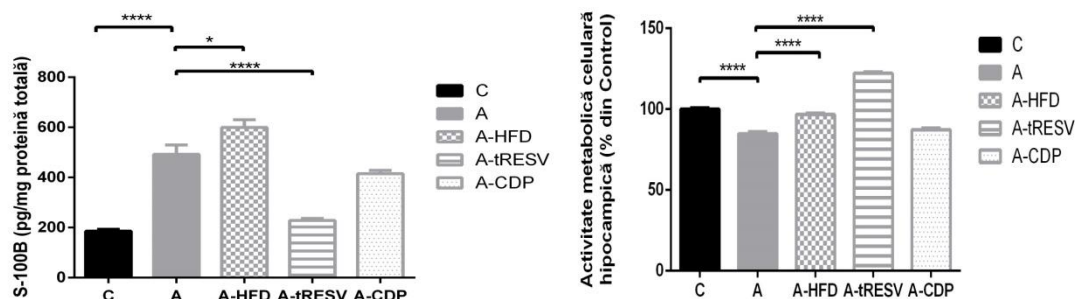


Fig.7 (stânga) Nivelul hipocampic al proteinei S-100B la 24 de ore postexpunere

Fig.8 (dreapta) Activitatea metabolică celulară (test la rezazurină)

Activitatea metabolică celulară este redată în fig.8 și este raportată în procente relativ la control. S-a observat o scădere semnificativă statistic a activității metabolice hipocampice în lotul A relativ la C ($84.76\% \pm 1.33\%$, $p < 0.0001$). De asemenea, s-a observat o creștere ușoară în lotul A-HFD comparativ cu lotul A ($96.64\% \pm 0.88\%$ vs. $84.76\% \pm 1.33\%$, $p < 0.0001$).

Lotul A-tRESV a cunoscut o creștere a activității metabolice față de lotul A ($122.2\% \pm 0.89\%$ vs. $84.76\% \pm 1.33\%$, $p < 0.0001$). Activitatea metabolică în lotul A-CDP nu a variat comparativ cu lotul A ($87.35\% \pm 0.88$ vs. $84.76\% \pm 1.33\%$, $p = \text{NS}$).

În colorația tripan-blue se observă o populație celulară viabilă crescută în lotul C comparativ cu lotul A, evidențiată printr-un număr scăzut de nucleu mici, picnotici, precum și printr-o încorporare mai scăzută a colorantului intracelular. (Fig.8-9)

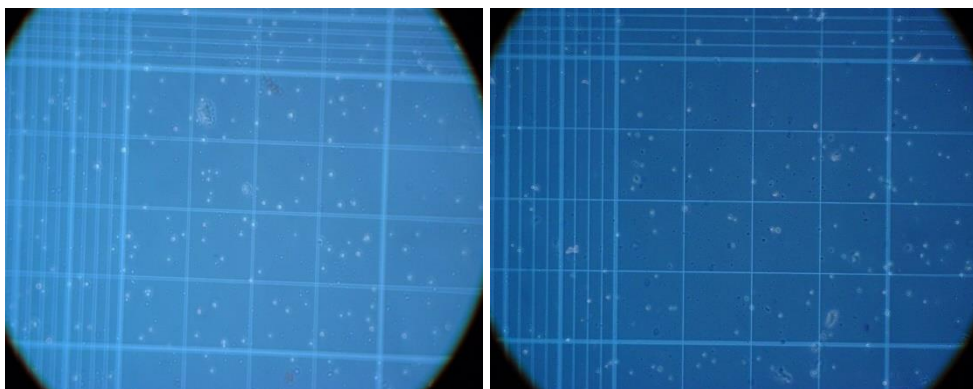


Fig.8 (stânga) Aspectul în microscopie optică a populației celulare hipocampice în lotul C în colorația cu tripan-blue.

Fig.9 (dreapta) Aspectul în microscopie optică a populației celulare hipocampice în lotul A în colorația tripan-blue.

Nu se observă însă o modificare calitativă decelabilă în microscopie optică între loturile A-HFD și lotul A. Lotul A-HFD prezintă, totuși, mai multe elemente specifice apoptozei celulare (nuclei mici, picnotici, colorant păstrat intracitoplasmatic) comparativ cu lotul C. (Fig.8-10)

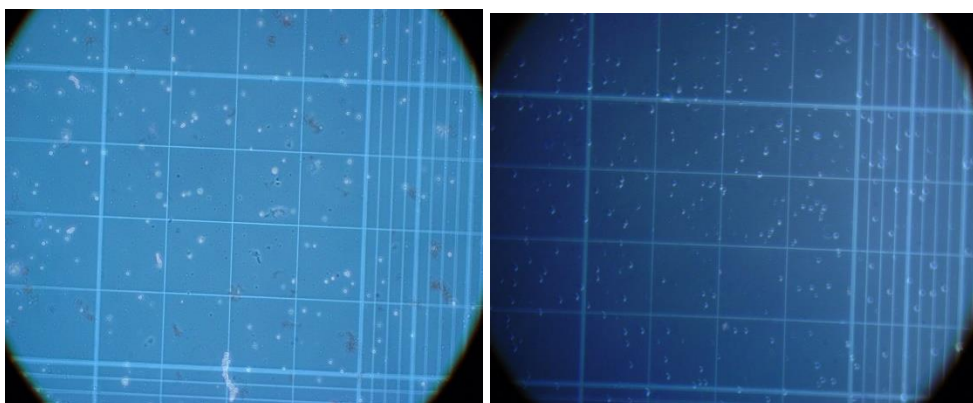


Fig.10 (stânga) Aspectul în microscopie optică a populației celulare hipocampice în lotul A-HFD în colorația tripan-blue.

Fig.11 (dreapta) Aspectul în microscopie optică a populației celulare hipocampice în lotul A-tRESV în colorația tripan-blue

În lotul A-tRESV se observă în microscopie optică o populație celulară a cărei viabilitate este echivalentă cu cea din lotul C și crescută față de lotul A. (Fig.8-9 și Fig.11)

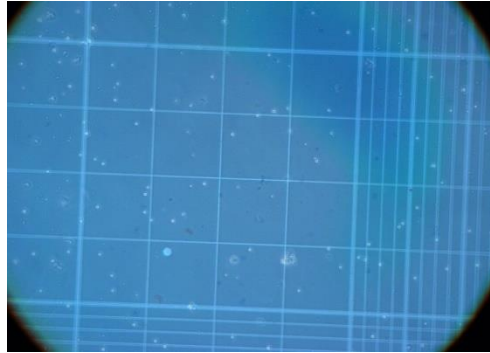


Fig.12 Aspectul în microscopie optică a populației celulare hipocampice în lotul A-CDP

În lotul A-CDP se observă în microscopie optică, în ansamblu, o populație celulară viabilă diminuată numeric față de loturile C și A care prezintă, însă, mai puține elemente specifice apoptozei celulare (nuclei mici, picnotici, colorant încorporat intracitoplasmatic) comparativ cu lotul A. (Fig.8-9 și Fig.12)

Impactul dietei materne în encefalopatia hipoxic-ischemică- abordare epigenetică

Epigenetica se referă la modificarea genomică a potențialului posttranscripțional dar și la alterarea posttranslațională a proteinelor-țintă, rezultând o relaționare intercelulară defectuoasă în context patologic. Aceasta are originea la nivel genomic, fără a modifica însă nici structura lanțului polipeptidic și nici a secvenței nucleotidice (Waddington, 1942). Modificările survenite pot modifica însă structura terțiară a proteinelor histonice, potențialul transcripțional al unei gene precum și structura terțiară a moleculei ADN (Handy, et al., 2011).

Percepția actuală asupra epigeneticii implică următoarele procese: metilare/demetilare, acetilare/deacetilare a ADN care conduc la modificarea structurii terțiare cromatinice, metilare/demetilare, acetilare/deacetilare a proteinelor histonice care cauzează fluctuații ale legăturilor histonă-ADN și sinteza citoplasmatică a unor acizi nucleici monocatenari non-codificanți cu o lungime de 2-20 baze, numiți microARN (miRNA), care modulează gradul translațional al proteinei în curs de sintetizare, la nivel ribozomal.

Rezultate

Variația miR124 hipocampic relativ la lotul Control este ilustrată în fig.13. Se observă în lotul A o scădere a expresiei relative a miR124, $36.57\% \pm 3.24\%$ ($p=0.0002$). De asemenea,

lotul A-HFD prezintă o expresie relativă de $110\% \pm 10.19\%$, fiind o creștere semnificativă statistic comparativ cu lotul A ($p=0.002$).

Suplimentar, se observă o subexpresie a miR124 în lotul A-tRESV- $39.35\% \pm 3.49\%$ - fără a exista o variație semnificativă statistic față de lotul A ($p=NS$). Pe de altă parte, s-a obținut o supraexpresie a miR124 în lotul A-CDP, $134\% \pm 11.92\%$ semnificativă statistic față de lotul A ($p=0.001$).

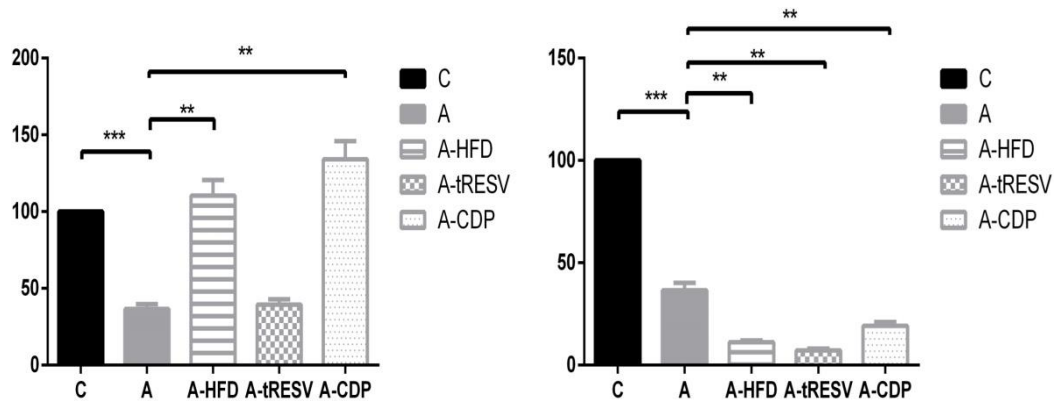


Fig.13 (stânga) Expresia hipocampică a miR124 raportată la lotul Control în %

Fig.14 (dreapta) Expresia hipocampică a miR132 raportată la lotul Control în %

În ceea ce privește variația expresiei relative a concentrației hipocampice a miR132 între loturile studiate, rezultatele sunt redate în fig.14. Se observă o scădere semnificativă statistic în lotul A ($36.52\% \pm 3.68\%$, $p=0.0003$). De asemenea, în lotul A-HFD s-a remarcat o subexpresie suplimentară- $11.23\% \pm 0.81$ - care este semnificativă statistic comparativ cu lotul A ($p=0.004$).

În lotul A-tRESV se observă o scădere a expresiei relative hipocampice miR132- $7.27\% \pm 0.85\%$ - care este, de asemenea, semnificativă statistic față de lotul A ($p=0.002$). Rezultate similare s-au obținut și în cazul lotului A-CDP- scădere a expresiei relative a miR132, față de lotul A ($19.14\% \pm 1.96$, $p=0.002$).

Expresia hipocampică relativă a miR134 în loturile studiate este relevată în fig.15. Se remarcă o subexpresie în lotul A relativ la lotul C ($28.63\% \pm 2.2\%$, $p<0.0001$). Suplimentar, în lotul A-HFD se observă o creștere a expresiei relative a miR134 comparativ cu lotul A ($69.78\% \pm 5.32\%$, $p=0.0009$).

În lotul A-tRESV, scăderea expresiei hipocampice a miR134, nu este semnificativă statistic față de lotul A ($20.08\% \pm 1.55\%$, $p=NS$). Pe de altă parte, însă, în lotul A-CDP expresia relativă a miR134 este semnificativ crescută față de lotul A ($83.7\% \pm 6.44$, $p=0.001$).

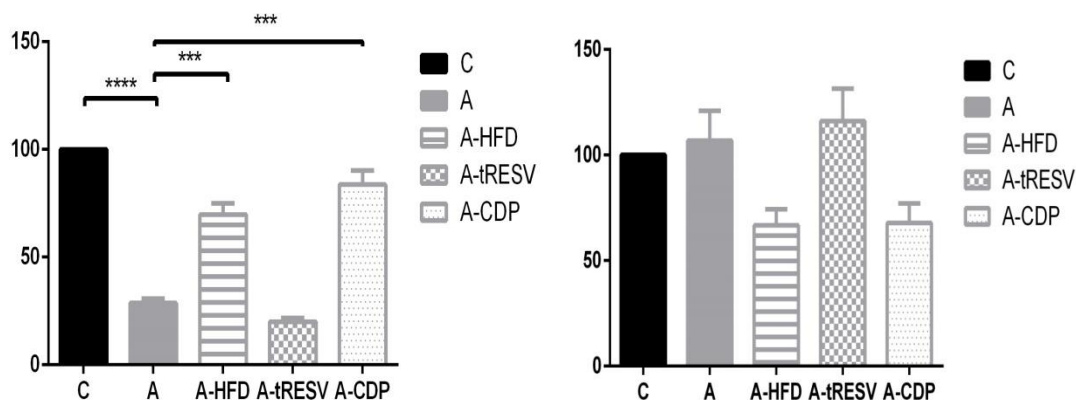


Fig.15 (stânga) Expresia hipocampică a miR134 relativ la lotul Control în %

Fig.16 (dreapta) Expresia hipocampică a miR146 relativ la lotul Control în %

Expresia hipocampică a miR146 în loturile studiate este ilustrată în fig.16. S-a obținut o creștere ușoară a expresiei sale în lotul A relativ la lotul C, fără semnificație statistică ($106.8\% \pm 14.17\%$, $p=NS$). În lotul A-HFD se observă a scădere a expresiei relative comparativ cu lotul A, fără semnificație statistică ($66.67\% \pm 7.65\%$, $p=NS$).

Lotul A-tRESV a prezentat o tendință la supraexprimare a miR146, nesemnificativă statistic însă ($116.1\% \pm 15.41\%$, $p=NS$). Pe de altă parte, lotul A-CDP a prezentat o tendință la scădere a expresiei relative a miR146, de asemenea, fără semnificație statistică ($67.83\% \pm 9.21\%$, $p=NS$).

Concentrația hipocampică a miR15a raportată relativ la lotul C este redată în figura 17. În lotul A nu s-a obținut o variație a expresiei relative a miR15a ($98.92\% \pm 12.12\%$, $p=NS$). S-a observat însă o supraexprimare relativă a miR15a în lotul A-HFD comparativ cu lotul A ($160.0\% \pm 19.69\%$, $p=0.006$).

Loturile A-tRESV și A-CDP s-au remarcat ambele print-o scădere a expresiilor relative comparativ cu lotul A, $18.56\% \pm 2.25\%$ ($p=0.0058$) respectiv $56.01\% \pm 6.84\%$ ($p=0.0059$).

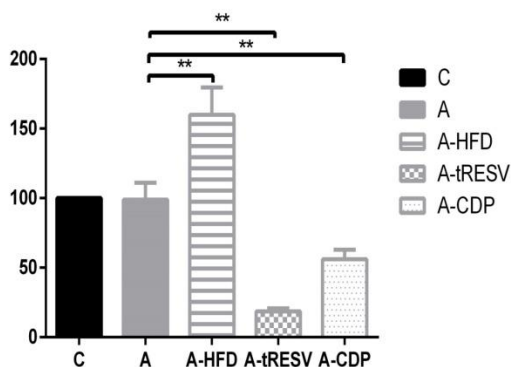


Fig.17 Expresia hipocampică a miR15a relativ la lotul Control în %

Impactul dietei materne în encefalopatia hipoxic-ischemică- abordare clinică și comportamentală

Testul de apreciere imediată a activității convulsive postexpunere este LRR. Această corelație a fost făcută de (Helmy, et al., 2011), care a descris echivalentul de crize convulsive la șobolan post asfixie perinatală.

Aprecierea dificultăților comportamentale tardive în EHI, s-a efectuat cu ajutorul testelor: OFT (eng. Open Field-Test), NORT (eng. Novel Object Recognition Test), T-Maze (eng. T-Maze), FST (eng. Forced Swimming Test).

În testul OFT pot fi puse în evidență simultan activitatea locomotorie, exploratorie și nivelul de anxietate ale animalului de experiență (Walsh & Cummins, 1976). Prin măsurarea timpului total petrecut în centrul perimetrului se evidențiază caracterul explorator dar și prezența anxietății: cu cât subiectul petrece un timp mai îndelungat în centrul arenei cu atât el este mai defensiv, anxios și neinteresat de explorarea mediului înconjurător (Carrey, et al., 2000). Suplimentar, având aceeași semnificație clinică, a fost cuantificată și distanța totală parcursă în arenă în sesiunea de testare. Cu cât animalul de experiență parcurge o distanță mai mare în timpul alocat testării, cu atât caracterul explorator al său este mai dezvoltat și gradul de anxietate mai scăzut.

În vederea evaluării memoriei de scurtă și lungă durată, s-a folosit testul NORT în cele două variante:

- sesiunea de testare la 5 minute după finalizarea sesiunii de familiarizare (memoria de scurtă durată)

- sesiunea de testare la 24 de ore de la finalizarea sesiunii de familiarizare (memoria de lungă durată).

Este un test robust și sensibil care evaluează procese cognitive (memoria de scurtă și lungă durată) modulate hipocampic (Ennaceur & Delacour , 1988). Tendința animalelor de experiență la expunerea lor într-un mediu nou, cu obiecte cunoscute și noi este de a explora preponderent obiecte cu care nu au mai intrat în contact, ignorându-le pe cele cu care au mai avut experiențe anterioare, în absența oricărui alt stimul extern. Pentru aceasta e nevoie de o memorie intactă, care să înmagazineze experiențele anterioare avute cu obiectul familiar, făcându-l astfel neinteresant. În diferitele sale variante, poate fi aplicat și pentru a aprecia memoria lucrativă, gradul de anxietate, capacitatea locomotorie (Silvers , et al., 2007). Studiul de față s-a axat pe evaluarea memoriei de scurtă și lungă durată.

În ceea ce privește memoria lucrativă, testul alternării brațelor sau T-Maze Test este sugestiv (Honig, 1978) (Olton , et al., 1979). Se bazează pe principiul că un animal de experiență în căutarea hranei va avea nevoie de cel mai scurt timp posibil pentru a o găsi. Într-o arenă în forma literei T, șobolanul a fost plasat în brațul central. În mod natural, șobolanul explorator va avansa de-a lungul brațului central în căutarea hranei. Ajuns la capătul acestuia, el explorează ulterior unul din cele două brațe, în mod aleator. Dacă aici el nu găsește mâncare, la o nouă testare el avansează în mod natural, de-a lungul brațului central și apoi în celălalt braț lateral, pentru că el "reține" că în brațul anterior explorat nu a găsit mâncarea. În acest fel, animalul de experiență cu o memorie lucrativă optimă alternează cele două brațe. Dacă cele două brațe nu sunt alternate în două sesiuni succesive, atunci există o disfuncționalitate a memoriei lucrative.

Proba de înot forțat reprezintă un stres major pentru animalul de experiență. Prin plasarea sa într-un cilindru plin cu apă, fără posibilitate de evadare, acesta înoată și se cațără continuu pentru a supraviețui (Yankelevitch-Yahav, et al., 2015). Datorită însă epuizării fizice și a resemnării, această activitate motrică intensă alternează cu perioade de imobilitate sau de mișcări minime de susținere a patenței narinelor pentru aerul atmosferic. Acest comportament în contextul unui stres sever este considerat echivalentul unui comportament depresiv (Porsolt , et al., 1977).

Rezultate

Numărul mediu al pierderilor reflexului postural timp de două ore postexpunere în loturile studiate este redat în fig.18. S-a observat o creștere semnificativă statistic în lotul A (roșu) față de lotul C (albastru) (49 ± 12.68 vs. 15.17 ± 2.97 , $p=0.003$). În lotul A-HFD (verde) nu s-a observat o variație semnificativă comparativ cu lotul A (roșu) (31.75 ± 3.59 vs. 49 ± 12.68 , $p=NS$).

Suplimentar, s-a obținut în lotul A-tRESV (mov) o scădere a numărului pierderilor reflexului postural comparativ cu lotul A (roșu) (12.5 ± 2.88 vs. 49 ± 12.68 , $p=0.004$). Pe de altă parte nu au fost diferențe semnificative statistic între loturile A-CDP (bleu) și A (albastru) (45.67 ± 2.93 vs. 49 ± 12.68 , $p=NS$).

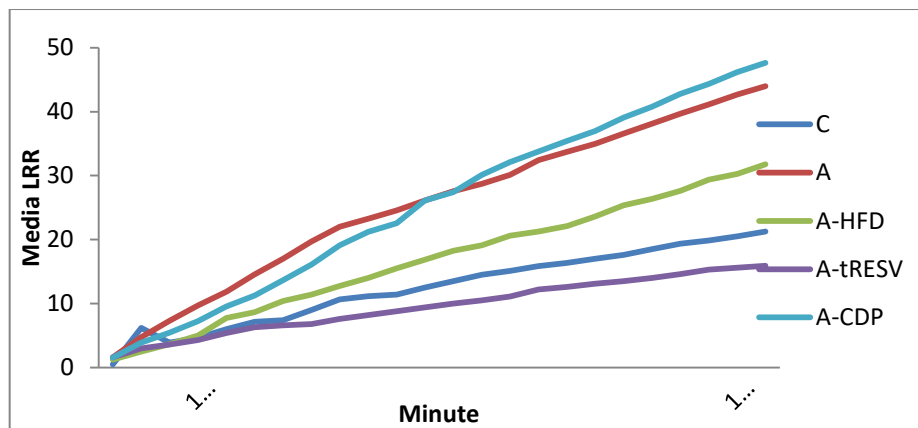


Fig.18 Variația numărului mediu al pierderilor reflexului postural în timp/grup. Înregistrare efectuată pe o perioadă de 2 ore postasfixie.

La testul în câmp deschis (OFT) au fost evaluate timpul total petrecut în aria centrală și distanța totală parcursă în sesiunea de testare. Timpul total petrecut în aria centrală în loturile studiate este redat în Fig.19. Nu a existat o diferență semnificativă statistic între loturile C și A, în ceea ce privește timpul total petrecut în aria centrală (8.45 ± 2.71 vs. 3.37 ± 1.08 , $p=NS$). Se observă, de asemenea, o tendință de creștere a timpului petrecut în aria centrală în lotul A-HFD comparativ cu lotul A (15.25 ± 7.12 vs. 3.37 ± 1.08 , $p=NS$). Nici în cazul loturilor A-tRESV și A-CDP nu s-a observat o diferență semnificativă statistic față de lotul A. În cazul lotului A-tRESV s-a observat un timp total de 5.59 ± 1.87 față de lotul A, 3.37 ± 1.08 ($p=NS$) iar în lotul A-CDP, 9.78 ± 4.01 față de lotul A, 3.37 ± 1.08 ($p=NS$).

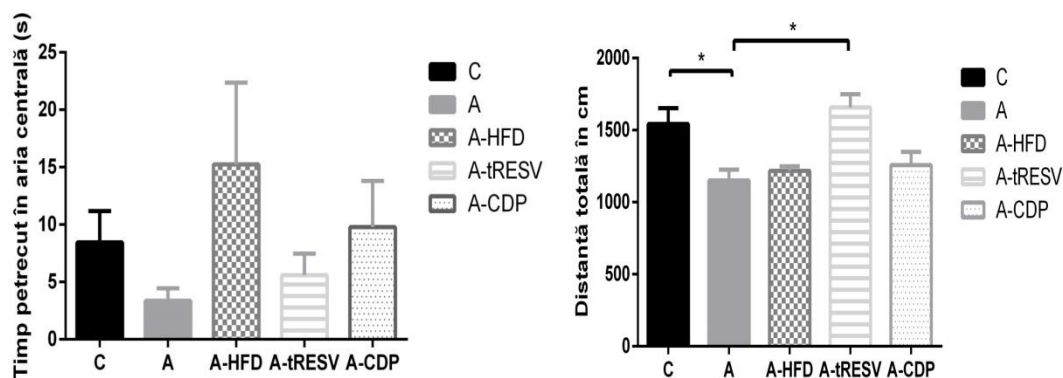


Fig.19 (stânga) Timpul total petrecut în aria centrală la testul OFT

Fig.20 (dreapta) Distanța totală medie în cm parcursă în cadrul testului OFT

Distanța totală medie exprimată în cm, parcursă în arena de testare în testul OFT între diferitele loturi studiate este ilustrată în figura 20. S-a decelat o scădere semnificativă statistic în lotul A comparativ cu lotul C (1150 ± 152.8 vs. 1542 ± 110.7 , $p=0.05$). Nu s-a înregistrat o diferență semnificativă statistic între loturile A-HFD și lotul A (1217 ± 32.11 vs. 1150 ± 152.8 , $p=NS$).

Suplimentar, însă, în lotul A-tRESV s-a remarcat o creștere semnificativă statistic a distanței totale parcurse față de lotul A (1657 ± 91.75 vs. 1150 ± 152.8 , $p=0.013$). Pe de altă parte, nu s-a evidențiat o diferență semnificativă statistic între loturile A-CDP și A (1258 ± 91.8 vs. 1150 ± 152.8 , $p=NS$).

Testul recunoașterii obiectului nou a fost evaluat cu ajutorul indicelui de discriminare. Pentru recunoașterea imediată (memoria de scurtă durată), datele sunt reprezentate în figura 21. Se observă o tendință de negativare a indicelui de discriminare în lotul A comparativ cu lotul C, fără a fi semnificativ statistic (-0.147 ± 0.14 vs. 0.02 ± 0.19 , $p=NS$). În cazul lotului A-HFD nu s-a remarcat o diferență față de lotul A (0.035 ± 0.3 vs. -0.147 ± 0.14 , $p=NS$).

Fără semnificație statistică au fost și valorile medii obținute între loturile A-tRESV și A-CDP comparativ cu lotul A- -0.03 ± 0.122 vs. -0.147 ± 0.14 , $p=NS$ respectiv 0.24 ± 0.23 vs. -0.147 ± 0.14 , $p=NS$.

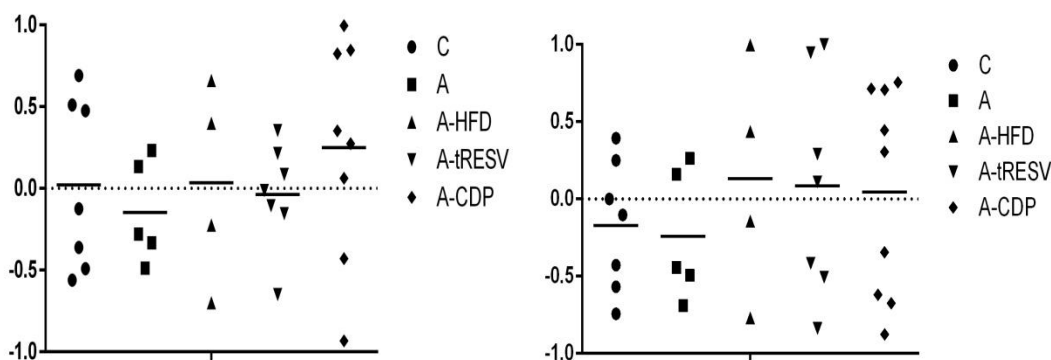


Fig.21 (stânga) Media indicilor de discriminare la testul NORTS

Fig.22 (dreapta) Media indicilor de discriminare la testul NORTL

Rezultatele indicelui de discriminare în cazul recunoașterii tardive a obiectului nou (NORTL) sunt reprezentate în figura 22. Nu a existat o diferență semnificativă statistic între loturile A și C (-0.24 ± 0.19 vs. -0.17 ± 0.16 , $p=NS$). De asemenea, indicele de discriminare nu a variat nici între loturile A-HFD și A (0.13 ± 0.38 vs. -0.24 ± 0.19 , $p=NS$).

Nu s-au înregistrat diferențe semnificative statistic nici comparând lotul A-tRESV cu lotul A (0.08 ± 0.27 vs. -0.24 ± 0.19 , $p=NS$) nici lotul A-CDP cu lotul A (0.04 ± 0.22 vs. -0.24 ± 0.19 , $p=NS$).

Proporția alternării celor două brațe la testul T-Maze este ilustrată în fig.23. Se observă o scădere a procentului alternării cu succes a celor două brațe a arenei în T în cazul testului T-Maze în lotul A comparativ cu lotul C (78% vs 40%, $p<0.0001$). De asemenea, se observă o creștere a ratei de succes în lotul A-HFD comparativ cu lotul A (62% vs 40%, $p=0.003$).

În lotul A-tRESV se remarcă o creștere a ratei alternării brațelor raportată la lotul A (64% vs. 40%, $p=0.004$). Aceași tendință se remarcă și în cazul lotului A-CDP (74% vs. 40%, $p=0.0002$).

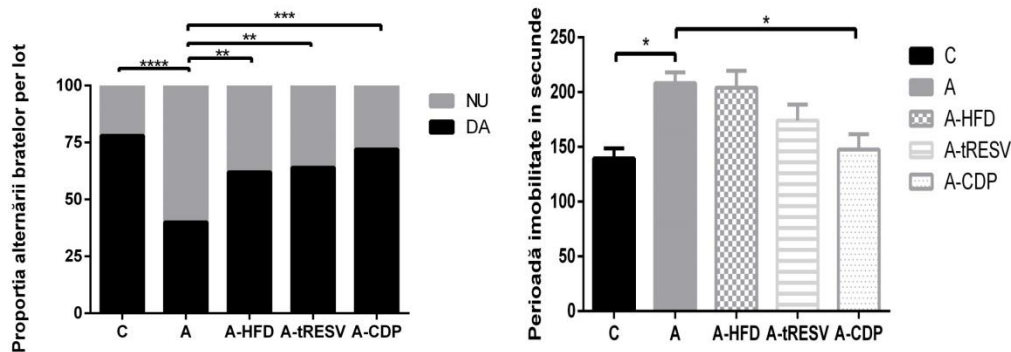


Fig.23 (stânga) Rezultatul testului arenei în T. DA reprezintă alternarea celor două brațe iar NU reprezintă alegerea aceluiași braț

Fig.24 (dreapta) Perioada totală medie de imobilitate la testul înotului forțat

În cazul testului înotului forțat, perioada totală medie de imobilitate este redată în fig.24. Se observă o creștere semnificativă a timpului total de imobilitate în lotul A comparativ cu lotul C (208.2 ± 9.88 vs. 139.4 ± 9.2 , $p=0.015$). Nu s-a înregistrat o diferență semnificativă statistic între loturile A-HFD și A (204 ± 15.53 vs. 208.2 ± 9.88 , $p=NS$).

Există o tendință de scădere a perioadei totale de imobilitate în lotul A-tRESV comparativ cu lotul A, fără să fie semnificativă statistic (174 ± 14.67 vs. 208.2 ± 9.88 , $p=NS$). Pe de altă parte, timpul total de imobilitate în lotul A-CDP este semnificativ scăzut comparativ cu lotul A (147.6 ± 13.99 vs. 208.2 ± 9.88 , $p=0.02$).

Concluzii finale și contribuții personale

1. Modelul experimental propus de EHI, reprezentat de o expunere unică timp de 90 de minute a puilor de șobolan Wistar în ziua 6 postnatal la un amestec gazos format din 9% O₂ și 20% CO₂ în N₂, oferă o bază de studiu robustă pentru această patologie, fapt sugerat de nivelul seric ridicat al acidului lactic postexpunere.

2. EHI provoacă în hipocampul imatur un puternic răspuns neuroinflamator ce se menține și la 48 de ore postexpunere, aspect relevat de nivelul crescut al citokinelor proinflamatorii IL-1b și TNF α .

3. În EHI se poate aprecia indirect gradul injuriei neuronale biochimic prin determinarea proteinei S-100B, acest rezultat având un deosebit potențial translational.

4. În EHI s-a evidențiat *in vitro* un metabolism celular hipocampic redus global.

5. Există în EHI un profil epigenetic particular. Subexpresia miR124 reprezintă un mecanism epigenetic de control al axogenezei și plasticității neuronale, în timp ce subexpresia miR134 ar putea influența procesul neuroinflamator.

6. În modelul experimental propus de EHI există o activitate convulsivă mai mare imediat postexpunere, cunatificată prin numărul pierderilor reflexului postural- LRR.

7. La maturitate, EHI perturbă, de asemenea, pe lângă motricitatea generală și profilul comportamental-cognitiv al animalelor de experiență, prin afectarea unor funcții reglate hipocampic: dorința de explorare, tendința la depresie, anxietatea, teama, memoria lucrativă. Aceste modificări cognitive întâlnite la vârsta adultă sunt concordante, astfel, cu rezultatele clinice (LRR) și paraclinice (biochimice și epigenetice) obținute în perioada consecutivă injuriei.

8. Nutriția grasă maternă administrată peripartum crește în mod aditiv magnitudinea neuroinflamației și a injuriei neuronale din EHI, așa cum rezultă din expresia citokinelor proinflamatorii IL-1b și TNF α recoltate la 24-48 de ore postexpunere precum și a markerului de injurie neuronală, S-100B, recoltat la 24 de ore postexpunere.

9. Nutriția grasă maternă crește ușor, în mod paradoxal, activitatea metabolică hipocampică din EHI la 24 de ore postexpunere, relevată cantitativ prin reducerea mitocondrială a resazurinei. Rezultatul se explică probabil prin existența intrapartum a unui

nivel scăzut inflamator care conduce la un răspuns metabolic intens postpartum în contextul unui stres acut.

10. Dieta maternă bogată în grăsimi modifică profilul epigenetic hipocampic din EHI. Reglează, la nivel epigenetic, plasticitatea sinaptică homeostatică (probabil compensator la scăderea populației neuronale în vederea menținerii funcționalității rețelei neuronale) prin supraexpresia miR124 și crește toleranța la asfixie (explicabil cu ajutorul teoriei "paradoxului obezității" aplicat pentru țesut neuronal imatur) prin subexpresia miR132.

10. Nutriția grasă maternă nu modifică activitatea convulsivă imediat postasfixie perinatală și nu amplifică disfuncția cognitivă a animalelor de experiență la vârsta adultă.

11. Suplimentarea peripartum a dietei materne cu trans-resveratrol are un impact protector puternic asupra neuroinflamației și injuriei neuronale hipocampice secundare EHI, reducând până la nivele comparabile cu expunerea la normoxie nivelul citokinelor proinflamatorii testate și a markerului biochimic de injurie neuronală. Efectul este explicabil prin puternicul efect antioxidant al său care s-ar transmite *in utero*.

12. Trans-resveratrolul administrat matern conduce la creșterea activității metabolice hipocampice cunoscute *in vitro* prin testul la resazurin și redată în colorația tripan-blue.

13. Trans-resveratrolul suplimentat peripartum în dieta maternă crește toleranța neuronală la ischemie prin subexpresia miR132 și accelerează procesul de maturare dendritică prin subexpresia miR15a. Aceste procese adaptative neuronale sunt, așadar, controlate epigenetic.

15. Din punct de vedere clinic și comportamental, trans-resveratrolul are efect benefic imediat prin reducerea activității convulsive din EHI și pe termen lung prin îmbunătățirea performanțelor cognitive în testele specifice: îmbunătățește capacitatea locomotorie și dorința de explorare precum și memoria lucrativă.

16. Dieta maternă suplimentată cu citicolină peripartum oferă o protecție minoră, la nivel biochimic, în EHI, întârziind procesul neuroinflamator.

17. Activitatea metabolică hipocampică la 24 de ore post asfixie perinatală testată *in vitro* nu este influențată de suplimentarea dietei materne cu citicolină.

18. Din punct de vedere epigenetic, se evidențiază un puternic efect modulator al citicolinei administrate matern: crește plasticitatea sinaptică prin supraexpresia miR124 (probabil prin rolul structural pe care citicolina îl joacă la nivel neuronal), crește toleranța la ischemie prin subexpresia miR132, modulează neuroinflamația hipocampică prin supraexpresia miR134 și accelerează procesul de maturare dendritică prin subexpresia miR15a.

19. Activitatea convulsivă din EHI, evaluată imediat postexpunere nu este influențată de administrarea maternă peripartum a citicolinei.

20. Citicolina administrată matern îmbunătățește funcția cognitivă din EHI: îmbunătățește memoria lucrativă și scade nivelul depresiv și de resemnare la vârsta adultă.

Bibliografie selectivă

- Batlle, M. și alții, 2015. Astroglia-microglia cross talk during neurodegeneration in the rat hippocampus. *Biomed Res. Int.*, Volumul 2015, p. 102419.
- Bindra, D. & Thompson, W. R., 1953. An evaluation of defecation and urination as measures of fearfulness. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, Volumul 46, pp. 43-45.
- Carrey, N., McFadyen, M. P. & Brown, R. E., 2000. Effects of chronic methylphenidate administration on the locomotor and exploratory behaviour of prepubertal mice. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, Volumul 10, pp. 277-286.
- Doron, R. și alții, 2014. A novel herbal treatment reduces depressive-like behaviors and increases BDNF levels in the brain of stressed mice. *Life sciences*, Volumul 94, pp. 151-157.
- Ennaceur, A. & Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats : Behavioral data. *Behav Brain Res.*, 31(1), pp. 47-59.
- Espejo, E. F., 1997. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioural Brain Research*, Volumul 87, pp. 233-238.
- Handy, D. E., Castro, R. & Loscalzo, J., 2011. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation*, 123(19), pp. 2145-2156.
- Helmy, M. M., Tolner, E. A. & Vanhatalo, S., 2011. Brain Alkalosis Causes Birth Asphyxia Seizures, Suggesting Therapeutic Strategy. *ANN NEUROL*, Volumul 69, p. 493-500.
- Honig, W. K., 1978. *Studies of working memory in the pigeon*. 1st ed. New York: Taylor & Francis.
- Lister, R. G., 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacological Theory*, Volumul 46, pp. 321-340.
- Olton, D., Becker, J. & Handelman, G., 1979. Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci*, Volumul 2, pp. 313-322.
- Page, M. și alții, 1999. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology*, pp. 162-167.
- Porsolt, R., Bertin, A. & Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, Volumul 229, pp. 327-336.
- Porsolt, R., Le Pichon, M. & Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, Volumul 266, pp. 730-732.
- Saugstad, O., 2002. Is lactate a reliable indicator of tissue hypoxia in the neonatal period?. *Acta Paediatr.*, 91(1), pp. 17-19.
- Silvers, J., Harrod, S., Mactutus, C. & Booze, R., 2007. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *J Neurosci Methods*, 166(1), pp. 99-103.
- Waddington, C., 1942. The epigenotype. *Endeavour*, Volumul 1, pp. 18-20.
- Walsh, R. N. & Cummins, R. A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, Volumul 83, pp. 482-504.
- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A. & Doron, R., 2015. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *J Vis Exp.*, Volumul 97, p. Art. ID: 52587.