

The Effect of Trichostatin A on Working Memory and Serum Bcl-2 Level in Hypoxic-Ischemia Rat Model

Zahra Kahvand^{1,2}, Mohammad Amin Edalatmanesh^{1*}

¹Department of Physiology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

²Department of Physiology, College of Sciences, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran

Article Info:

Received: 28 Dec 2015

Accepted: 2 May 2016

ABSTRACT

Introduction: Cerebral ischemia, occurs when a blood clot has occluded a brain artery, is the third leading cause of mortality in the Western world. The present study was aimed to investigate the effects of Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, on cognitive deficits and serum Bcl-2 level in an animal model of hypoxia-ischemia rat model (HI).

Materials and Methods: Thirty male Sprague dawley rats were randomly divided into the healthy control, HI+Saline and HI+TSA groups. The rats were suffered from the right common carotid artery ligation and 8% oxygen for 5 min to produce HI model. Two days after induction of ischemia, HI+TSA group received intraperitoneally TSA for 5 days. The Y maze test was used to assess the working memory. The ELISA test was performed to measure the serum Bcl-2 level. **Results:** The results showed amelioration of working memory in HI+TSA group compared to HI+Saline rats. In addition, a significant difference in the serum level of Bcl-2 was observed between HI+TSA and HI+Saline groups. **Conclusion:** The data suggested TSA as a potential treatment for amelioration of cognitive deficits after brain ischemia.

Key words:

1. Hypoxia, Brain
2. Ischemia
3. trichostatin A

*Corresponding Author: Mohammad Amin Edalatmanesh

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

doi: 10.18869/acadpub.shefa.4.4.35

اثر تریکوستاتین A بر حافظه کاری و سطح سرمی Bcl-2 در مدل موش صحرایی ایسکمی هایپوکسیک

زهرا کهوند^{۱،۲}، محمد امین عدالت منش^{۳*}^۱گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران^۳گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۳ اردیبهشت ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۷ دی ۱۳۹۴

چکیده

مقدمه: ایسکمی مغزی سومین عامل مرگ و میر در جهان غرب می‌باشد که هنگام مسدود شدن شریان مغز با لخته خون رخ می‌دهد. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات تریکوستاتین A، یک مهارکننده هیستون داستیلازی بر نقص‌های شناختی و سطح سرمی Bcl-2 در مدل موش صحرایی ایسکمی هایپوکسیک انجام شد. **مواد و روش‌ها:** ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داوولی به صورت تصادفی به گروه‌های کنترل سالم، ایسکمی + نرمال سالین و ایسکمی + تریکوستاتین A تقسیم شدند. به منظور ایجاد مدل ایسکمی هایپوکسیک، موش‌های صحرایی متحمل بسته شدن شریان کاروتید مشترک راست و اکسیژن ۸ درصد به مدت ۵ دقیقه شدند. دو روز پس از القاء ایسکمی، تریکوستاتین A به صورت درون صفاقی به گروه ایسکمی + تریکوستاتین A به مدت ۵ روز تزریق گردید. به منظور ارزیابی حافظه کاری از آزمون ماز Y استفاده شد. برای اندازه‌گیری سطح سرمی Bcl-2 روش الایزا انجام شد. **یافته‌ها:** نتایج حاکی از بهبود حافظه کاری در گروه ایسکمی + تریکوستاتین A در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه ایسکمی + نرمال سالین می‌باشد. به علاوه، تفاوت معنی‌داری در سطح سرمی Bcl-2 بین گروه‌های ایسکمی + تریکوستاتین A و ایسکمی + نرمال سالین مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** داده‌ها نشان داد که تریکوستاتین A به‌عنوان یک درمان بالقوه برای بهبود نقص‌های شناختی بعد از ایسکمی مغز مؤثر است.

کلید واژه‌ها:

۱. هیپوکسی مغز
۲. ایسکمی
۳. تریکوستاتین A

* نویسنده مسئول: محمد امین عدالت منش

آدرس الکترونیکی: amin.edalatmanesh@gmail.com

مقدمه

داستیلازی بر بهبود اختلالات شناختی و سطح بیان فاکتور آپوپتوزی Bcl-2 در مدل حیوانی ایسکمی هایپوکسیک (HI) می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۳۰ سر موش صحرایی نر ۲ ماهه نژاد اسپراگ داوولی، با میانگین وزنی 250 ± 10 گرم استفاده شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد دمایی و رطوبت با چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. کلیه مراحل کار با حیوانات، طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز انجام شد. حیوانات در ۳ گروه زیر تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل سالم (حیوانات در این گروه جراحی نشده و به‌منظور بررسی با سایر گروه‌های مورد مطالعه، مورد بررسی قرار گرفتند) ۲- گروه ایسکمی + نرمال سالین (حیوانات این گروه پس از جراحی تحت تزریق حامل یعنی نرمال سالین به صورت درون صفاقی و به مدت ۵ روز قرار گرفتند) ۳- ایسکمی + تریکوستاتین A (حیوانات این گروه پس از عمل جراحی به‌منظور القاء ایسکمی مغزی، تریکوستاتین A با دوز (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) را به مدت ۵ روز دریافت کردند).

القاء مدل ایسکمی هایپوکسیک

به‌منظور القاء ایسکمی، شریان کاروتید راست بسته شد. برای این کار ابتدا موش‌های صحرایی با تزریق درون صفاقی مخلوطی از دو داروی کتامین هیدروکلراید برای بیهوش کردن (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین برای ایجاد بی‌حسی (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند (۷). در حین جراحی باید توجه کرد که اعصاب سمپاتیک واگ دچار آسیب نشود، شریان کاروتید راست با ابریشم جراحی ۴-۰ مسدود شد (۸). سپس حیوانات در محفظه القاء هایپوکسی که حاوی ۸ درصد اکسیژن بود به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. ۴۸ ساعت پس از القاء مدل، تریکوستاتین A (محصول شرکت سیگما آلمان، T8552) به‌صورت درون صفاقی به همراه حلال آن (نرمال سالین) به گروه ایسکمی + تریکوستاتین A به مدت ۵ روز تزریق گردید.

آزمون ماز Y شکل: ارزیابی حافظه کاری

به دنبال تجویز تریکوستاتین A و یک هفته پس از القاء مدل، آزمون ماز Y شکل جهت بررسی میزان رفتارهای تناوبی صحیح و سنجش حافظه کاری مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام این آزمون هر موش صحرایی در قسمت انتهایی یکی از بازوهای ماز Y شکل قرار گرفت و امکان دسترسی آن به تمام نواحی ماز در یک بازه زمانی ۵ دقیقه فراهم گردید. تعداد دفعات ورود حیوان

در اصطلاح پزشکی به کاهش جریان خون در ناحیه‌ای از مغز ایسکمی مغزی^۱ گفته می‌شود. توقف دائمی یا موقت جریان خون در اثر انسداد شریانی سبب بروز سکته مغزی می‌شود. ایسکمی باعث کمبود اکسیژن و مواد مغذی در بخش‌هایی از بدن می‌شود و این امر باعث آسیب به بافت‌ها یا سوء کارکرد اندام می‌گردد (۱). ایسکمی گلوبال^۲ در اثر کاهش شدید یا قطع کامل جریان خون به کل مغز به وجود می‌آید (۲).

آسیب مغزی پریناتال^۳ اغلب با التهاب و کمبود اکسیژن در بافت، باعث نقص کم‌خونی موضعی^۴ می‌گردد. در الگوی آسیب مغزی، استیلایون در کاهش التهاب، آسیب و جراحی مغزی مؤثر است (۱). پاتوفیزیولوژی نقص کم‌خونی موضعی مغزی دارای مکانیسم‌های چندگانه از جمله؛ التهاب وابسته به میانجی عصبی فعال شده توسط میکروگلیا و مونوسیت‌ها می‌باشد. صدمه یا آسیب ماده سفید عنصر مهمی از پاتولوژی ضربات مغزی می‌باشد، هرچند که درمان مؤثر آن به طور کامل شناسایی نشده است (۳). این بیماران مستعد ابتلاء به مشکلات دیگری مانند پنومونی و عفونت ادراری و آمبولی ریه و ترومبوز وریدهای عمقی پا و زخم بستر می‌باشند که این عوارض می‌توانند منجر به مرگ بیمار شوند. سکته مغزی با ایجاد ضعف، فلج، کرختی و کاهش حس در دست و پای یکطرف بدن همراه است. ناتوانی در درک و تولید کلام و اختلال میدان بینایی و اختلال تعادل نیز از نشانه‌های سکته مغزی هستند. بیماران با سکته مغزی متوسط و شدید معمولاً در بیمارستان بستری می‌شوند. احتمال مرگ در یک ماه نخست بعد از سکته حدود ۵۰ درصد می‌باشد (۴).

درمان با مهارکننده هیستون داستیلاز^۵ بعد از کم‌خونی موضعی یا ایسکمی به طور قابل توجهی سطح بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز را افزایش می‌دهد. بعد از انسداد شریان مغزی، سدیم بوتیرات^۶ و تریکوستاتین A^۷ از طریق مهار هیستون داستیلاز در مناطق ایسکمی مغز در موش‌های صحرایی سبب ترمیم بافت عصبی می‌شوند (۵). اثربخشی تریکوستاتین A بر ترمیم نورون‌ها یا یاخته‌های عصبی موش صحرایی سبب رشد بافت عصبی و کاهش مرگ نورونی بعد از ایسکمی می‌شود (۶). تریکوستاتین A می‌تواند به طور قابل توجهی حجم ناحیه آسیب دیده مغز را بعد از ایسکمی به وسیله فعالسازی مسیر سیگنالینگ P13K/AKT کاهش دهد (۷).

پژوهش حاضر به بررسی اثرات حمایت کننده عصبی تریکوستاتین A به‌عنوان یک مهارکننده هیستون

¹ Cerebral ischemic

² Global

³ Prenatal brain

⁴ Local anemia

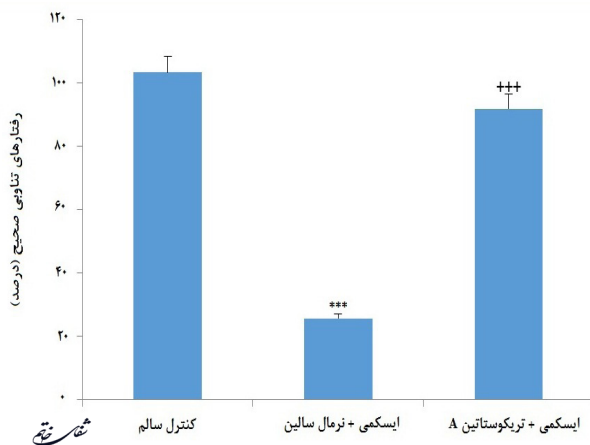
⁵ Histon deacetylase

⁶ Sodium butyrate

⁷ Trichostatin A

⁸ Hypoxic-ischemic

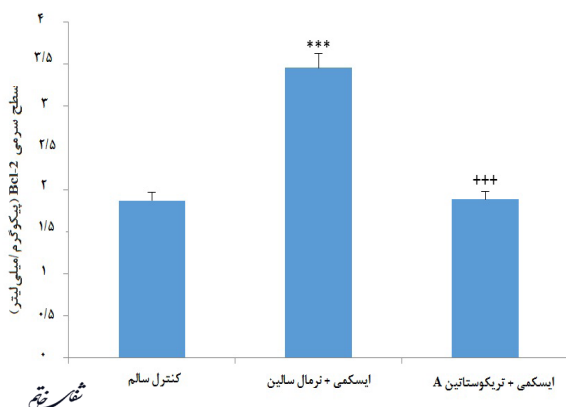
نرمال سالین و گروه ایسکمی + تریکوستاتین A اختلاف معنی داری در سطح ($P < 0.001$) مشاهده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار رفتارهای تناوبی صحیح. بین گروه کنترل سالم و گروه ایسکمی + نرمال سالین، اختلاف معنی داری در سطح ($P < 0.001$) مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داد که بین موش‌های صحرایی گروه ایسکمی + نرمال سالین و گروه ایسکمی + تریکوستاتین A نیز اختلاف معنی داری در سطح ($P < 0.001$) وجود دارد.

بیان سرمی پروتئین Bcl-2

نتایج نشان داد که القاء ایسکمی موجب افزایش معنی داری در سطح سرمی Bcl-2 می‌گردد. به گونه‌ای که میزان این فاکتور در سرم موش‌های صحرایی گروه ایسکمی + نرمال سالین ($1/87 \pm 0/21$) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد ($P < 0.001$). بین گروه کنترل سالم و گروه ایسکمی + تریکوستاتین A ($1/884 \pm 0/25$) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) اختلاف معنی داری مشاهده نشد. درحالی‌که سطح سرمی Bcl-2 در گروه ایسکمی + نرمال سالین و گروه کنترل سالم اختلاف معنی داری در سطح ($P < 0.001$) مشاهده شد (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار سطح سرمی پروتئین Bcl-2. بین گروه کنترل سالم با گروه ایسکمی + نرمال سالین اختلاف معنی داری در سطح ($P < 0.001$) وجود دارد. بین موش‌های صحرایی گروه ایسکمی + نرمال سالین و موش‌های صحرایی گروه ایسکمی + تریکوستاتین A اختلاف معنی داری در سطح ($P < 0.001$) مشاهده شد.

به هر بازو با مشاهده ثبت گردید. ورود هر حیوان به بازو زمانی است که پاهای عقبی حیوان به طور کامل در داخل بازو قرار گیرند. رفتار تناوب به‌عنوان ورودهای موفق و پشت سرهم (سریال) به داخل همه بازوها در مجموعه‌های ۳ تایی همپوشانی کننده در نظر گرفته شد (۹).

$$\text{درصد تناوب} = \frac{\text{تناوب مشاهده شده}}{\text{حداکثر تناوب}^*} \times 100$$

- تعداد کل بازوهای وارد شده = حداکثر تناوب

آزمون بیوشیمیایی سنجش سطح سرمی Bcl-2

پس از پایان مطالعات رفتاری (هفته دوم پس از القاء مدل) جهت تهیه نمونه سرم خون، حیوانات با تزریق درون صفاقی مخلوطی از دو داروی کتامین هیدروکلراید (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از بیهوشی، قفسه سینه را از محل زائیده گزیفونید^۹ استخوان جناغ و با برش دیافراگم شکافته، سپس به طور مستقیم میزان ۲ سی سی خون از قلب گرفته شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه، از نمونه سرم‌های آماده شده در سنجش میزان پروتئین Bcl-2 استفاده شد. سنجش مقدار سرمی Bcl-2 به روش الایزا به کمک کیت الایزا ساخت کمپانی بوستر چین (NO.22341) انجام گردید.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و پرایش ۲۲ انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش داده شد. به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های مورد نظر از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. از نظر آماری مقادیر ($P < 0.05$) معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آزمون ارزیابی حافظه کاری

نتایج حاصل از بررسی میزان رفتارهای تناوبی و سنجش حافظه کاری نشان داد که افزایش میزان رفتارهای تکراری (انتخاب بازوی غیرتکراری در بین ۳ بازو) در حیواناتی که در دوره ایجاد ایسکمی در معرض تریکوستاتین A قرار گرفته‌اند افزایش داشته است، به گونه‌ای که بین گروه کنترل سالم ($103/406 \pm 17/8$ درصد) و گروه ایسکمی + نرمال سالین ($25/118 \pm 7/6$ درصد) اختلاف معنی داری در سطح ($P < 0.001$) وجود دارد (نمودار ۱). در بین گروه کنترل سالم و گروه ایسکمی + تریکوستاتین A ($91/936 \pm 13/4$ درصد) اختلاف معنی داری مشاهده نشده است. در بین موش‌های صحرایی گروه ایسکمی +

⁹ Xiphoid

بحث و نتیجه‌گیری

ایسکمی یکی از علل معلولیت‌های بلندمدت می‌باشد. عوارض ناشی از این بیماری طیف وسیعی از مشکلات و ناتوانی‌ها را برای بیمار به ارمغان آورده و فرد را از چرخه فعالیت و بهره‌وری اجتماعی خارج می‌کند (۱۰). ایسکمی مغزی می‌تواند منجر به اختلالات حرکتی، نقایص حسی، نقایص مربوط به بینایی و اختلال در تکلم گردد (۱۱). ارزیابی عملکرد رفتارهای تناوبی طی آزمون ماز Y نشان می‌دهد که ایسکمی مغزی موجب اختلال در حافظه کاری موش‌های صحرایی می‌شود (۱۲).

تریکوستاتین A یادگیری را در دوران بزرگسالی بهبود می‌بخشد اما محافظت بلندمدت اعمال نمی‌کند، چندین بررسی از جمله بررسی حاضر، اثرات حفاظت کننده عصبی کوتاه‌مدتی را برای مهارکننده هیستون داستیلازی پس از کم‌خونی موضعی مغزی یافته‌اند. اما اثرات بلندمدت در ارزیابی‌های آسیب‌شناسی عصبی و کارکردی وجود ندارد. برای ارزیابی اثرات بلندمدت تریکوستاتین A بر رفتار، یادگیری و آسیب‌شناسی عصبی پس از HI/LPS^{۱۰} (ایسکمی هایپوکسیک/لیپوپلی‌ساکارید) آسیب مغزی بررسی شده است، رفتار و یادگیری پس از HI نوزادی در تست شرطی‌سازی ترس کاهش می‌یابد، این تست‌های رفتاری برای بررسی اثرات بلندمدت تریکوستاتین A پس از HI/LPS انتخاب شدند (۱۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که القاء ایسکمی سبب اختلال حافظه کاری می‌گردد زیرا القاء ایسکمی در موش‌های صحرایی منجر به کاهش رفتارهای تناوبی و بهبود حافظه کاری در گروه سالم نسبت به گروه ایسکمی + نرمال سالین گردیده است. هیستون داستیلازها نقش کلیدی در هموستاز پروتئین استیله در هیستون‌ها و دیگر پروتئین‌ها و در تنظیم فعالیت‌های اساسی سلول مانند رونویسی بازی می‌کنند. طیف گسترده‌ای از اختلالات مغزی با عدم تعادل در سطح پروتئین استیله و اختلالات رونویسی همراه است. درمان

با مهارکننده‌های هیستون داستیلازی می‌تواند این کمبودها را اصلاح کند و به‌عنوان یک راهبرد^{۱۱} جدید و امیدوارکننده برای درمان بیماری‌های عصبی باشد. با توجه به این مهارکننده‌های هیستون داستیلازی که دارای خواص حفاظتی، نوروتروفیک و ضد التهاب بوده و در بهبود عملکرد حافظه و یادگیری مؤثر است برای درمان برخی اختلالات عصبی نیز موثر هستند (۱۱).

Bcl-2 پروتئین سازنده غشاء خارجی میتوکندری است. بیان بیش از حد Bcl-2 نشانه آپوپتوز در پاسخ به محرک‌های گوناگون است. همچنان که سیتوکروم C سیتوزولی برای شروع آپوپتوز لازم است، بیان بیش از حد Bcl-2 سبب ممانعت از انتشار به خارج سیتوکروم C از میتوکندری می‌شود (۱۳). آپوپتوز نقش مهمی در از بین رفتن انتخابی نورون‌ها دارد، آپوپتوز تحت تأثیر ژن‌های خانواده Bcl-2 (که شامل Bcl-2، Bcl-xL، Bax^{۱۲} و Bad^{۱۴}) و خانواده کاسپاز می‌باشد، صورت می‌گیرد (۱۳).

در مطالعه حاضر، بررسی سطوح سرمی Bcl-2 در گروه ایسکمی + نرمال سالین منجر به افزایش معنی‌دار سطح سرمی Bcl-2 در مقایسه با گروه سالم شد که می‌تواند دلیلی بر بروز آپوپتوز و التهاب عصبی در گروه ایسکمی + نرمال سالین در مقایسه با گروه سالم باشد. بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ایسکمی هایپوکسیک منجر به کاهش رفتارهای تناوبی و حافظه کاری در موش‌های صحرایی می‌گردد. همچنین باعث افزایش سطح سرمی Bcl-2 در مغز موش‌های صحرایی می‌گردد. از طرف دیگر تیمار کوتاه‌مدت با تریکوستاتین A در موش‌های صحرایی مدل ایسکمی هایپوکسیک سبب بهبود حافظه کاری به همراه کاهش بیان سرمی Bcl-2 می‌شود. این پروتئین نشانه‌ای از بروز آسیب در سیستم عصبی است که می‌تواند به راه اندازه‌دهنده مسیرهای ضد آپوپتوزی باشد. اما به مرور زمان و به دنبال بهبودی سطح این فاکتور کاهش یافت. در واقع کاهش این پروتئین به طور غیرمستقیم نشانه بهبود اختلال است که در مطالعه حاضر دیده شده است.

¹⁰ Hypoxic-ischemic/lipopolysaccharide

¹¹ Strategy

¹² B-cell lymphoma extra large

¹³ Bcl-2 associated X protein

¹⁴ Bcl-2 associated death promoter

1. Fleiss B, Nilsson MK, Blomgren K, Mailard C. Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitized neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 70. doi: 10.1186/1742-2094-9-70.
2. Jensen MS, Lambert JD, Johansen FF. Electrophysiological recordings from rat hippocampus slices following in vivo brain ischemia. *Brain Res*. 1991; 19; 554(1-2): 166-75.
3. Kim H J, Rowe M, Ren M, Hong JS, Chen PS, Chuang DM. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exo Ther*. 2007; 321(3): 892-901.
4. Roach ES, Kerstin Bettermann, Jose Biller. *Toole's Cerebrovascular Disorders*. 6th ed. Cambridge University Press. 2000.
5. MA XH, Gao Q, Jia Z, Zhang ZW. Neuroprotective capabilities of TSA against cerebral ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt signaling pathway in rats. *Int J Neurosci*. 2015; 125(2): 140-6.
6. Ozkul A, Sair A, Akyol A, Yenisey C, Dost T. Effects of lithium and lamotrigine on oxidative-nitrosative stress and spatial learning deficit after global cerebral ischemia. *Neurochem Res*. 2014; 39(5): 583-61.
7. Takenouchi T, Sugiura Y, Morikawa T, Nagahata TY, Sugioka T, Kubo A. Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 35(5): 794-805.
8. Li JS, Yang F, Zhao X. Protection of lithium on hippocampal cholecystokinin and nitric oxide synthase neuron in lead exposed rats. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2006; 24(3): 147-50.
9. Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(21): 9808-12.
10. Taylor TN, Davis PH, Torner JC, Holmes J, Meyer JW, Jacobson MF. Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke*. 1996; 27(9): 1459-66.
11. Toole JF. *Brain infarction: clinical feature and management cerebrovascular disorders*. 5th ed. Philadelphia: PA: Lippincott Williams & Wilkins. 1999.
12. Chuang DM, Leng Y, Mariova Z, Kim HJ, Chiu CT. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci*. 2009; 32(11): 591-601.
13. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997; 275 (5303): 1129-32.