

lek. wet. Anita Lewczuk  
specjalista weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej  
specjalista patologii i użytkowania zwierząt laboratoryjnych

Zróznicowana wrażliwość mózgu suwaka mongolskiego na  
uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Udział czynnika  
transkrypcyjnego Nrf2 w endogennej neuroprotekcji.

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

Promotor: prof. dr hab. Barbara Zabłocka

Promotor pomocniczy: dr Małgorzata Beręsewicz-Haller



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2023



*Sanitas animalium pro salute homini*

Pragnę serdecznie podziękować prof. dr hab. Barbarze Zabłockiej za dostrzeżenie we mnie zdolnego, młodego naukowca, za wiarę w moje zdolności dedukcyjne i wsparcie w weryfikacji stawianych hipotez, godziny fascynujących rozmów i rozważań, za cierpliwość podczas odpowiedzi na zadawane przeze mnie pytania, ale również motywowanie do zadawania kolejnych. To ogromny zaszczyt pracować pod okiem tak znamienitej osoby.

Pragnę również podziękować dr Małgorzacie Beręsewicz-Haller za wprowadzenie w świat biologii molekularnej, za naukę pracy w modelu Suwaka mongolskiego, godziny spędzone na zakładaniu hodowli, ale przede wszystkim za naukę krytycznego myślenia.

Obydwóm promotorkom dziękuję za cenne wskazówki i merytoryczne wsparcie podczas tworzenia niniejszej rozprawy doktorskiej.

Dziękuję również dr Annie Boratyńskiej-Jasińskiej za wartościowe rady i pomoc w pracy laboratoryjnej.

Dziękuję dr Marii Kawalec i dr Piotrowi Wojtyniakowi za owocną współpracę skutkującą znacznym ograniczeniem wykorzystanych przez nas zwierząt oraz wszystkie techniczne rady.

Dziękuję dr hab. Joannie Gruszczyńskiej-Biegale i Karolinie Serwach za miłą atmosferę w pracy.

Serdecznie dziękuję Mojemu Mężowi za zrozumienie mojej pasji, nieocenione wsparcie i motywację, Moim Rodzicom i Siostrze za wiarę w moje możliwości oraz mojej córce, Urszuli, za dziecięcą radość i uśmiech które niczym zefir wiały w moje żagle.

Dziękuję moim przyjaciołom za nieustające wsparcie i ogrom motywacji. Dziękuję również wszystkim kolegom i koleżankom z pracy, ze specjalizacji i ze studiów doktoranckich którzy uświetnili lata mojego doktoratu.

dr hab., prof. UWM Andrzejowi Kowalskiemu,  
który rozbudził we mnie, nieświadomie, pasję do  
poszukiwania wyjaśnienia zjawisk jeszcze niepoznanych

## Finansowanie badań

Przeprowadzone badania były finansowane z następujących grantów:

1. OPUS 2014/15/D/NZ3/02784 (NCN);
2. Funduszu Badań Własnych FBW-018 (IMDiK PAN);
3. Statutowego tematu badawczego nr 10 (IMDiK PAN);
4. Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach grantu POWR.03.02.00-00- 1028/17-00

## Publikacje

Część wyników niniejszej rozprawy doktorskiej została opublikowana w dwóch pracach oryginalnych:

1. **Lewczuk A**, Zabłocka B, Beresewicz-Haller M. Is Nrf2 Behind Endogenous Neuroprotection of the Hippocampal CA2-4, DG Region? *Mol Neurobiol.* 2023 Mar;60(3):1645-1658. doi: 10.1007/s12035-022-03166-x. Epub 2022 Dec 22. PMID: 36547847; PMCID: PMC9899192.
2. **Lewczuk A**, Boratyńska-Jasińska A, Zabłocka B. Validation of the Reference Genes for Expression Analysis in the Hippocampus after Transient Ischemia/Reperfusion Injury in Gerbil Brain. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 1;24(3):2756. doi: 10.3390/ijms24032756. PMID: 36769080; PMCID: PMC9917415.

## Spis treści

<b>Wykaz skrótów.....</b>	<b>8</b>
<b>Streszczenie.....</b>	<b>9</b>
<b>Summary.....</b>	<b>12</b>
<b>Innowacyjność rozprawy .....</b>	<b>15</b>
<b>Wstęp .....</b>	<b>16</b>
<b>Procesy komórkowe aktywowane w wyniku niedokrwienia i reperfuzji.....</b>	<b>17</b>
<b>Endogenna neuroprotekcja .....</b>	<b>19</b>
<b>Czynnik transkrypcyjny Nrf2 .....</b>	<b>21</b>
<b>Terapia z wykorzystaniem farmakologicznej aktywacji Nrf2 .....</b>	<b>25</b>
<b>Cel Pracy .....</b>	<b>27</b>
<b>Materiały i metody.....</b>	<b>29</b>
<b>Modele badawcze .....</b>	<b>32</b>
Model uszkodzenia ekscytotoksycznego w organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura .....	32
Model krótkotrwałego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego .....	33
<b>Immunoblotting (Western blot).....</b>	<b>33</b>
Frakcjonowanie materiału biologicznego: frakcja jądrowa i cytoplazmatyczna .....	33
Ekstrakty białkowe .....	35
Pomiar stężenia białka .....	35
Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i elektrotransfer .....	36
Detekcja z użyciem przeciwciał .....	37
<b>Wpływ aktywacji Nrf2 na przeżycie komórek w regionie CA1 hipokampa .....</b>	<b>39</b>
Eksperyment w modelu <i>ex vivo</i> .....	39
Eksperyment w modelu <i>in vivo</i> .....	39
<b>Analiza <i>in silico</i> z użyciem technik eksploracji danych (ang. data mining) .....</b>	<b>41</b>
<b>Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR).....</b>	<b>43</b>
Projektowanie starterów .....	43
Izolacja RNA.....	45
Odwrotna transkrypcja .....	46
Weryfikacja genów referencyjnych.....	46
Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy .....	47
<b>Analiza statystyczna .....</b>	<b>47</b>
<b>Wyniki.....</b>	<b>49</b>
<b>Immunoreaktywność Nrf2 i HO-1 w różnych częściach prawidłowego, kontrolnego mózgu dorosłego suwaka mongolskiego .....</b>	<b>49</b>
<b>Immunoreaktywność Nrf2 i jego inhibitora w dwóch regionach hipokampa po I/R .....</b>	<b>50</b>

Immunoreaktywność białek regulowanych przez Nrf2 w dwóch regionach hipokampa po I/R..	51
Wpływ farmakologicznej aktywacji Nrf2 na przeżycie neuronów w regionie CA1 hipokampa w modelu ekscytotoksyczności OHC.....	54
Wpływ farmakologicznej aktywacji Nrf2 na przeżycie neuronów w regionie CA1 hipokampa w modelu krótkotrwałego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego .....	55
Analiza <i>in silico</i> danych pobranych z atlasu sekwencji RNA hipokampa myszy i banku genów regulowanych przez Nrf2.....	58
Walidacja genu referencyjnego do badania ekspresji genów w hipokampie w modelu krótkotrwałego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego.....	60
Analiza porównawcza ekspresji genów wyselekcjonowanych w analizie <i>in silico</i> pomiędzy CA1 a CA2-3, DG w prawidłowym, kontrolnym hipokampie suwaka mongolskiego.....	62
Ekspresja wyselekcjonowanych w analizie <i>in silico</i> genów, na poziomie mRNA oraz białka w dwóch regionach hipokampa po I/R .....	66
Geny o ekspresji większej lub równej w regionie CA2-3, DG w porównaniu do CA1 (potwierdzające analizę <i>in silico</i> ) .....	66
Geny o ekspresji mRNA wyższej w CA1 niż w CA2-3, DG .....	68
<b>Dyskusja.....</b>	<b>75</b>
<b>Podsumowanie.....</b>	<b>95</b>
<b>Wnioski.....</b>	<b>96</b>
<b>Suplement.....</b>	<b>97</b>
<b>Literatura.....</b>	<b>101</b>

## Wykaz skrótów

ARE	element odpowiedzi antyoksydacyjnej, ang. antioxidant response element
CA1	region hipokampa wrażliwy na krótkotrwałe niedokrwienie mózgu, łac. Cornu ammonis 1
CA2-3, DG	region hipokampa odporny na krótkotrwałe niedokrwienie mózgu, łac. Cornu ammonis 2-3, dentate gyrus,
GCLC	podjednostka katalityczna ligazy glutaminianowo-cysteinowej, ang. glutamate--cysteine ligase catalytic subunit
GCLM	podjednostka modulatorowa ligazy glutaminianowo-cysteinowej, ang. glutamate--cysteine ligase regulatory subunit
GPX	peroksydaza glutationowa 1, ang. glutathione peroxidase 1
HO-1	oksygenaza hemowa 1, ang. heme oxygenase 1
I/R	epizod niedokrwienno-reperfuzyjny
KEAP1	cytoplazmatyczny inhibitor Nrf2, ang. Kelch-like ECH-associated protein 1
LDHB	dehydrogenaza mleczanowa B, marker frakcji cytoplazmatycznej, ang. L-lactate dehydrogenase B chain
THOC1	białko macierzy jądrowej p84, marker frakcji jądrowej, ang. nuclear matrix protein p84
MCAO	okluzja tętnicy środkowej mózgu, ang. middle cerebral artery occlusion
NMDA	kwasy N-metylo-D-asparaginowy, ang. N-methyl-D-aspartic acid
Nrf2	jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2, ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OHC	organotypowe hodowle skrawków hipokampa ang. organotypic hippocampal slice culture
qRT-PCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją ang. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SFN	Sulforafan, aktywator Nrf2
WB	Western blot, metoda molekularna detekcji białek



## Streszczenie

Udar mózgu pozostaje nie tylko główną przyczyną zgonów na całym świecie, ale także powoduje niepełnosprawność u ogromnej liczby pacjentów. Pomimo wielu lat badań, dostępne metody leczenia skutków udaru są ograniczone. W związku z tym, istnieje potrzeba poszukiwania nowych, skutecznych terapii neuroprotektoryjnych. Aktywacja naturalnych mechanizmów ochronnych występujących w mózgu tzn. endogennej neuroprotekcji, jest obecnie szeroko rozważaną metodą terapeutyczną. Poznanie mechanizmów molekularnych zaangażowanych w endogenną neuroprotekcję może wskazać nowe punkty uchwytu i przyczynić się do opracowania użytecznych klinicznie innowacyjnych metod leczniczych.

Przykładem endogennej neuroprotekcji jest selektywna odporność komórek regionu CA2-3, DG hipokampa na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (I/R) w porównaniu z regionem wrażliwym - CA1. Niniejsza rozprawa doktorska skupia się na ustaleniu roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2) w mechanizmach naturalnej protekcji występujących w neuronach regionu CA2-3, DG hipokampa. Ponadto poszukiwano nowych genów regulowanych przez Nrf2, które mogą być zaangażowane w mechanizmy endogennej neuroprotekcji. Uzasadnienie badań nad Nrf2 jest następujące: (i) Nrf2 jest głównym regulatorem tysięcy genów kodujących białka zaangażowane w procesy antyoksydacyjne, cytoprotekcyjne i przeciwzapalne, (ii) udowodniono dobroczynny efekt aktywacji Nrf2 w badaniach przedklinicznych w modelach miażdżycy, chorób neurodegeneracyjnych czy zawału serca.

W niniejszej rozprawie doktorskiej, że aktywność Nrf2 jest wyższa w CA2-3, DG w porównaniu z CA1 już u kontrolnych suwaków mongolskich. Natomiast 5-minutowe zaciśnięcie tętnic szyjnych i 15 i 30-minutowej oraz 1, 2, 3, 24, 36, 48, 72 i 96 godzinna reperfuzja powoduje krótkotrwałą aktywację Nrf2 w regionie CA1 oraz opóźnioną i długotrwałą aktywację w CA2-3, DG. Ponadto, różnice w aktywności Nrf2 korelują z poziomem białek regulowanych przez Nrf2 takich jak oksygenaza hemowa 1 (HO-1), podjednostka katalityczna (GCLC) i modulatorowej (GCLM) ligazy glutaminianowo-cysteinowej i peroksydaza glutationowa 1 (GPx1), co

pośrednio wskazuje na obecność w jądrach komórkowych aktywnego Nrf2. Poziom oksygenazy hemowej-1 jest znacznie wyższy w CA2-3, DG niż w CA1 już w kontroli, a zależność ta utrzymuje się po epizodzie I/R. Podobnie jak w przypadku HO-1, wyższą immunoreaktywność w kontrolnym CA2-3, DG w porównaniu z CA1 obserwuje się dla GCLM i GPx1. Inaczej jest w przypadku GCLC, którego immunoreaktywność nie różni się między CA1 i CA2-3, DG w kontrolnym hipokampie. Wzrost immunoreaktywności w 48 i 72 godzinie niedokrwienia obserwuje się zarówno dla GCLC, jak i innych badanych białek. Dokładny mechanizm różnej aktywności Nrf2 w dwóch regionach hipokampa jest niejasny. Jednak, prezentowane dane pokazują, że w kontrolnym, prawidłowym hipokampie poziom KEAP1 (cytoplazmatyczny inhibitor Nrf2) jest wyższy w CA1 niż w CA2-3, DG, a epizod I/R powoduje obniżenie immunoreaktywności KEAP1 w CA1, czego nie obserwujemy w CA2-3, DG. Prezentowane wyniki pokazują również, że farmakologiczna aktywacja Nrf2 przez sulforafan znacząco chroni neurony w regionie CA1 przed śmiercią, zarówno w modelach *in vivo*, jak i *ex vivo* (przejęciowe, globalne niedokrwienie przedomózgowia suwaka i organotypowa hodowla skrawków hipokampa szczura). Wykazano również, że sulforafan jest skuteczny w ochronie neuronów, gdy zastosowano go w opóźnieniu w stosunku do bodźca niedokrwienno-epizodycznego, co daje nadzieję na szerokie okno terapeutyczne w badaniach klinicznych.

W celu wyłonienia nowych genów regulowanych przez Nrf2, które mogą być zaangażowane w mechanizmy odporności CA2-3, DG na epizod niedokrwienno-reperfuzyjny, przeprowadzono analizę *in silico* dostępnych baz danych. Korzystając z atlasu RNA kontrolnego hipokampa myszy i bazy danych genów regulowanych przez Nrf2 wyselekcjonowano 15 genów (*Gpc1*, *Brip1*, *Lrp8*, *Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1*, *Mpp3*, *Phgdh*, *Hrk*, *Tdo2*, *Ret*, *Itgb8*, *Cxcl12*, *Stc2*, *Shisa2*), które wykazują wyższą ekspresję w odpornym regionie hipokampa CA2-3, DG niż w CA1. Wyniki analizy *in silico* zostały zweryfikowane w kontrolnych, prawidłowych hipokampach suwaka i ujawniły, że 20% wyselekcjonowanych genów (*Mpp3*, *Ret*, *Shisa2*) wykazuje ekspresję wyższą w regionie CA2-3, DG niż w CA1. Następnie zbadano ekspresję wybranych genów i ich produktów białkowych po I/R w celu weryfikacji

potencjalnych zależności ze zmianami aktywności Nrf2 po I/R w CA2-3, DG. Sześć badanych genów i sześć produktów białkowych wyselekcjonowanych genów wykazało zwiększoną ekspresję mRNA i/lub białka w CA2-3, DG po 48, 72 i/lub 96 godzinach reperfuzji i są to: *Aifm2* i FSP1, *Fzd7* i FZD7, *Camk1* i CAMK1, *Brip1* i BRIP1, *Tdo2*, *Gpc1*, PHGDH i STC2. A zatem, można je uznać za geny indukowane przez Nrf2 w warunkach stresowych, co czyni je interesującymi w kontekście endogennej neuroprotekcji.

Podsumowując, przeprowadzone badania są nowatorskie, ponieważ wskazują nowe molekularne ścieżki stojące za zjawiskiem odporności regionu CA2-3, DG hipokampa na skutki przejściowego niedokrwienia i reperfuzji mózgu. Przedstawione dane wskazują, że aktywność cytoprotekcyjnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2 jest wyższa w CA2-3, DG niż w CA1 w hipokampie kontrolnym i po epizodzie I/R. Co więcej, wysoka aktywności Nrf2 koreluje z wysokim poziomem białek regulowanych przez niego i związanych ze szlakami antyoksydacyjnymi (HO1, GCLM, GPx1) oraz aktywacją nowo wybranych genów, które mogą uczestniczyć w odpowiedzi obronnej komórki skutkującej przeżyciem. Wskazane tutaj geny i ich produkty białkowe są elementami różnych szlaków molekularnych i nie były dotychczas badane w kontekście niedokrwienia mózgu. Otrzymane wyniki mogą również pomóc w poszukiwaniu nowych terapii neuroprotekcyjnych dla pacjentów po epizodzie niedokrwienno-reperfuzyjnym mózgu.

## Summary

Stroke is not only a leading cause of mortality worldwide responsible for a significant number of deaths annually, but it also results in a significant number of disabilities and disorders. Despite many years of research, the available treatments for stroke remain limited. This state of affairs implies the need for a new approach to the search for effective neuroprotection. So it is that the activation of natural adaptive mechanisms (called endogenous neuroprotection) is now discussed increasingly as a promising therapeutic method. It is hypothesized that the identification and characterization of the components of the cellular mechanism of endogenous neuroprotection will allow the development of ways to induce it in the course of stroke in order to achieve clinically effective neuroprotection.

An example of endogenous neuroprotection is the resistance to ischemia-reperfusion (I/R) episode of the abdominal region of hippocampus (CA2-3, DG) *versus* the dorsal, ischemia-vulnerable region (CA1). Here, I hypothesized the core role of the transcription factor Nuclear Factor-E2-Related Factor 2 (Nrf2) in endogenous neuroprotection of CA2-3, DG. Moreover, I have searched for a new genes regulated by Nrf2 which can be involved in mechanisms of endogenous neuroprotection. The rationale for studying Nrf2 are as follow: (i) Nrf2 is the "master regulator" of thousands of genes encoding the antioxidant, cytoprotective and anti-inflammatory proteins, (ii) beneficial effects of Nrf2 in preclinical models of atherosclerosis, neurodegenerative diseases, and cardiac I/R injury has been reported.

Here, using gerbil model of 5-minute bilateral carotid artery ligation, followed by 15 and 30 minutes, and 1, 2, 3, 24, 36, 48, 72 and 96 hours of reperfusion, it was shown that Nrf2 activity is higher in CA2-3, DG compared to CA1 already in control gerbils. Moreover, I/R results in a brief and short-lived Nrf2 activation in CA1, and a delayed and prolonged activation in CA2-3, DG seen 48h after I/R. Interestingly, sub-regional differences in Nrf2 activity correlate with Nrf2 target proteins, including heme oxygenase 1 (HO-1), the catalytic (GCLC) and modulatory (GCLM) sub-units of glutamate-cysteine ligase, and glutathione peroxidase 1 (GPx1). The level of heme oxygenase-1 is significantly higher in CA2-3, DG than in CA1 already

in control, and this dependence persists at different times after I/R injury. Similar to HO-1, higher immunoreactivity in control CA2-3, DG compared to CA1 is observed for GCLM and GPx1. This is different for GCLC, which immunoreactivity does not differ between CA1 and CA2-3, DG in control, however an increase in immunoreactivity 48 and 72 hours after I/R is observed for both GCLC and the other proteins tested. The exact mechanism of the sub-regional difference in Nrf2 activity is unclear. However, the data here show that in controls, the immunoreactivity of KEAP1 (cytoplasmic suppressor of Nrf2) is higher in CA1 than in CA2-3, DG. In turn, I/R causes a decrease in KEAP1 immunoreactivity in CA1, which is not accompanied by changes in CA2-3, DG. Furthermore, pharmacological activation of Nrf2 by sulforaphane significantly protects neurons in CA1 region from death both *in vivo* and *ex vivo* models (transient global forebrain I/R in gerbils and organotypic hippocampal slice culture, respectively). Sulforaphane is also effective when administered later in relation to the stimulus, which gives hope for a wide therapeutic window in clinical studies.

To investigate new genes regulated by Nrf2, which may be involved in the mechanisms of CA2-3, DG resistance to ischemic insult, an *in silico* analysis was performed. Using RNA-seq atlas of control mouse hippocampus and database of Nrf2-regulated genes, 15 genes were identified (*Gpc1*, *Brip1*, *Lrp8*, *Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1*, *Mpp3*, *Phgdh*, *Hrk*, *Tdo2*, *Ret*, *Itgb8*, *Cxcl12*, *Stc2*, *Shisa2*) that show higher expression in CA2-3, DG than in CA1. The results of *in silico* analysis were verified in the hippocampus of control gerbils and showed that 20% of them (*Mpp3*, *Ret*, *Shisa2*) had higher expression in CA2-3, DG sector than in CA1. Subsequently, the expression of selected genes and their proteins was examined after I/R to show potential correlations with observed changes in Nrf2 activity after I/R in CA2-3, DG. Six of these genes and six of its proteins showed increased mRNA and/or protein expression in CA2-3, DG after 48, 72 and/or 96 hours of reperfusion. These genes and proteins are: *Aifm2* i FSP1, *Fzd7* i FZD7, *Camk1* i CAMK1, *Brip1* i BRIP1, *Tdo2*, *Gpc1*, PHGDH i STC2 and can be described as Nrf2-induced genes/proteins under stress conditions, making them of interest in the context of endogenous neuroprotection.

To conclude, the study conducted is novel as it indicates new molecular pathways behind the phenomenon of ischemia-resistance of CA2-3, DG region of

hippocampus. Presented data show that the activity of the cytoprotective transcription factor Nrf2 is higher in CA2-3, DG than in CA1 in control hippocampus and after I/R. What's more, the activity of Nrf2 is followed by high activity of its effector proteins, connected with antioxidant pathways (HO1, GCLM, GPx1) and post-ischemic activation of newly selected genes that may participate in the defense reaction of cells, and results in its survival. The genes and their proteins indicated here are part of various metabolic pathways and have not been studied so far in the context of brain ischemia. These results may also be an indication for the search for new neuroprotective therapies in ischemic brain pathology.

## Innowacyjność rozprawy

Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje badania wskazujące nowe szlaki molekularne biorące udział w naturalnych mechanizmach obrony przed skutkami niedokrwienia i reperfuzji w regionie CA2-3, DG hipokampa. Aktywność czynnika transkrypcyjnego Nrf2 jest wyższa w CA2-3, DG w porównaniu z wrażliwym na niedokrwienie CA1 zarówno w kontroli jak i po epizodzie niedokrwienno-reperfuzyjnym (I/R), a wyniki te korelują z poniedokrwieniami zmianami poziomu białek, związanych z procesami antyoksydacyjnymi (HO1, GCLM, GCLC, GPx1), których geny są regulowane przez Nrf2. Co więcej, rozprawa doktorska identyfikuje nowe geny regulowane przez Nrf2, które nie były jeszcze badane w kontekście naturalnych mechanizmów obronnych występujących w mózgu. Wyselekcjonowane geny i ich produkty białkowe mogą uczestniczyć w mechanizmach odporności regionu CA2-3, DG tzn. endogennej neuroprotekcji i rzucają nowe spojrzenie na sposoby w jakie komórki nerwowe chronią się same i naprawiają po uszkodzeniu. Co więcej, otrzymane wyniki mogą pomóc w poszukiwaniu nowych terapii neuroprotekcyjnych nie tylko dla pacjentów po epizodzie niedokrwienno-reperfuzyjnym mózgu, ale również dotkniętych innymi chorobami neurodegeneracyjnymi.

Ustalenia rozprawy wykraczające poza aktualną wiedzę literaturową:

- Wyższa aktywność czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w regionie CA2-3, DG niż w CA1 w kontrolnym, prawidłowym hipokampie.
- Znaczny, poniedokrwienno-wzrost aktywności Nrf2 w regionie hipokampa odpornym (CA2-3, DG) na uszkodzenie I/R oraz krótkotrwały wzrost aktywności w regionie wrażliwym (CA1).
- Farmakologiczna aktywacja Nrf2 za pomocą sulforafanu działa ochronnie na neurony regionu hipokampa podatnego na uszkodzenie I/R (CA1).
- Wyłonienie nowych, dotychczas nie badanych w kontekście endogennej neuroprotekcji, genów regulowanych przez Nrf2 mogących uczestniczyć w mechanizmach odporności regionu CA2-3, DG na uszkodzenie I/R.

## Wstęp

Udar mózgu pozostaje drugą, główną przyczyną śmierci oraz trzecią przyczyną niepełnosprawności skracającej lata życia (wskaźnik DALY z ang. *disability-adjusted life years*, lata życia skorygowane niesprawnością) (1). Światowa Organizacja Zdrowia definiuje udar jako zaburzenie czynności mózgu pochodzenia naczyniowego, którego objawy utrzymują się dłużej niż 24 godziny lub prowadzą wcześniej do śmierci (2). Wyróżniamy dwa główne typy udaru: udar niedokrwienny, który stanowi 87% wszystkich przypadków oraz udar krwotoczny (3). Z kolei, gdy epizod dysfunkcji neurologicznych spowodowany ogniskowym lub globalnym niedokrwieniem ustąpi samoistnie w ciągu 24 godzin mówimy o przemijającym ataku niedokrwiennym (TIA) (4, 5). Co więcej, TIA to istotny czynnik prognostyczny pełnoobjawowego udaru (6). Ogniskowe niedokrwienie mózgu jest wynikiem utrudnienia dopływu krwi do mózgu zazwyczaj w wyniku zatoru lub zakrzepu, przy czym występuje krążenie oboczne (7, 8). Natomiast globalne niedokrwienie mózgu jest wynikiem procesów ogólnoustrojowych jak na przykład zatrzymanie akcji serca czy arytmia (8). Globalne niedokrwienie mózgu skutkuje śmiercią neuronów już po 4 – 8 minutach w szczególnie wrażliwych obszarach mózgu jak region CA1 hipokampa czy warstwa zwojowa komórek Purkiniego mózgdzku (7, 9). Obecnie najskuteczniejszą metodą leczenia niedokrwiennego udaru mózgu jest reperfuzja poprzez zastosowanie leków promujących rozpuszczanie skrzepliny (m.in. rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu, rt-PA) lub mechaniczne usunięcie przyczyny okluzji naczynia (10, 11). Ze względu na ścisłe kryteria zakwalifikowania pacjenta do terapii oraz krótkie okno terapeutyczne metody te mogą być stosowane tylko u wąskiej grupy pacjentów (10-12). Istotna jest zatem prewencja (pierwotna i wtórna) w grupach zwiększonego ryzyka oraz rehabilitacja u pacjentów poudarowych. Obecnie duże oczekiwania wiązane są z tak zwaną neuroprotekcją, czyli technikami nacelowanymi na ograniczanie uszkodzenia komórek nerwowych po udarze mózgu (13). Dotychczas, różne strategie neuroprotektcyjne skupiały się na zahamowaniu pojedynczych ścieżek lub mechanizmów molekularnych prowadzących do uszkodzenia i śmierci neuronów. Jednak ich efekty kliniczne są wciąż niezadowalające (14, 15). Stąd, obecnie



naukowcy skupiają się na opracowaniu terapii skojarzonych lub badaniu nowych, wielokierunkowych strategii neuroprotektoryjnych (16-19). Interesującym nurtem jest badanie i późniejsza farmakologiczna aktywacja, naturalnie występujących mechanizmów protekcyjnych komórek nerwowych, w odpowiedzi na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne.

## **Procesy komórkowe aktywowane w wyniku niedokrwienia i reperfuzji**

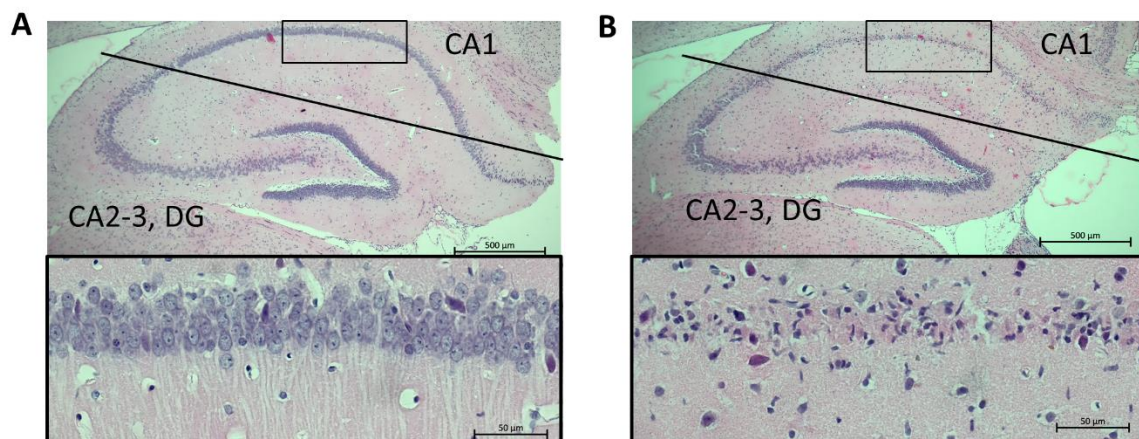
Już krótkotrwałe, globalne niedokrwienie mózgu, po którym następuje przywrócenie krążenia krwi (reperfuzja) powoduje rozwój uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego (I/R) w wyniku którego dochodzi do uszkodzenia i śmierci komórek w niedokrwionym obszarze mózgu. Bezpośrednią konsekwencją upośledzonego przepływu krwi i zmniejszonego dostarczania tlenu i glukozy do komórek mózgu jest wyczerpanie energii i zaburzenia w metabolizmie energetycznym (20). Zmniejszona dostępność tlenu powoduje obniżenie aktywności łańcucha oddechowego, co skutkuje ograniczeniem przepływu protonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną i zahamowaniem produkcji ATP. W warunkach beztlenowych komórki mózgowe mogą aktywować alternatywne drogi metaboliczne jak glikoliza (21). Jednak proces ten nie pokrywa zapotrzebowania energetycznego komórek, a co więcej prowadzi do powstawania kwasu mlekowego, który obniżając pH komórek, dodatkowo hamuje aktywność enzymów odpowiedzialnych za syntezę ATP. Obniżenie stężenia ATP i niskie pH prowadzi do zaburzenia pracy pompy sodowo-potasowej zależnej od ATP zlokalizowanej w błonie plazmatycznej (22, 23). W warunkach fizjologicznych pompa sodowo-potasowa transportuje jony sodu na zewnątrz komórki a jony potasu do jej wnętrza, zużywając około 70% energii wytwarzanej przez komórki nerwowe (24). Natomiast w wyniku niedokrwienia dochodzi do niekontrolowanego napływu jonów sodu do wnętrza komórki czego efektem, z jednej strony, jest depolaryzacja błony komórkowej, a z drugiej, napływ wody do komórek i ich obrzęk (25). Utrata potencjału błonowego i niedobory energetyczne przyczyniają się do wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie (23). To z kolei, powoduje uwolnienie neuroprzekazników, w tym glutaminianu, do przestrzeni międzysynaptycznej (23).

Duże stężenie glutaminianu w przestrzeni międzysynaptycznej prowadzi do zwiększenia stymulacji receptorów glutamatergicznych w tym receptora NMDA, co przyczynia się do jeszcze większego napływu jonów wapnia do cytoplazmy (zarówno z przestrzeni zewnątrzkomórkowej jak i siateczki śródplazmatycznej) oraz depolaryzacji błony i ekscytotoksyczności (23). Nadmiar jonów wapnia, które napływają do wnętrza neuronów uruchamia kaskady reakcji zależne od tych jonów oraz fosfolipazy, endonukleazy czy proteazy, co przyczynia się do uszkodzenia błony komórkowej, cytoszkieletu komórkowego oraz innych organelli (23, 26). Jony wapnia mogą wpływać także na kinazy białkowe, w tym kinazy białkowe C, co w konsekwencji może zmieniać ekspresję genów, poziom białek i ich lokalizację komórkową, co może zarówno prowadzić do uszkodzenia komórek jak i być związane z naturalnymi mechanizmami ochronnymi (26-29). Istotną rolę w rozwoju uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego odgrywają również wolne rodniki, związki chemiczne posiadające niesparowany elektron, którego obecność sprawia, że są wysoce reaktywne. Nagromadzenie wolnych jonów wapnia w komórkach, rozwój stanu zapalnego oraz zahamowanie oddychania mitochondrialnego sprzyjają masowemu powstawaniu wolnych rodników (30-32). Te z kolei, mogą reagować z białkami, lipidami oraz kwasami nukleinowymi, powodując uszkodzenie strukturalne i funkcjonalne komórek (32). W fazie reperfuzji, ilość wolnych rodników wzrasta co jest skutkiem gwałtownego napływu tlenu i innych substratów metabolicznych do nieprawidłowo funkcjonującej komórki, dlatego mówi się nie tylko o uszkodzeniu niedokrwiennym, ale także reperfuzyjnym (33). Wysokie stężenie wolnych rodników prowadzi do tzw. stresu oksydacyjnego, czyli zaburzenia równowagi między ich produkcją a detoksykacją przez enzymy antyoksydacyjne (30). Ponadto, w wyniku procesów oksydacyjnych dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błon mitochondrialnych i uwalniania do cytoplazmy szeregu białek, w tym DNAaz, aktywatorów kaspaz czy cytochromu c, co może prowadzić do aktywacji apoptozy i/lub ferroptozy oraz śmierci komórki (34-37). Dotychczasowe metody hamowania pojedynczych ścieżek kaskady niedokrwiennej nie przyniosły pozytywnych efektów klinicznych, stąd nowe podejście związane z badaniem mechanizmów endogennej neuroprotekcji.

## Endogenna neuroprotekcja

Endogenna neuroprotekcja to zdolność mózgu do „samoobrony” przed działaniem szkodliwych bodźców jak na przykład uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (38-40). W odpowiedzi na działanie negatywnego czynnika, komórki mogą uruchamiać wewnętrzne mechanizmy adaptacyjne, kaskady zdarzeń, aby zapobiec rozwojowi uszkodzenia lub się jemu przeciwstawić. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw tego zjawiska obejmują aktywację czynników transkrypcyjnych, potranslacyjną modyfikację białek, ekspresję nowych białek czy zmianę metabolizmu komórek (40, 41). Klasycznym przykładem endogennej neuroprotekcji jest hartowanie niedokrwieniem (ang. ischemic preconditioning). Jest to proces, w którym krótkotrwały i podprogowy bodziec indukuje tolerancję na kolejne, silniejsze epizody uszkadzające (42-44). Hartowanie niedokrwienne w modelach badawczych, mające na celu ochronę mózgu przed późniejszym niedokrwieniem o potencjalnie uszkadzającym, uzyskano zarówno poprzez bezpośrednie niedokrwienie mózgu np. 10 minutowe MCAO (okluzja tętnicy środkowej mózgu, ang. middle cerebral artery occlusion) u szczurów (29, 45), 15 minutowe MCAO u myszy (46, 47) czy dwukrotne, 2-minutowe BCCAO (dwustronna okluzja tętnicy szyjnej wspólnej, ang. bilateral common carotid artery occlusion) u suwaków (48), jak również poprzez niedokrwienie odległego narządu (zdalne hartowanie), najczęściej kończyny tylnej np. u szczura (49). Hartowanie aktywuje szereg procesów i ścieżek biologicznych. Według wielu badań, w różnych modelach zwierzęcych, hartowanie niedokrwieniem wiąże się z aktywacją związków neuroprotekcyjnych, takich jak HIF1 alfa, VEGF, Nfr2, wzrostem ekspresji genów antyapoptotycznych, zahamowaniem aktywacji kaspaz, obniżeniem potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, hamowaniem prozapalnej aktywacji mikrogleju oraz obniżaniem poziomu czynników prozapalnych np. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  (50-56). Mechanizmy zaangażowane w hartowanie niedokrwienne są skomplikowane i nadal nie do końca poznane, jednak obiecujące efekty w badaniach przedklinicznych zachęcają do wykorzystania, szczególnie zdalnego hartowania, w klinice (56).

Innym przykładem naturalnych mechanizmów obronnych jest odporność neuronów regionu CA2-3, DG hipokampa na krótkotrwały epizod niedokrwienno-reperfuzyjny w porównaniu z podatnymi na uszkodzenie neuronami regionu CA1 (Ryc. 1) (29, 45). W modelu 5-minutowego zaciśnięcia tętnic szyjnych wspólnych suwaka mongolskiego neurony piramidowe regionu CA1 umierają w 3 - 5 dniu reperfuzji a proces ten nosi miano opóźnionej śmierci neuronów (DND, ang. delayed neuronal death) (57, 58).



**Rycina 1.** Ubytek neuronów w regionie CA1 hipokampa po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu suwaka mongolskiego. Skrawek histologiczny mózgu kontrolnego (A) oraz skrawek histologiczny mózgu poddanego 5-minutowemu zaciśnięciu tętnic szyjnych i 7-dniowej reperfuzji (B).

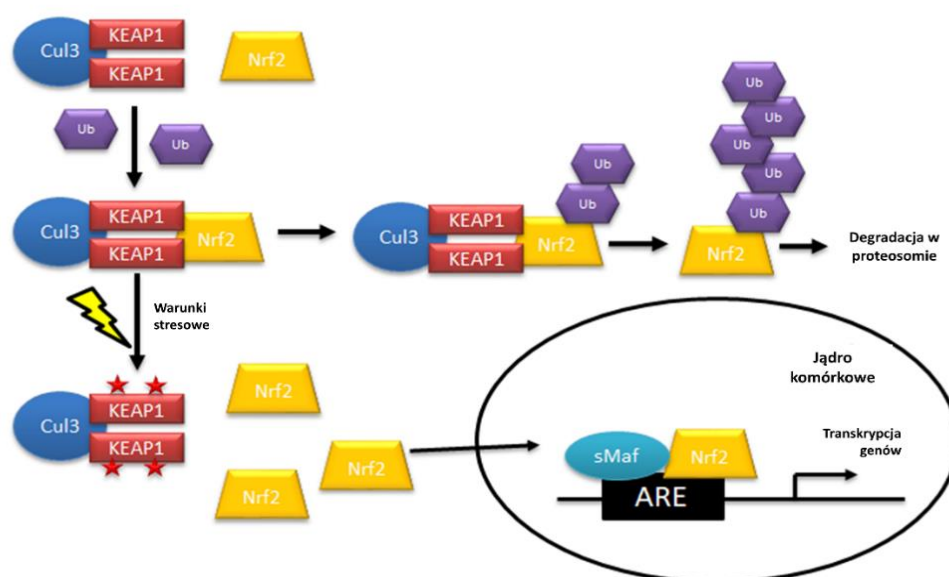
Opóźniona śmierć neuronów regionu CA1 występuje również w modelu przejściowego, globalnego niedokrwienia mózgu szczura (59, 60), w mysim modelu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego (49), w organotypowej hodowli skrawków hipokampa myszy poddanej przejściowemu pozbawieniu tlenu i glukozy *in vitro* (61), u psów po niekompletnym, przejściowym niedokrwieniu mózgu (62) oraz u ludzi po zatrzymaniu akcji serca (63) lub zatrzymaniu krążenia i oddychania (64). Mechanizmy komórkowe związane ze śmiercią neuronów są złożone, a dotychczasowe badania wykazały, że śmierć neuronów CA1 ma wiele cech apoptozy i związana jest z neurotoksycznością glutaminianu oraz jonów wapnia, rozwijającym się stanem zapalnym, stresem oksydacyjnym, uszkodzeniem DNA, czy ze zmienionym metabolizmem lipidów (65-70). Jednak mimo wielu lat badań nie ma jednoznacznej odpowiedzi, co jest przyczyną większej wrażliwości neuronów regionu CA1 na bodziec I/R, a kliniczne próby zahamowania tych procesów nie

przyniosły spodziewanych efektów. Doprowadziło to do odmiennego spojrzenia na problem różnej wrażliwości regionów hipokampa na krótkotrwały epizod niedokrwienno-reperfuzyjny. Nowym podejściem badawczym, w tym mojej grupy, jest poznanie mechanizmów, które po krótkotrwałym bodźcu I/R determinują przeżycie neuronów regionu CA2-3, DG, w celu późniejszej aktywacji i/lub wzmocnienia ich w regionie wrażliwym. Dotychczasowe badania wskazują, że CA2-3, DG charakteryzuje się wyższym poziomem ekspresji czynników neurotroficznych m.in. czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) czy neurotrofiny 3, które uważane są za endogenne białka regulujące wzrost i przeżycie komórek oraz plastyczność synaptyczną (71-73). Co więcej, odporna na uszkodzenie część hipokampa charakteryzuje się wyższym poziomem czynników neuroprotekcyjnych jak tauryna (74) czy białko szoku cieplnego 70 (75-77). Region CA2-3, DG jest wyposażony w mechanizmy chroniące przed stresem ekscytotoksycznym. Wyższa ekspresja syntetazy glutaminowej w CA2/3 niż w CA1 (78) czy wyższy poziom glejowego transportera glutaminianu 1 w astrocytach CA3/DG niż CA1 (79, 80), może świadczyć o obniżaniu toksycznego poziomu glutaminianu w odpornym na uszkodzenie regionie (38). Istotną cechą regionu CA2-3, DG, różniącą go od CA1, jest także wydajniejszy metabolizm energetyczny jak również integralność i dynamika mitochondriów (72, 81-84). Co więcej, wiele badań pokazuje, że region CA3 ma skuteczniejszą ochronę antyoksydacyjną i tym samym, niższy poziom stresu oksydacyjnego, niż region CA1 (85-88). Jest to istotne w kontekście czynnika transkrypcyjnego Nrf2, który jest uważany za główny regulator genów związanych z odpowiedzią antyoksydacyjną i który jest przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

## **Czynnik transkrypcyjny Nrf2**

Jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (Nrf2) jest jednym z głównych czynników transkrypcyjnych w komórkach, w tym neuronach, odpowiedzialnym za indukowanie systemów ochronnych w komórce (89, 90). W fizjologicznych warunkach poziom Nrf2 jest ściśle regulowany przez jego cytoplazmatyczny inhibitor - białko KEAP1 (Ryc. 2) (91). Kompleks Cul3-KEAP1 łączy się z Nrf2 zapobiegając jego translokacji do jądra oraz umożliwia jego

ubikwitynację i degradację w proteosomie. W warunkach stresu oksydacyjnego, reszty cysteinowe białka KEAP1 ulegają utlenieniu, co powoduje uwolnienie czynnika transkrypcyjnego Nrf2 z kompleksu Cul3-KEAP1-Nrf2 i jego translokację do jądra komórki (Ryc. 2). Tam, Nrf2 tworzy heterodimer z małym białkiem Maf (sMaf ang. small musculoaponeurotic fibrosarcoma protein) który łączy się ze specyficzną sekwencją ARE (ang. antioxidant response element, element odpowiedzi antyoksydacyjnej) i inicjuje transkrypcję regulowanych przez Nrf2 genów (91-93). Pierwsze doniesienia dotyczące sekwencji niezbędnej do aktywacji transkrypcji genów antyoksydacyjnych pochodzą z późnych lat 80 (94) i były punktem wyjścia do szybkiego rozwoju badań nad ARE, jego regulacją i genami znajdującymi się pod jego kontrolą. Okazało się, że, aby przyłączyć się do ARE, czynniki transkrypcyjne muszą stworzyć heterodimery lub w niektórych przypadkach, homodimery (95).

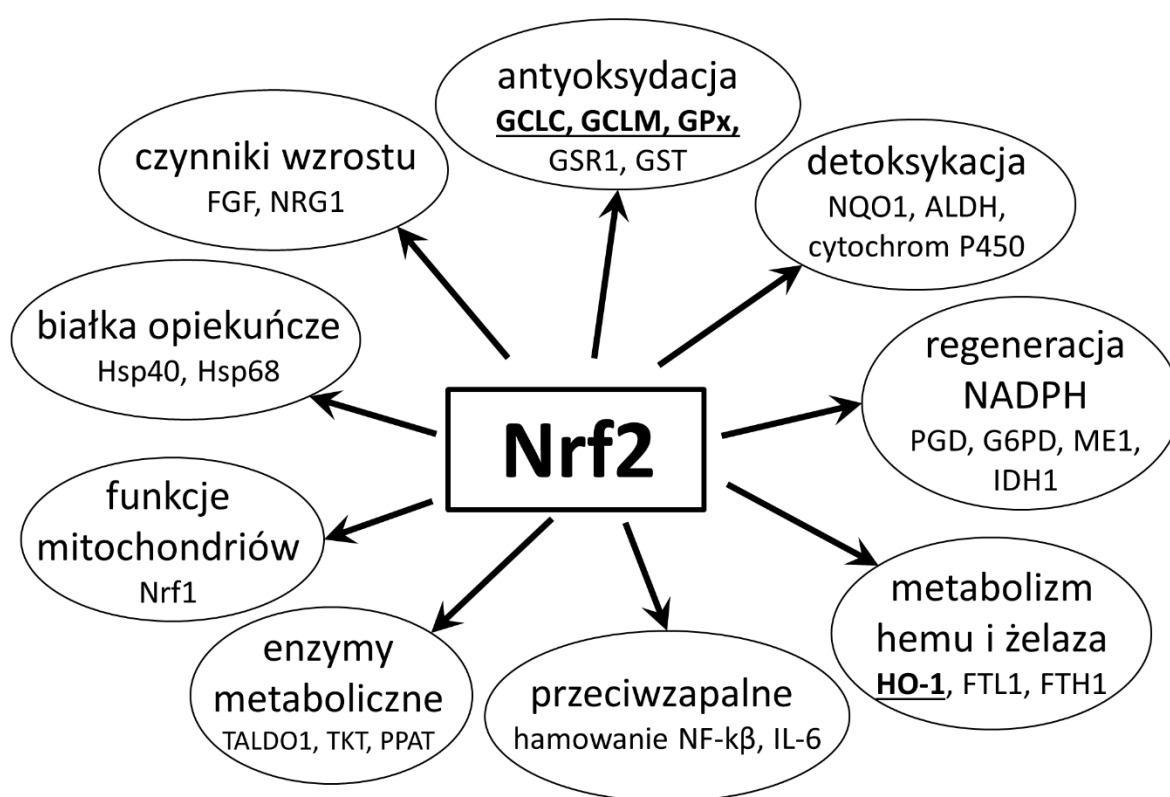


**Rycina 2.** Szlak hamowania/aktywacji Nrf2. W warunkach podstawowych Nrf2 łączy się z kompleksem Cul3-KEAP1, ulega ubikwitynacji i degradacji w proteosomie. Utlenienie reszt cysteinowych, w wyniku zadziałania bodźca stresowego, uwalnia Nrf2 z kompleksu Cul3-KEAP1, który następnie transportowany jest do jądra, gdzie aktywuje transkrypcję regulowanych przez siebie genów po połączeniu z białkiem sMAf.

Do głównych regulatorów sekwencji ARE należą czynniki transkrypcyjne Nrf1, Nrf2 i Nrf3 (95). I tak na przykład Nrf1 i Nrf2 tworzą heterodimery z białkami c-Jun/JunD, co może aktywować transkrypcję genów przy małym stężeniu białek c-

Jun/JunD lub hamować transkrypcję, kiedy ich stężenie jest wysokie. Heterodimer Bach1-sMaf hamuje ekspresję genu *Hmox1* (96). Czynniki transkrypcyjne Nrf2 tworzy heterodimery głównie z białkami sMaf i aktywuje transkrypcję wielu genów. Co ciekawe, połączenie Nrf2 z białkiem MafG wyłącza sygnał eksportu jądrowego zlokalizowany w sekwencji Nrf2, co pozwala na stabilizację i zatrzymanie Nrf2 w jądrze komórkowym (97). Dalsze badania nad szlakiem KEAP1/Nrf2/ARE ujawniły, że dominuje on w regulacji ekspresji genów fazy II podczas stresu oksydacyjnego (98, 99), stąd Nrf2 nazywany jest głównym regulatorem odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny (100). Wielkoskalowe badania eksploracji genomu ujawniły, że Nrf2 pełni wiele innych funkcji poza ochroną przed utleniaczami i elektrofilami. Lista genów pod kontrolą transkrypcyjną Nrf2 zawiera tysiące genów zaangażowanych w procesy antyoksydacyjne, cytoprotekcyjne, przeciwzapalne jak również regulujące metabolizm komórki i bioenergetykę mitochondriów (Ryc. 3). Nadekspresja Nrf2 indukowana doksycykliną w komórkach U2OS (ang. human bone osteosarcoma epithelial cells) zwiększa ekspresję 2619 genów oraz zmniejsza ekspresję 2066 genów w genomie jądrowym (101). Analiza ekspresji genów w mysich fibroblastach embrionalnych (MEF ang. mouse embryonic fibroblasts) pozbawionych ekspresji Nrf2 lub pozbawionych ekspresji KEAP1 wyłoniła 7155 genów z obniżoną ekspresją lub 7832 genów ze zwiększoną ekspresją, odpowiednio, oraz 2489 genów wspólnych dla obu grup genów w porównaniu z komórkami dzikimi (95). Geny, których ekspresja była obniżona w komórkach pozbawionych Nrf2, autorzy uznali za geny podstawowe regulowane przez Nrf2, natomiast geny których ekspresja wzrosła w wyniku pozbawienia komórek cytoplazmatycznego inhibitora Nrf2 – KEAP1 – nazwali genami indukowanymi przez Nrf2. Podział ten związany jest faktem, że w warunkach fizjologicznych niewielka pula Nrf2 ulga translokacji do jądra komórki i pobudza ekspresję pewnej grupy genów (genów podstawowych) regulowanych przez Nrf2. Natomiast, w warunkach aktywacji Nrf2, wywołanej np. stresem oksydacyjnym czy związkami chemicznymi, translokowany do jądra komórki pobudza ekspresję kolejnej/innej grupy genów (genów indukowanych). Geny podstawowe mogą być również genami indukowanymi i odwrotnie. Analiza terminów związanych z tymi genami z bazy ontologii genów ujawniła, że „proliferaacja komórek” dominowała pośród genów podstawowych, a

„odpowiedź na stres oksydacyjny” była najczęściej spotykana wśród genów indukowanych (95). Na liście genów indukowanych przez Nrf2 znajdują się m.in. geny zaangażowane w wewnątrzkomórkową homeostazę glutationu *Gclc* i *Gclm* kodujące podjednostkę katalityczną i modulatorową ligazy glutaminianowo-cysteinowej (GCLC oraz GCLM). Innymi genami regulowanymi przez Nrf2 są np. geny zaangażowane w redukcję nadtlenu (peroksydaza glutationowa; *GPx*) czy metabolizm hemu i żelaza (oksygenaza hemowa 1; *Hmox1*). Rycina 3 przedstawia przegląd wybranych produktów białkowych genów regulowanych przez Nrf2, pogrupowanych według ich funkcji.



**Rycina 3.** Wybrane białka regulowane przez Nrf2 podzielone ze względu na ich funkcje. Nrf2 reguluje m.in. enzymy zaangażowane w homeostazę glutationu takie jak: podjednostki katalityczna (GCLC) i modulatorowa (GCLM) ligazy glutaminianowo-cysteinowej, peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GSR1) oraz kilka S-transferaz glutationowych (GST). Co więcej, Nrf2 kontroluje ekspresję enzymów detoksykacyjnych, w tym dehydrogenazę NAD(P)H (chinon) 1 (NQO1), dehydrogenazę aldehydową (ALDH) i cytochrom P450. Ponadto Nrf2 reguluje cztery enzymy zaangażowane w wytwarzanie NADPH niezbędnego do redukcji glutationu, tj. dehydrogenaza fosfoglukonianowa (PGD), dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD), dehydrogenaza jabłczanowa (ME1) i dehydrogenaza izocytrynianowa 1 (IDH1). Nrf2 wpływa również na metabolizm hemu i żelaza poprzez regulację oksygenazy hemowej-1 (HO-1). Działa również przeciwpalnie poprzez hamowanie NF-κB i ekspresji jego docelowych genów. Ponadto Nrf2 reguluje: obecność w komórce czynników wzrostu i białek opiekuńczych, enzymy metabolizmu energetycznego, aktywność genów regulujących funkcje mitochondriów oraz wiele innych. Białka



pogrubione i podkreślone były analizowane w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Inne skróty: FTL1- łańcuch lekki 1 ferrytyny, FTH1- łańcuch ciężki 1 ferrytyny, TALDO1-transaldolaza 1, TKT- transketolaza, PPAT – Amidofosforybozylotransferaza, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów, NGR1- neuregulina 1, Hsp – białko szoku cieplnego.

## **Terapia z wykorzystaniem farmakologicznej aktywacji Nrf2**

Korzystny wpływ aktywacji Nrf2 został wykazany w różnych modelach eksperymentalnych m.in. chorób neurodegeneracyjnych, w tym w modelach niedokrwienia mózgu, jak również w modelach chorób płuc, wątroby, oczu, przewodu pokarmowego oraz chorób metabolicznych czy autoimmunologicznych (99, 102-109). Czynnikiem łączącym te modele jest udział stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego w patogenezie choroby. Wiele lat badań i coraz szersza wiedza w zakresie budowy, regulacji i funkcji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz jego inhibitora, KEAP1, doprowadziły do blisko stu badań klinicznych z użyciem aktywatorów Nrf2 (105-107) (<https://clinicaltrials.gov>). Trzy spośród nich, fumaran dimetylu, omaveloxolone oraz sulforafan, wyróżniają się zaawansowaniem w badaniach klinicznych. Dotychczas zarejestrowano preparaty zawierające fumaran dimetylu w leczeniu ustępująco-nawracającej postaci stwardnienia rozsianego (RRMS ang. remitting-relapsing multiple sclerosis) oraz łuszczycy (110-112). Co ciekawe, w ostatnich miesiącach, w Stanach Zjednoczonych Agencja Żywności i Leków zatwierdziła użycie preparatu SKYCLARYS™ zawierającego omaveloxolone w leczeniu ataksji Friedreicha (113, 114). Natomiast w przypadku sulforafanu 2 faza badań klinicznych wykazała poprawę funkcji poznawczych u pacjentów ze schizofrenią otrzymujących sulforafan w stosunku do grupy, która otrzymywała placebo (115). Obecnie trwające badania kliniczne weryfikują m.in. skuteczność sulforafanu u pacjentów ze stanem ryzyka rozwoju psychozy (116) czy efektywność syntetycznej postaci sulforafanu, SFX-01 w leczeniu krwotoku podpajęczynówkowego (117). Czym jest zatem sulforafan? Sulforafan (1-izotiocyjano-4-metylosulfinylobutan, SFN) jest jednym z pierwszych, wyizolowanych i zidentyfikowanych, aktywatorów Nrf2 (105, 118). Występuje naturalnie w warzywach krzyżowych jak brokuł czy kalafior (119). Jako związek o małej masie cząsteczkowej wykazuje wysoką biodostępność oraz zdolność do przekraczania bariery krew-mózg, co predysponuje go w leczeniu chorób związanych z zaburzeniami ośrodkowego układu nerwowego (120-122). Sulforafan

jako izotiocyjanian reaguje z tiolami, m.in. resztami cysteinowymi białka KEAP1, tworząc mostki dwusiarczkowe (123). Taka modyfikacja reszt cysteinowych białka KEAP1, uwalnia Nrf2 z połączenia z kompleksu Cul3-KEAP1, umożliwia cytoplazmatyczną akumulację Nrf2 i jego translokację do jądra komórki (124-126). Ogólne obserwacje z badań klinicznych z wykorzystaniem sulforafanu potwierdzają wyniki z badań przedklinicznych wskazujące, że, poprzez aktywację Nrf2, sulforafan działa antyoksydacyjnie, przeciwzapalnie oraz chemoprewencyjnie (105, 119, 127).

Jak przedstawiono powyżej, procesy wewnątrzkomórkowe wyzwalane przez epizod niedokrwienno-reperfuzyjny są obecnie przedmiotem wielu badań w celu odnalezienia nowych punktów uchwytu dla potencjalnych, przyszłych terapii neuroprotektoryjnych. Poszukiwanie mechanizmów zaangażowanych w procesy naturalnej odporności regionu CA2-3, DG hipokampa na epizod I/R, może rzucić nowe światło na fenomen endogennej neuroprotekcji i wskazać, kolejne, być może bardziej skuteczne, cele działań farmakologicznych.

## Cel Pracy

Celem pracy było wykazanie roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w mechanizmach endogennej neuroprotekcji regionu CA2-3, DG hipokampa suwaka mongolskiego oraz wskazanie nowych genów regulowanych przez Nrf2 zaangażowanych w naturalne mechanizmy obronne występujące w mózgu.

Cele szczegółowe:

1. Zbadanie aktywności Nrf2, poprzez oznaczenie poziomu tego białka w jądrach komórkowych, w kontroli oraz w przebiegu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego w dwóch obszarach hipokampa: wrażliwym (CA1) i odpornym (CA2-3, DG) na przejściowe niedokrwienie.
2. Zbadanie mechanizmu różnej aktywności Nrf2 w badanych regionach hipokampa poprzez ocenę poziomu białka KEAP1, jego cytoplazmatycznego inhibitora.
3. Potwierdzenie aktywności Nrf2 poprzez ocenę poziomu produktów białkowych genów regulowanych przez Nrf2 (HO-1, GCLC, GCLM oraz GPx1).
4. Zbadanie wpływu farmakologicznej aktywacji Nrf2 za pomocą sulforafanu, na przeżycie komórek sektora CA1 w modelach *ex vivo* organotypowej hodowli skrawków hipokampa oraz *in vivo* przejściowego niedokrwienie mózgu suwaka mongolskiego.
5. Analiza *in silico* danych z repozytorium genów regulowanych przez Nrf2 oraz ogólnodostępnego atlasu sekwencji RNA hipokampa myszy w celu wytypowania genów o wyższej ekspresji w regionach tworzących CA2-3, DG niż w regionie CA1.
6. Weryfikacja ekspresji mRNA wyselekcjonowanych w analizie *in silico* genów w dwóch regionach hipokampa kontrolnego suwaka mongolskiego.
7. Weryfikacja ekspresji wyselekcjonowanych w analizie *in silico* genów, na poziomie mRNA i produktu białkowego w regionach CA1 oraz CA2-3, DG hipokampa suwaka mongolskiego w przebiegu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego.



## Materiały i metody

**Tabela 1.** Materiały stosowane w doświadczeniach

ODCZYNNIK/MATERIAŁ	PRODUCENT	NUMER KATALOGOWY
30% roztwór akrylamid/bis 29:1	BioRad	1610156
Albumina surowicy bydlęcej (BSA)	Sigma-Aldrich	A6003
Antibiotic Antimycotic Solution (100x)	Sigma	A5955
Bufor do lizy komórek	Cell Signaling Technology	9803
Chlorek sodu	Sigma-Aldrich	S3014
Eozyna Y	Mar-Four	4P.05.1001/L
Etylowy alkohol bezwodny 99,8%	POSCH basic	BA6480111
Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Sigma-Aldrich	P7626-1G
Formalina	Bio-Optica	05-k01004
Glicyna	Sigma-Aldrich	G8898
Glukoza	Sigma-Aldrich	G6152
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco	14175095
Hematoksylina Harrisa	Mar-Four	4P.05.003/L
Jodek propidyny	Sigma-Aldrich	P4170
Ksylen	Sigma-Aldrich	534056
Kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA)	Sigma-Aldrich	M3262
Laurylosiarczan sodu (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771
Marker białkowy Precision Plus Protein Dual	BioRad	1610374

Color Standard		
Membrana do elektrotransferu białek po SDS-PAGE, nitroceluloza	Amersham	GE10600016
Metanol 99,8%	Linegal Chemicals	50-1224
<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich	T7024
Nadsiarczan amonu (APS)	BioRad	1610700
Neurobasal	Gibco	21103049
Odczynnik Bradforda	Sigma-Aldrich	B6916
Odczynnik do detekcji WB ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham	RPN2106
Płytki 6-dółkowe	Corning Life Science	351146
Ponceau S	Sigma-Aldrich	P3504
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems	A25741
Probówki wirówkowe, stożkowe typu Eppendorf	MedLab	25-1500-0L
Roztwór buforowy HEPES	Gibco	15630-106
Sulforafan	Cayman	10496
Suplement B27 (50x)	Gibco	17504-001
Suplement GlutaMAX	Gibco	35050-038
Surowica końska	Sigma-Aldrich	H1270
Szkiełka histologiczne podstawowe	Mar-Four	M1.15.01663A
Trizma	Sigma-Aldrich	T6066

Wkłady Cell Culture Insert, 30 mm, hydrophilic PTFE, 0.4 µm	Merck Millipore	PICM03050
Zestaw do izolacji komórkowej frakcji jądrowej	Cayman chemical	10009277
Zestaw do oznaczanie stężenia białka zmodyfikowaną metodą Lowry'ego	ThermoFisher Scientific	23240
Zestaw High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	Applied Biosystems	4387406
Zestaw Total RNA Mini Plus	A&A Biotechnology	036

**Tabela 2.** Pożywki, roztwory i bufor używane w doświadczeniach

NAZWA	SKŁAD
10% żel poliakrylamidowy	1,7 ml Akrylamid/Bis Solution, 2 ml woda dejonizowana, 1,3 ml 1,5M Trizma -HCl (pH 8,8), 50 µl 10% SDS, 25 µl 10% APS, 2,5 µl TEMED
Bufor do elektroforezy	25mM Trizma (pH 8,3), 192 mM glicyna, 0,1% SDS, woda dejonizowana
Bufor do transferu	25mM Trizma, 192 mM glicyna, 20% metanol, 0,1% SDS, woda dejonizowana
Bufor TBST	50 mM Tris (pH 7,5), 154 mM NaCl, 0,05% Tween 20
Kompletny buforu do lizy komórek	1x cell lysis buffer, 1mM PMSF, woda dejonizowana
Kompletny bufor do ekstrakcji frakcji jądrowej	1x Nuclear Extraction Buffer, 2% inhibitory fosfataz, 1% inhibitory proteaz, 10mM DDT, woda dejonizowana
Kompletny, hipotoniczny bufor do ekstrakcji frakcji jądrowej	1x Nuclear Extraction Hypotonic Buffer, 2% inhibitory fosfataz, 1% inhibitory proteaz, woda dejonizowana
Mieszanina reakcyjna qRT-PCR	10 ml PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 400 nM starter forward i reverse, woda jałowa
Pożywka bez surowicy	74% Neurobasal, 22% HBSS, 1% B27, 5mg/mL glukoza, 1 M HEPES, 0,5mM GlutaMAX, 0,8% Antibiotic Antimycotic Solution

Pożywka z surowicą	50% Neurobasal, 24% surowica końska, 20% HBSS, 1% B-27, 5mg/mL glukoza, 1M HEPES, 0,5 mM GlutaMAX, 0,8% Antibiotic Antimycotic Solution
Roztwór do odwrotnej transkrypcji	10 ml 2x RT Buffer mix, 1 ml 20x RT Enzyme Mix, 2 mg RNA, woda jałowa
Roztwór obciążający do próbek białkowych	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerol, 2% SDS, 0,01% błękit bromofenolowy, 1% merkaptoetanolu, woda dejonizowana
Alkohol kwaśny	70% alkohol etylowy, 1% kwas solny, woda dejonizowana

## Modele badawcze

Wszystkie procedury wykonywane na zwierzętach zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (Uchwała nr WAW379/2017 oraz Uchwała nr WAW2/032/2021). Do badań przeznaczono 157 suwaków mongolskich oraz 150 osesków szczura szczepu Wistar.

### Model uszkodzenia ekscytotoksycznego w organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura

Organotypowe hodowle skrawków hipokampa (OHC) zakładano z 6-7-dniowych osesków szczura szczepu Wistar z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody Stoppiniego (128). Po dekapitacji zwierząt, izolowano mózg, a następnie hipokampy, które cięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 400  $\mu$ m za pomocą urządzenia Tissue Chopper (McIlwain). Uzyskane skrawki przenoszono na wkłady z membraną o wielkości porów 0,4 mm, które umieszczano w płytce sześciodołkowej wypełnionej pożywką z surowicą końską (Tab. 2). Hodowlę prowadzono przez 8 dni w 36°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 95% powietrza w inkubatorze HF90 CO<sub>2</sub> (Heal Force). W kolejnych dniach hodowli, surowica była stopniowo usuwana z pożywki tak by w dniu doświadczenia pożywka była pozbawiona surowicy (Tab. 2). W ósmym dniu hodowli, po wstępnej selekcji i usunięciu uszkodzonych skrawków, przeprowadzano eksperyment (dokładny opis w „Eksperyment w modelu *in vivo*”).



## Model krótkotrwałego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego

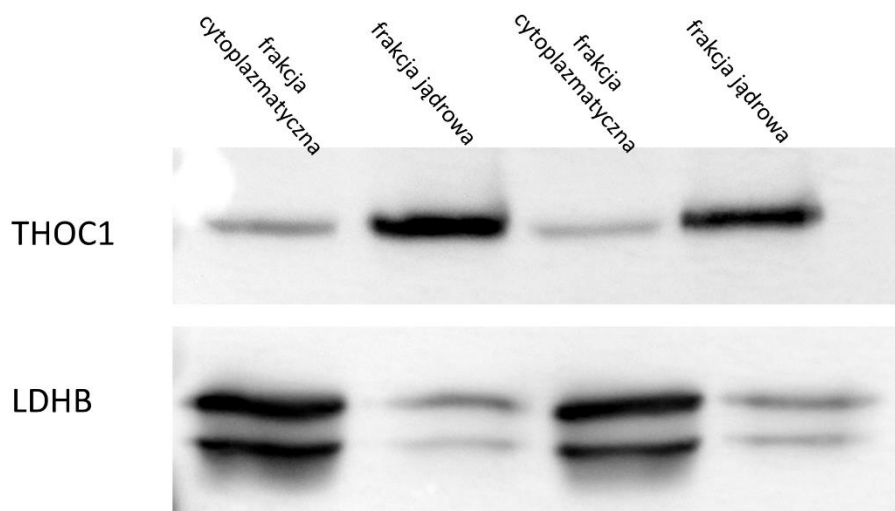
Doświadczenia przeprowadzono na zdrowych, 3-miesięcznych samcach suwaka mongolskiego. Zwierzęta były utrzymywane w warunkach świetlnych 12h dzień/ 12h noc, w warunkach środowiskowych zgodnych z normami panującymi na terenie Rzeczypospolitej Polskiej (Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać ośrodek, oraz minimalnych wymagań w zakresie opieki nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku). Procedurę niedokrwienia przeprowadzono w anestezji wziewnej z użyciem izofluranu (wprowadzenie do narkozy - 5% izofluran w O<sub>2</sub>, zabieg 3-4% izofluran w O<sub>2</sub>). Zwierzęta podczas procedury przebywały na blacie grzejącym utrzymującym stałą temperaturę (36°C) aby zapobiec hipotermii. Niedokrwienie wywoływano przez obustronne zaciśnięcie, uwidocznionych tętnic szyjnych wspólnych, na 5 minut za pomocą chirurgicznych klipsów naczyniowych. Po zakończonym zabiegu niedokrwienia, usuwano klipsy naczyniowe i zaszywano powłoki skórne. Operowane zwierzęta powracały do swoich klatek w pokoju eksperymentalnym i przebywały tam aż do czasu pobrania materiału. Do badań zwierzęta uśmiercano po 15 i 30-minutowej oraz 1, 2, 3, 24, 36, 48, 72 i 96 godzinnej reperfuzji i izolowano z nich dwa regiony hipokampa, CA1 oraz CA2-3, DG. Zwierzęta niepoddane procedurze niedokrwienia, z których izolowano dwa regiony hipokampa CA1 i CA2-3, DG oraz prążkowie, korę mózgową, opuszkę węchową i mózdzek, użyto jako kontrole. W opisywanym modelu przeprowadzono również doświadczenia z dootrzewnowym podaniem aktywatora Nrf2, w którym zwierzęta uśmiercano 7 dni po wywołaniu niedokrwienia (dokładny opis w punkcie „Eksperyment w modelu in vivo”).

### **Immunoblotting (Western blot)**

#### Frakcjonowanie materiału biologicznego: frakcja jądrowa i cytoplazmatyczna

Komórkowe frakcje jądrową i cytoplazmatyczną uzyskano korzystając z komercyjnego zestawu Nuclear Extraction Kit według protokołu producenta. Wyizolowane z suwaków mongolskich hipokampy dzielono na regiony CA1 i CA2-3, DG, następnie ważono i homogenizowano w szklanym homogenizatorze typu

szkło-teflon (Wheaton) w zimnym, kompletnym, buforze hipotonicznym (3ml/1g tkanki). Homogenat przekładano do probówek wirówkowych, stożkowych, a następnie inkubowano przez 15 minut na lodzie. Po tym czasie homogenat wirowano 300 x g (10 minut, 4°C). Otrzymany supernatant stanowił pierwszą część frakcji cytoplazmatycznej, natomiast powstały osad poddawano dalszemu procesowaniu w celu lizy pozostałych komórek. Osad zawieszano w 500 µl kompletnego, hipotonicznego buforu i inkubowano na lodzie przez 15 minut. Następnie do probówek dodawano 50 µl 10% NP-40, mieszano i wirowano 14 000 x g (30 s, 4°C). Otrzymany supernatant łączono z pierwszą częścią frakcji cytoplazmatycznej. Natomiast osad zawieszano w 100 µl zimnego, kompletnego buforu do ekstrakcji frakcji jądrowej, mieszano 15 s na wytrząsarce typu Vortex i inkubowano wytrząsając 350 rpm (15 minut, 4°). Powtarzano etap mieszania i inkubacji, a następnie próbkę wirowano 14 000 x g (10 minut, 4°C). Osad usuwano, a supernatant służył w badaniach jako frakcja jądrowa. Obydwie otrzymane frakcje przechowywano w -80°C. Stopień wzbogacenia frakcji oceniano metodą Western blot z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających białka charakterystyczne dla otrzymanych przedziałów komórkowych: frakcja cytoplazmatyczna - dehydrogenaza mleczanowa B (LDHB), frakcja jądrowa - białko macierzy jądrowej p84 (THOC1) (Ryc. 5).



**Rycina 4.** Stopień wzbogacenia frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej oceniany za pomocą obecności białek markerowych; THOC1 – białko macierzy jądrowej, LDHB – białko cytoplazmatyczne. Przykładowe obrazy western blot uzyskane z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

### Ekstrakty białkowe

Wyizolowane regiony hipokampów homogenizowano w homogenizatorze typu szkło-teflon (Wheaton) w zimnym buforze Cell Lysis Buffer wzbogaconym o 1 mM PMSF. Homogenat przekładano do probówek wirówkowych, stożkowych, a następnie inkubowano przez 5 minut na lodzie, sonifikowano (Vibra-Cell VCX130 (Sonics) 4x po 5 s (w częstotliwości 50/60 Hz) z chłodzeniem pomiędzy powtórzeniami a następnie wirowano 14 000 x g (10 minut, 4°C). Otrzymany supernatant (ekstrakt komórkowy) przenoszono do nowych probówek i oznaczano stężenia białka.

### Pomiar stężenia białka

#### *Metoda Bradforda*

Stężenie białka we frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej mierzono metodą Bradforda (129). Ze względu na obecność DTT w komercyjnym zestawie do izolacji frakcji jądrowej, jest to metoda zalecana dla tak otrzymanego materiału. Metoda Bradforda wykorzystuje barwnik Comassie brilliant blue G-250, który w kwaśnym środowisku wiąże się z białkami i zmienia kolor z brązowego na niebieski. Intensywność koloru jest proporcjonalna do ilości białka w analizowanej próbce.

Analizowane próbki rozcieńczano 10x wodą destylowaną i inkubowano przez 5 minut z odczynnikiem Bradforda. Następnie mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm z użyciem spektrofotometru Infinite M1000Pro (TECAN). Stężenie białka obliczano na podstawie krzywej kalibracyjnej otrzymanej z roztworu o znanym stężeniu białka (BSA, 100 µg/µl).

#### *Zmodyfikowana metoda Lowry'ego*

Stężenie białka w ekstraktach białkowych mierzone zmodyfikowaną metodą Lowry'ego (130). Metoda ta wykorzystuje zdolność wiązania miedzi do białka w roztworze o zasadowym (alkalicznym) pH. Po dodaniu odczynnika Folina-Ciocalte (odczynnik fenolowy) wytworzony kompleks ulega redukcji i powstaje rozpuszczalny w wodzie niebieski produkt. Intensywność koloru jest proporcjonalna do ilości białka w analizowanej próbce. Badane próbki rozcieńczano 5x wodą destylowaną i inkubowano 10 minut ze zmodyfikowanym odczynnikiem Lowry'ego. Następnie, dodawano 100 µl odczynnika Folina-Ciocalte i inkubowano 30 minut, po czym mierzono absorbancję przy długości fali 750 nm z użyciem spektrofotometru Infinite M1000Pro (TECAN). Stężenie białka obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej otrzymanej z roztworu o znanym stężeniu białka (BSA, 100 µg/µl).

#### Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i elektrotransfer

Próbki białkowe, po wymieszaniu z roztworem obciążającym do elektroforezy (Tab. 2), denaturowano przez 5-minutowe gotowanie w 100°C. Na przygotowane w laboratorium 10% żele poliakrylamidowe nakładano odpowiednio: 30 µg białka (frakcja jądrowa), 60 µg białka (frakcja cytoplazmatyczna) i 40 µg białka (ekstrakty białkowe). Jako marker masy molekularnej używano komercyjnej mieszaniny białek Precision Plus Protein Dual Color Standarda (BioRad). Elektroforezę prowadzono w buforze do elektroforezy (Tab. 2) przez około 90 minut przy napięciu 130V. Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym białka z żelu przenoszono na membranę nitrocelulozową o wielkości porów 0,45 µm. Elektrotransfer mokry prowadzono w schłodzonym buforze do elektrotransferu (Tab. 2) przez 90 minut przy natężeniu 350 mA. Po zakończonym transferze, błonę

nitrocelulozową barwiono roztworem Ponceaus S w celu potwierdzenia skuteczności transferu i sprawdzenia równości nakładania białka w każdej ścieżce.

### Detekcja z użyciem przeciwciał

Membranę nitrocelulozową po wypłukaniu w buforze TBST (Tab. 2) blokowano w roztworze 5% odłuszczonego mleka w TBST, aby zapobiec niespecyficznemu przyłączaniu się przeciwciał. Inkubacja w buforze blokującym trwała 60 minut, po czym membranę płukano 3 x po 5 minut w buforze TBST. Następnie membranę inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (Tab. 3) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, membranę płukano 3 x po 5 minut w buforze TBST a następnie inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi (Tab. 3) przez 30 minut w 5% roztworze odłuszczonego mleka w TBST. Po zakończonej inkubacji membranę płukano 3 x po 5 minut w buforze TBST. Detekcję reakcji przeciwciał przeprowadzano z wykorzystaniem substratu dla peroksydazy chrzanowej ECL Western Blotting Detection Reagents i obrazowano za pomocą urządzenia Fusion Fx6 (Vilber Lourmat).

**Tabela 3.** Przeciwciała używane w badaniach z wykorzystaniem metody Western blot

PRZECIWCIAŁO PIERWSZORZĘDOWE			PRZECIWCIAŁO DRUGORZĘDOWE		
NAZWA	PRODUCENT (NR KAT)	STĘŻENIE	NAZWA	PRODUCENT (NR KAT)	STĘŻENIE
Anty-Nrf2	Proteintech (66504-1-Ig)	1:500	Anty-Mysz IgG (przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową wytwarzane u królika)	Sigma-Aldrich (A9044)	1:4000
Anty-KEAP1	Proteintech (60027-1-Ig)	1:500			
Anty-GCLM	Santa Cruz Biotechnology (sc-55586)	1:500			
Anty-GCLC	Santa Cruz Biotechnology	1:500			

	(sc-390811)				
Anty-CAMK1	Santa Cruz Biotechnology (sc-137225)	1:500			
Anty-STC2	Santa Cruz Biotechnology (sc-293388)	1:250			
Anty-GPx1	Cell Signaling (C8C4)	1:500			
Anty-AIFM2	Proteintech (20896-1-AP)	1:500			
Anty-BRIP1	Proteintech (24436-1-AP)	1:500			
Anty-FZD7	Proteintech (16974-1-AP)	1:500	Anty-Królik IgG		
Anty-ITGB8	Cell Signaling (D1V7M)	1:500	(przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową	Sigma- Aldrich (A0545)	1:8000
Anty-PHGDH	Proteintech (14719-1-AP)	1:500	wytwarzane u kóz)		
Anty-SHISA2	Sigma (HPA050172-100UL)	1:1000			
Anty-HO-1	Cell Signaling (E3F4S)	1:500			
Anty-TDO2	Proteinech (15880-1AP)	1:500			
Anty-LDHB	Proteintech (14824-1-AP)	1:1000			

---

Anty- THOC1	Proteintech (10920-1-AP)	1:1000
----------------	-----------------------------	--------

---

## **Wpływ aktywacji Nrf2 na przeżycie komórek w regionie CA1 hipokampa**

### Eksperyment w modelu *ex vivo*

*Doświadczenia z użyciem aktywatora Nrf2 w modelu ekscytotoksyczności w OHC oraz wizualizacja efektów w mikroskopie konfokalnym*

Uszkodzenie ekscytotoksyczne w organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura wywoływano dodając 25  $\mu$ M NMDA (kwas N-metylo-D-asparaginowy) do pożywki na 3 godziny. Aktywator Nrf2 – sulforafan – stosowano w stężeniu 5 lub 10  $\mu$ M razem z NMDA lub z 15-, 30 lub 45-minutowym opóźnieniem. Po trzygodzinnej inkubacji, wymieniano pożywkę na pożywkę pozbawioną NMDA, w której pozostawał sulforafan. Po 24 godzinach od rozpoczęcia eksperymentu martwe komórki obrazowano za pomocą jodku propidyny (6 mM) w mikroskopie konfokalnym Carl Zeiss LSM 510 (Środowiskowe Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK PAN) przy długości fali wiązki laserowej równej 546 nm. Następnie, uzyskane zdjęcia analizowano z wykorzystaniem niekomercyjnego programu komputerowego, który liczy świecące piksele na obrazie. Uzyskane wartości były normalizowane względem maksymalnej fluorescencji uzyskanej po podaniu 100  $\mu$ M NMDA.

### Eksperyment w modelu *in vivo*

*Doświadczenie z podaniem aktywatora Nrf2 w modelu uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego*

Suwakom mongolskim poddanym 5 minutowemu zaciśnięciu tętnic szyjnych wspólnych podawano dootrzewnowo (i.p.) aktywator Nrf2 w dawce 5 mg/kg masy ciała. Sulforafan, rozpuszczony w soli fizjologicznej, w objętości 100  $\mu$ l podawano w trakcie trwania niedokrwienia lub w 30 minucie reperfuzji. Dawka została wybrana

na podstawie danych literaturowych (131-134). Zwierzętom kontrolnym (kontrolne ujemne) oraz poddanym 5-minutowemu niedokrwieniu (kontrolne dodatnie) podawano dootrzewnowo 100 µl soli fizjologicznej. Siedem dni po epizodzie niedokrwieniowym, suwaki mongolskie poddawano perfuzji 4% formaldehydem, uśmiercano i pobierano z nich mózgi.

*Technika histologiczna i barwienie hematoksyliną i eozyną.*

Wyizolowane mózgi umieszczano w 10% buforowanej formalinie na 24h. Następnie, mózgi okrawano w płaszczyźnie czołowej, umieszczano w kasetkach histologicznych i płukano 30 minut w strumieniu chłodnej, bieżącej wody. Po płukaniu kasetki umieszczano w procesorze tkankowym (LEICA) w celu przepojenia materiału parafiną, po czym zatapiano w parafinowe bloczki histologiczne. Tak otrzymane bloczki histologiczne skrawano na mikrotomie rotacyjnym (LEICA) na skrawki o grubości 3-5 µm i nakładano na histologiczne szkiełka podstawowe. Po wysuszeniu preparatów w cieplarni, skrawki barwiono standardowym barwieniem histologicznym hematoksyliną i eozyną (Tab. 3). Otrzymane preparaty suszono, a następnie zaklejano szkiełkiem nakrywkowym i poddawano ocenie mikroskopowej oraz morfometrycznej w mikroskopie świetlnym.

**Tabela 4.** Protokół barwienia hematoksyliną i eozyną.

ETAP BARWIENIA	CZAS TRWANIA
Ksylen I	5 minut
Ksylen II	5 minut
Ksylen III	5 minut
Etanol 99,8% I	5 minut
Etanol 99,8% II	5 minut
Woda bieżąca	5x zanurzenie i wynurzenie
Hematoksylina wg Harrisa	5 minut
Woda bieżąca	15x zanurzenie i wynurzenie



Alkohol kwaśny	Szybkie zanurzenie i wynurzenie
Woda bieżąca	5 minut
Eozyna	2 minut
Woda bieżąca	15x zanurzenie i wynurzenie
Etanol 99,8% II	4x zanurzenie i wynurzenie
Etanol 99,8% II	4x zanurzenie i wynurzenie
Etanol 99,8% II	4x zanurzenie i wynurzenie
Ksylen IV	5 minut
Ksylen V	5 minut

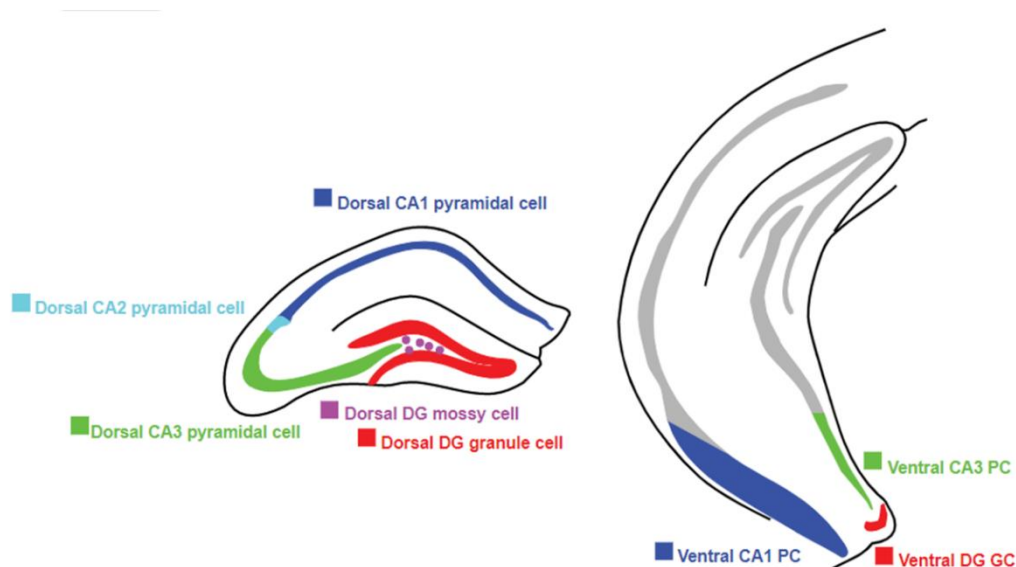
*Wizualizacja efektów podania aktywatora Nrf2 w modelu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego*

Otrzymane preparaty histologiczne poddawano ocenie histopatologicznej celem analizy zmian morfologicznych zachodzących w neuronach hipokampa oraz ocenie morfometrycznej w celu ilościowego określenia neuronów o prawidłowej morfologii. Prawidłowe neurony zliczano z 5 odcinków o długości 250  $\mu\text{m}$  z hipokampów obydwu półkul ( $n = 10$ ). Ocena histopatologiczna i morfometria zostały wykonane w mikroskopie świetlnym Axiolab 5 (ZEISS) oraz przy pomocy kamery mikroskopowej AxioCam 208 (ZEISS) i programu komputerowego ZEN Blue 3.0.

### **Analiza *in silico* z użyciem technik eksploracji danych (ang. data mining)**

Z ogólnodostępnego atlasu ekspresji genów (mRNA) w różnych regionach hipokampa myszy <https://hipposeq.janelia.org> (dostęp 22.07.2020) pobrano informacje o ekspresji genów regulowanych przez Nrf2 z repozytorium <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/NFE2L2.V2> (wersja 7.0, dostęp 22.07.2020). Następnie wybrano geny, których poziomy ekspresji są różne pomiędzy fragmentem CA1 (w bazie określanej jako „Dorsal CA1 PC”) a innymi sektorami

tworzącymi CA2-3, DG (w bazie określanymi jako „Dorsal CA2 PC”, „Dorsal CA3 PC”, „Dorsal DG mossy cell”, „Dorsal DG granule cell”, „Ventral CA3 PC” i „Ventral DG GC” (Ryc. 4). Otrzymano listę 130 genów, których ekspresja w poszczególnych fragmentach hipokampa wyrażona jest liczbą fragmentów przypadających na tysiąc nukleotydów sekwencji transkryptu na milion zmapowanych odczytów (FPKM ang. Fragments PER Kilobase of Exon Per Million Reads Mapped), jednostce stosowanej podczas sekwencjonowania RNA i wykorzystanej w atlasie ekspresji genów różnych regionów hipokampa myszy (<https://hipposeq.janelia.org>). Otrzymane wartości znormalizowano względem „Dorsal CA1”, następnie obliczono ich logarytm dziesiętny i utworzono mapę termiczną (Ryc. 12) obrazującą wielkość różnic ekspresji wyłonionych genów.



**Rycina 5.** Rycina przedstawia sposób podziału hipokampa na regiony grzbietowy (dorsal) i brzuszny (ventral) oraz analizowane typy komórek: komórki piramidowe (pyramidal cell, PC), komórki ziarniste (granule cell) oraz komórki mszyste (mossy cell) wykorzystany w atlasie sekwencji RNA myszy. <https://hipposeq.janelia.org> (dostęp 16.03.2023)

## Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR)

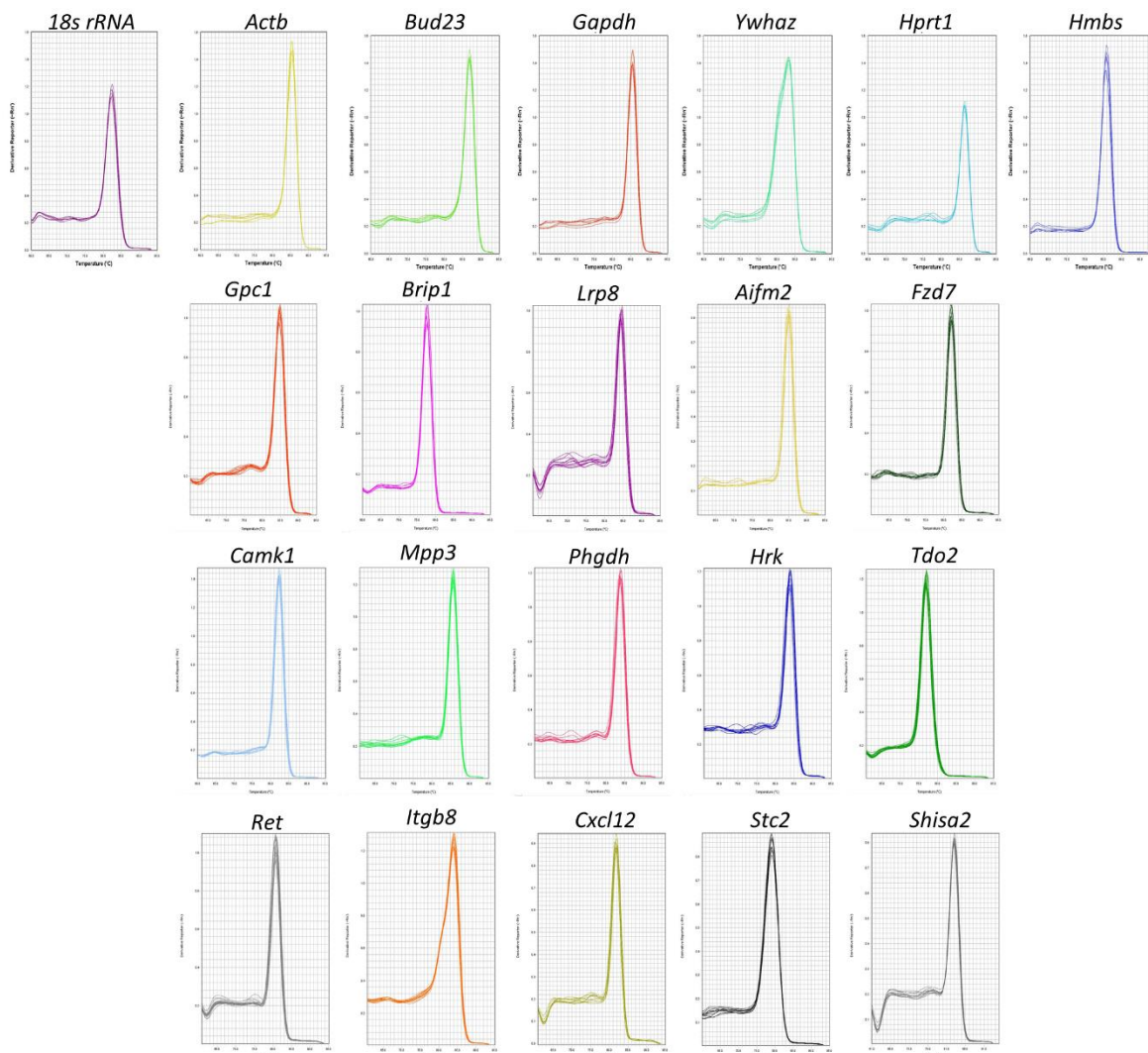
### Projektowanie starterów

Startery do reakcji qRT-PCR dla genów referencyjnych i genów wyselekcjonowanych w analizie *in silico* zaprojektowano w programie Primer3web version 4.1.0 <https://primer3.ut.ee/> (dostęp 10.10.2021) (135-137) w oparciu o ogólnodostępne sekwencje mRNA dla suwaka mongolskiego w bazie danych NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Startery zostały zsyntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA (IBB PAN). Lista starterów i ich sekwencji została zamieszczona w Tabeli 4. Specyficzność starterów została oceniona na podstawie analizy krzywej topnienia (Ryc. 6), która wykazała pojedynczy pik dla poszczególnych par starterów, wskazując na brak niespecyficznych produktów w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

**Tabela 5.** Sekwencje starterów użytych w doświadczeniach do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

GEN	NUMER DOSTĘPU	SEKWENCJE STARTERÓW (5'-3')	WIELKOŚĆ PRODUKTU (BP)
<i>Gapdh</i> (138)	XM_021636934	F: AGTATGACTCTACCCACGGC R: ACTCCACAACATACTCGGCA	150
<i>Hmbs</i>	XM_021659401	F: GAAGAGTGGCCCAGCTACAG R: CACTGAACTCCTGCTGCTCA	108
<i>Actb</i>	XM_021636934	F: AGTATGACTCTACCCACGGC R: ACTCCACAACATACTCGGCA	129
<i>18SrRNA</i> (139)	AJ877917	F: GGCTACCACATCCAAGGAAGG R: AGGGCCTCGAAAGAGTCCTG	101
<i>Hprt1</i>	XM_021660111	F: TTACGGCTTTCCTGGAGGTG R: TAGCCTGGTTCATCATCGCC	136
<i>Ywhaz</i>	XM_021657529	F: CACTCACTCCGGACACAGAA R: CCTACGGGCTCCTACAACAT	197

<i>Bud23</i>	XM_021664516	F: GTGGCTCTGCAATGCAAACA R: TGCTCCGAGTTCTCAGGGTA	132
<i>Aifm2</i>	XM_021649400. 1	F: GCCTTGCCCTTCTCACATCT R: CTGCTTCACATGTCCTCGT	120
<i>Brip1</i>	XM_021645850. 1	F: GGCATCACCCTGCTACTT R: CTGTATTGCCTCCTCTGAACC	105
<i>Camk1</i>	XM_021637624. 1	F: AGAGGACAAGAGGACTCAGAAG R: CATCCAGGGCTACAATGTTAGG	137
<i>Fzd7</i>	XM_021654377. 1	F: TGGAGGTGAGGAGAGGTTT R: TGCAAGTCCTAAGCCAGAAG	100
<i>Itgb8</i>	XM_021654173. 1	F: AGCTTGGAAGAGTGTACGGC R: CCCCTTCCCAGCCACTAAAG	132
<i>Phgdh</i>	XM_021632368. 1	F: GTAAGGAGGAGCTGATCGCC R: CGCTGCGRRGATGACATCAG	92
<i>Stc2</i>	XM_021635606. 1	F: CGCCCTGGACTTCAATGACT R: TGTAGGGGACTCTCAGGCTC	108
<i>Shisa2</i>	XM_021649050. 1	F: TCATCACTGTCCTCCCGGAT R: TTGAGGATGGAGGTGGCAAC	138
<i>Gpc1</i>	XM_021632062. 1	F: GGAGAATGTTATTGGCAGTGTG R: TGGATGACCTTGGCTGTG	93
<i>Cxcl12</i>	XM_021662804. 1	F: TGACTIONACAGATGCCCATGC R: TCGGGTCAATGCACACTTGT	147
<i>Hrk</i>	XM_021642571. 1	F: CGGAGTGTAAGACCCACCC R: ATAGCATTGGGGTGGCTAGC	95
<i>Lrp8</i>	XM_021661159. 1	F: TCTTCACCAACCGACACGAG R: TTGGTAGCCACTTCCACGTC	112
<i>Mpp3</i>	XM_021642772. 1	F: GTAGAGTCCAGCCTCCCTCA R: AAGCGAGGCTTCCCCTAAC	109
<i>Ret</i>	XM_021652718. 1	F: GGTCTCTGTGGACGCTTTCA R: TTCCAAACTCGCCTTCTCCC	101
<i>Tdo2</i>	XM_021663266. 1	F: CATGGAAGTCTGTGGAAATAAG R: GGAATGGAGATGATTGCTGTTTAG	101



**Rycina 6.** Weryfikacja specyficzności starterów poprzez analizę krzywej topnienia. Pojedynczy pik wskazuje na jeden produkt reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Oś rzędnych: Pochodna reportera (-Rn), oś odciętych: Temperatura (°C)

## Izolacja RNA

Izolację RNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Total RNA Mini Plus Concentrator Kit. Z hipokampów podzielonych na dwa fragmenty CA1 i CA2-3, DG, odważono 10 mg tkanki a następnie umieszczano w probówkach wirówkowych, stożkowych zawierających 400 µl Fenzolu Plus. Próbkę homogenizowano elektrycznym homogenizatorem Pellet Pestle (Kimble) przez 15 s, a następnie inkubowano w 50°C przez 5 minut w wytrząsarce (400 rpm). Po zakończonej inkubacji do probówek dodawano 150 µl ultraczystej wody, mieszano 15 s na wytrząsarce typu Vortex, inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej i wirowano 10 000 x g (15 minut, temperatura pokojowa). Powstały osad zawierający

DNA oraz białka został odrzucany. Do supernatantu zawierającego RNA (400  $\mu$ l) dodawano 400  $\mu$ l izopropanolu, mieszano i całość nanoszono na mikrokolumny do oczyszczania RNA i wirowano 10 000  $\times$  g (1 minut, temperatura pokojowa). Następnie mikrokolumny przenoszono do nowych probówek i nanoszono 300  $\mu$ l roztworu płuczającego A1, po czym wirowano 10 000  $\times$  g (1 minuta, temperatura pokojowa). Płukanie wykonywano 2-krotnie. Następnie z probówek usuwano przesącz, umieszczano w nich ponownie mikrokolumny, nanoszono 200  $\mu$ l roztworu płuczającego A1 i wirowano 10 000  $\times$  g (2 minuty, temperatura pokojowa). Następnie, mikrokolumny przenoszono do nowych, jałowych probówek, nanoszono na nie 20  $\mu$ l ultraczystej wody, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty, a następnie wirowano 10 000  $\times$  g (1 minuta, temperatura pokojowa). Po czym, mikrokolumny usuwano a wyizolowane, oczyszczone RNA znajdowało się w probówce. W celu sprawdzenia czystości i jakości otrzymanego RNA, oznaczano stosunek A260/280 oraz A260/230 za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-11 FX+ (DeNovis Inc.)

### Odwrotna transkrypcja

Uzyskany materiał RNA przepisywano na cDNA z użyciem komercyjnego zestawu High-Capacity RNA-to-cDNA Kit. Do reakcji użyto 2  $\mu$ g RNA na reakcję w 20  $\mu$ l roztworu do odwrotnej transkrypcji (Tab. 2). Odwrotną transkrypcję przeprowadzono w termocyklerze PTC-100 (MJ Research) w temperaturze 37°C przez 60 minut, następnie inaktywowano próbki w 90°C przez 5 minut. Tak otrzymane cDNA przechowywano w -20°C do momentu użycia.

### Weryfikacja genów referencyjnych

W celu wyłonienia genów referencyjnych o najbardziej stabilnej ekspresji w modelu 5-minutowego niedokrwania i reperfuzji mózgu suwaka mongolskiego wybrano 6 genów często używanych w badaniach ośrodkowego układu nerwowego (*Gapdh*, *Actb*, *18SrRNA*, *Hprt1*, *Hmbs*, *Ywhaz*) oraz 1 nowy, dodatkowy gen (*Bud23*). Sekwencja starterów do reakcji qRT-PCT znajduje się w Tabeli 4. Do analizy wyników wykorzystano ogólnodostępne internetowe narzędzie RefFinder <https://www.heartcure.com.au/reffinder/> (dostęp 12.04.2022) (140). Narzędzie to

integruje cztery, najczęściej wykorzystywane algorytmy obliczeniowe (delta Ct, Bestkeeper, NormFinder oraz geNorm) i daje możliwość porównania i uszeregowania badanych genów referencyjnych pod względem stabilności ekspresji w badanym modelu. Na podstawie wyników uzyskanych z poszczególnych algorytmów, RefFinder oblicza średnią geometryczną w celu stworzenia generalnego rankingu genów referencyjnych. Im niższa wartość tym gen jest bardziej stabilny w danych warunkach. Badania przeprowadzono na cDNA powstałym z mRNA wyizolowanego ze zwierząt kontrolnych oraz po 3-, 48- i 72-godzinach reperfuzji po 5 minutowym niedokrwieniu, a do obliczeń użyto wartości cyklu granicznego (Ct, cycle threshold).

### Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

Do przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimerazy użyto komercyjny zestaw PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix. Reakcję prowadzono używając starterów w stężeniu 400 nM oraz matrycy cDNA w stężeniu 100 ng lub 200 ng. Jedynie dla genu *Tdo2* użyto matrycy w stężeniu 500 ng ze względu na niski poziom ekspresji tego genu w hipokampie suwaka mongolskiego. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej qRT-PCR wynosiła 20  $\mu$ l. Reakcję prowadzono w urządzeniu 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) w 3 powtórzeniach technicznych. Warunki reakcji obejmowały etap aktywacji UDG (50°C, 2 minuty), etap aktywacji polimerazy (90°C, 2 minuty) oraz 40 cykli denaturacji (95°C, 3 s) i przyłączania starterów/elongacji łańcucha (60°C, 30 s). Jedynie reakcje ze starterami dla genu *Brip1* wymagały specyficznej temperatury 62°C, w etapie przyłączania starterów/elongacji łańcucha. Specyficzność starterów została oceniona przez analizę krzywej topnienia w następujących warunkach: próbki podgrzewano do 95°C z szybkością 1,6°C/s, schładzano do 65°C przez 1 minutę, a następnie powoli ogrzewano do 95°C z szybkością 0,15°C/s. Wyniki analizowano w programie SDS 2.3.

### **Analiza statystyczna**

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w minimum 4-5 powtórzeniach biologicznych i przedstawiono jako średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe

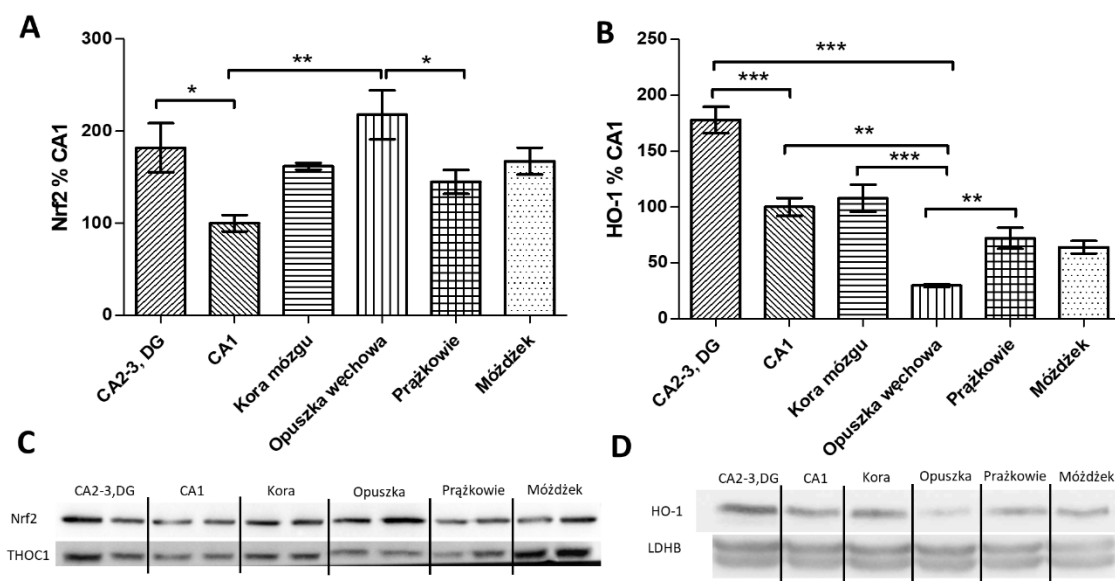
(SD) lub medianę z rozstępem międzykwartylowym. Do weryfikacji istotności statystycznej wyników dwóch grup zastosowano test t-studenta, do porównań wielokrotnych zastosowano analizę wariancji ANOVA z analizą post hoc Bonferroniego. Za poziom istotności ( $\alpha$ ) przyjęto 5%, wartości p niższe od 0,05 ( $p < 0,05$ ) przyjęto za istotne statystycznie. Programy GraphPad Prism, Microsoft Excel i Microsoft PowerPoint wykorzystano do wykonania obliczeń i wykresów.



## Wyniki

### **Immunoreaktywność Nrf2 i HO-1 w różnych częściach prawidłowego, kontrolnego mózgu dorosłego suwaka mongolskiego**

Analiza Western blot immunoreaktywności Nrf2 we frakcji jądrowej wskazała, że jego poziom jest znacznie wyższy w regionie CA2-3, DG hipokampa niż w CA1 (Ryc. 7 A, C). Badania pozostałych części mózgu (kory mózgu, opuszki węchowej, prążkowiec i mózdzku) pokazały, że opuszka węchowa ma poziom czynnika transkrypcyjnego Nrf2 zbliżony do CA2-3, DG, podczas gdy pozostałe badane struktury mają zawartość w jądrach komórkowych Nrf2 podobną do tej obserwowanej w CA1. Ponadto, w badanych regionach zbadano immunoreaktywność oksygenazy hemowej 1 (HO-1) białka, którego ekspresja jest pod kontrolą transkrypcyjną Nrf2. Wykazano, że wysoki poziom Nrf2 we frakcji jądrowej w CA2-3, DG wiąże się z wysoką immunoreaktywnością HO-1 w tym regionie, a w pozostałych strukturach niska immunoreaktywność Nrf2 korelowała z niską immunoreaktywnością HO-1 (Ryc. 7 B, D). Wynik ten wskazuje że zmiany poziomu Nrf2 korelują ze zmianami regulowanego przez niego białka, co potwierdza obecność aktywnego Nrf2 we frakcji jąder komórkowych. Wyjątek stanowiła opuszka węchowa, która pomimo wysokiego poziomu Nrf2 charakteryzuje się niską immunoreaktywnością HO-1. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest wysoki poziom białka regulującego transkrypcję, Bach1, w opuszce węchowej, który jest represorem transkrypcji genu oksygenazy hemowej 1 - *Hmox1* (96).

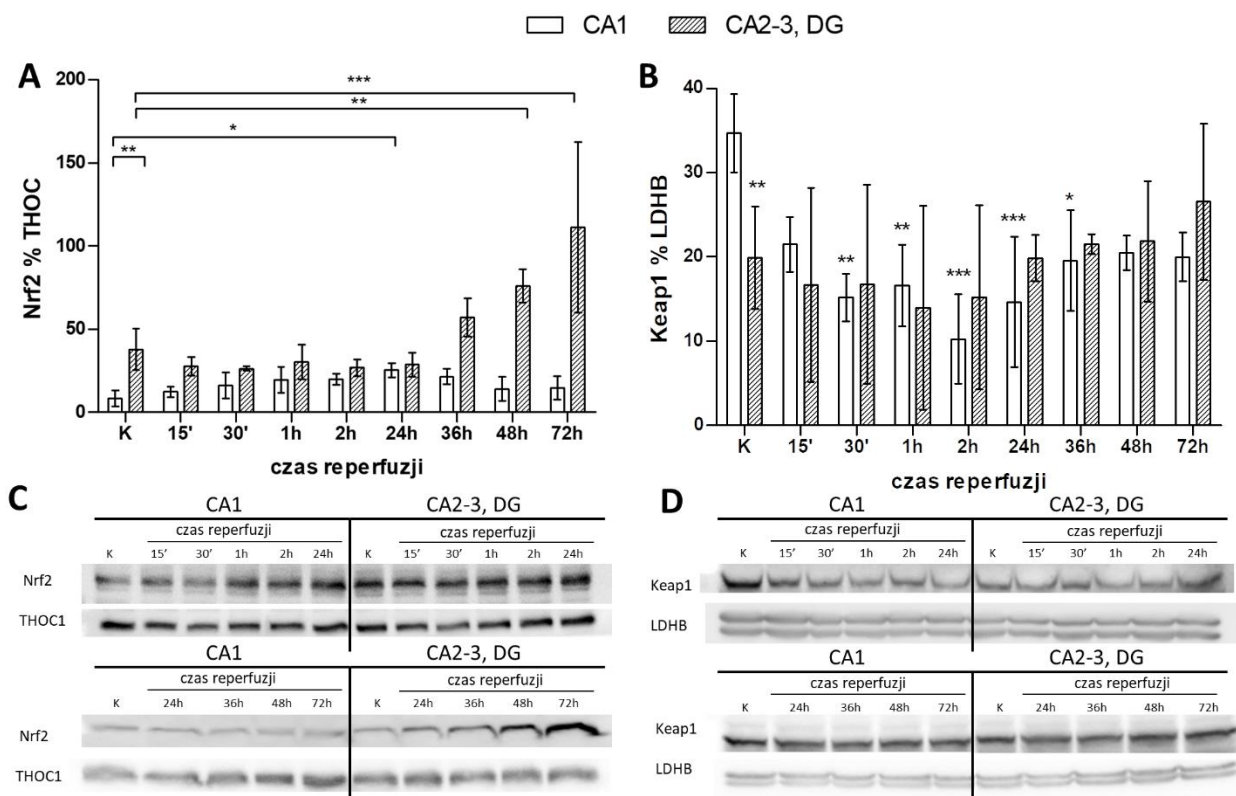


**Rycina 7.** Analiza Western blot czynnika transkrypcyjnego Nrf2 we frakcji jądrowej (A, C) oraz jego białka efektorowego, HO-1 we frakcji cytoplazmatycznej (B, D), w różnych fragmentach: CA2-3, DG, CA1, kora mózgu, opuszka węchowa, prążkowie, mózdzek, kontrolnego mózgu suwaka mongolskiego. Wykresy prezentują dane z analizy densytometrycznej Nrf2 (A) oraz HO-1 (B) jako procent CA1 (średnia +/- SD), n = 4-6, \*p < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\*p < 0.001. C i D Reprezentatywne Western blot dla Nrf2 i HO-1 wraz z białkami referencyjnymi.

## Immunoreaktywność Nrf2 i jego inhibitora w dwóch regionach hipokampa po I/R

W kolejnym etapie sprawdzono jak uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne wpływa na immunoreaktywność Nrf2 we frakcji jądrowej w dwóch regionach hipokampa. W regionie CA2-3, DG nie zaobserwowano zmian w poziomie czynnika transkrypcyjnego do 36 godzin po niedokrwieniu (Ryc. 8 A, C). Dopiero w 48 i 72 godzinie reperfuzji immunoreaktywność czynnika transkrypcyjnego zaczęła wzrastać (Ryc. 8 A, C). W CA1 uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne powodowało przejściowy wzrost Nrf2 we frakcji jądrowej, którego pik obserwowano w 24 godzinie reperfuzji (Ryc. 8 A, C). W późniejszym czasie reperfuzji, poziom Nrf2 w CA1 wracał do poziomu kontrolnego. Odpowiedź każdego z badanych regionów na I/R jest zatem inna. W CA1 obserwujemy krótkotrwały, przejściowy wzrost Nrf2, natomiast w CA2-3, DG widoczna jest długotrwała, opóźniona aktywacja po 2 dniach od niedokrwienia.

W celu zbadania mechanizmu tych różnic, analizowano immunoreaktywność cytoplazmatycznego inhibitora Nrf2 – białka KEAP1. W kontroli, poziom KEAP1 był znacznie wyższy w regionie CA1 niż CA2-3, DG (Ryc. 8 B, D). Jego poziom w CA2-3, DG nie zmieniał się istotnie po I/R. Z kolei, w CA1 poziom KEAP1 obniżał się do 24 godzin po I/R po czym powoli wracał do poziomu wyjściowego. Otrzymane wyniki poziomu KEAP1 korelują ze zmianami immunoreaktywności Nrf2 w regionie CA1 (Ryc. 8 A).



**Rycina 8.** Analiza Western blot czynnika transkrypcyjnego Nrf2 we frakcji jądrowej (A, C) oraz jego cytoplazmatycznego inhibitora, KEAP1 (B, D) w CA1 oraz CA2-3, DG, w kontroli i po I/R (5, 30 min lub 1, 2, 24, 36, 48 i 72 h). Wykresy prezentują dane z analizy densytometrycznej Nrf2 (A) oraz KEAP1 (B) jako procent THOC1 i LDHB, odpowiednio (średnia +/- OS), n = 4-5, \*p < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\*p < 0.001. B Istotność statystyczna liczona vs. kontrola CA1. C i D Reprezentatywne Western blot dla Nrf2 i KEAP1 wraz z białkami referencyjnymi.

## Immunoreaktywność białek regulowanych przez Nrf2 w dwóch regionach hipokampa po I/R

W celu weryfikacji czy zmiany immunoreaktywności Nrf2 we frakcji jądrowej są równoważne z jego aktywnością, zbadano poziom białek regulowanych przez Nrf2: oksygenazy hemowej (HO-1), peroksydazy glutationowej 1 (GPx1), dwóch

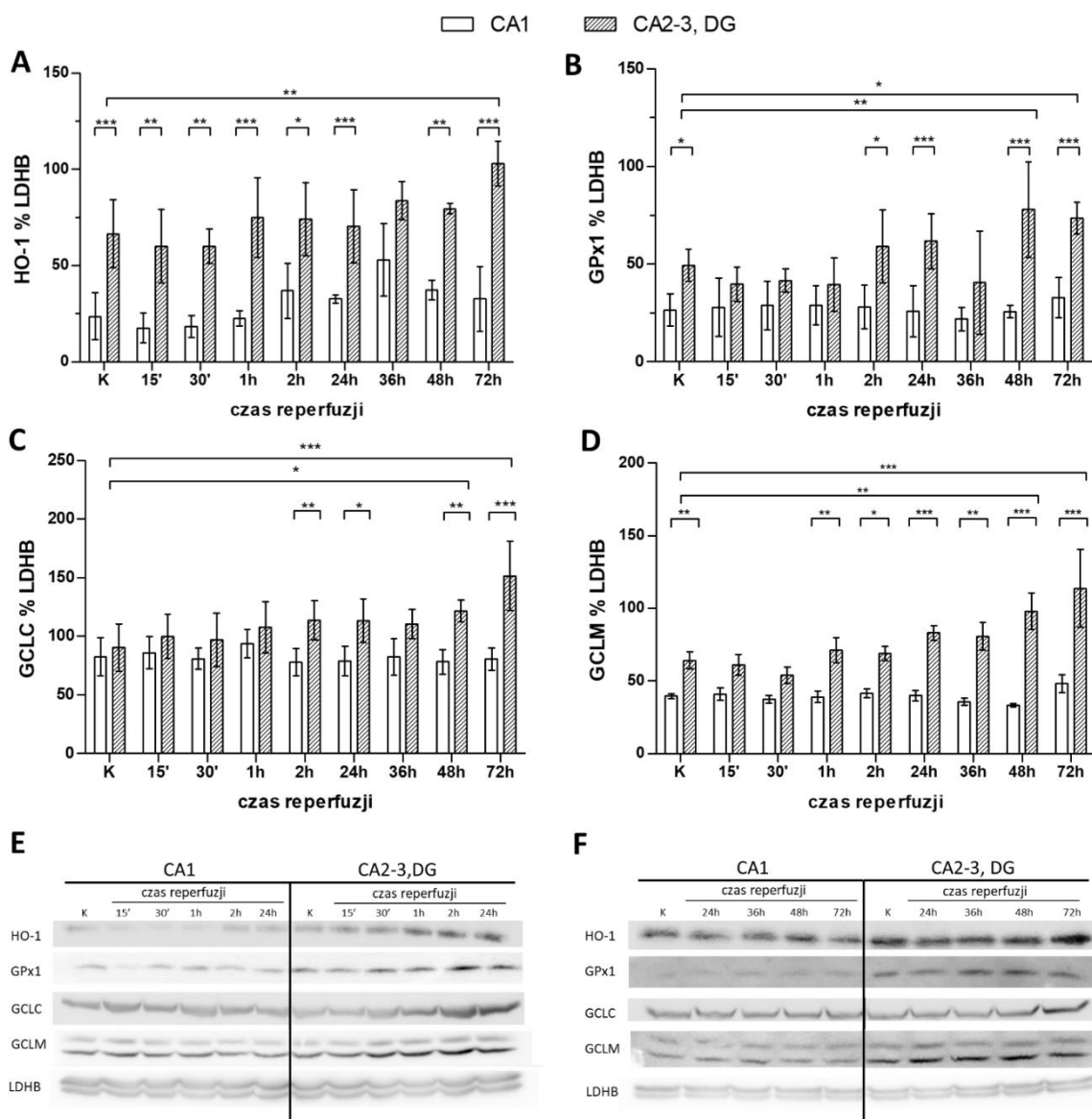
podjednostek ligazy glutaminianowo-cysteinowej, podjednostki katalitycznej (GCLC) i podjednostki modulatorowej (GCLM).

Poziom oksygenazy hemowej 1 był wyższy w regionie CA2-3, DG niż w CA1 już w kontroli i zależność ta utrzymywał się do 72 godziny reperfuzji (Ryc. 9 A, E, F). Jedynie w 36 godzinie reperfuzji w CA1 obserwowano przejściowy, krótkotrwały wzrost immunoreaktywności HO-1. Przyrost ten może być związany z opisanym wcześniej wzrostem Nrf2 we frakcji jądrowej w CA1 w 24 godzinie reperfuzji (Ryc. 8 A, C). Natomiast w CA2-3, DG zaobserwowano znaczący wzrost immunoreaktywności HO-1 w 72 godzinie reperfuzji co koreluje z wynikami aktywności Nrf2 we frakcji jądrowej dla tego sektora.

W przypadku peroksydazy glutationowej 1 oraz podjednostki modulatorowej ligazy glutaminianowo-cysteinowej zaobserwowano wyższą immunoreaktywność już w prawidłowym, kontrolnym hipokampie pomiędzy CA1 a CA2-3, DG (Ryc. 9 B, D, E, F). W przebiegu reperfuzji w CA1 nie obserwowano zmian w poziomie GPx1 i GCLM. Natomiast w CA2-3, DG po 2 godzinach (GPx1) oraz po 1 godzinie (GCLM) pojawił się wzrost w immunoreaktywności tych białek, który osiągał swój szczyt w 48 i 72 godzinie reperfuzji (Ryc. 9 B, D, E, F).

W badaniu podjednostki katalitycznej ligazy glutaminianowo-cysteinowej różnicę w immunoreaktywności pomiędzy CA1 a CA2-3, DG zaobserwowano w 2 godzinie reperfuzji (Ryc. 9 C, E, F). Wzrost immunoreaktywności GCLC w CA2-3, DG trwał do 72 godziny reperfuzji.

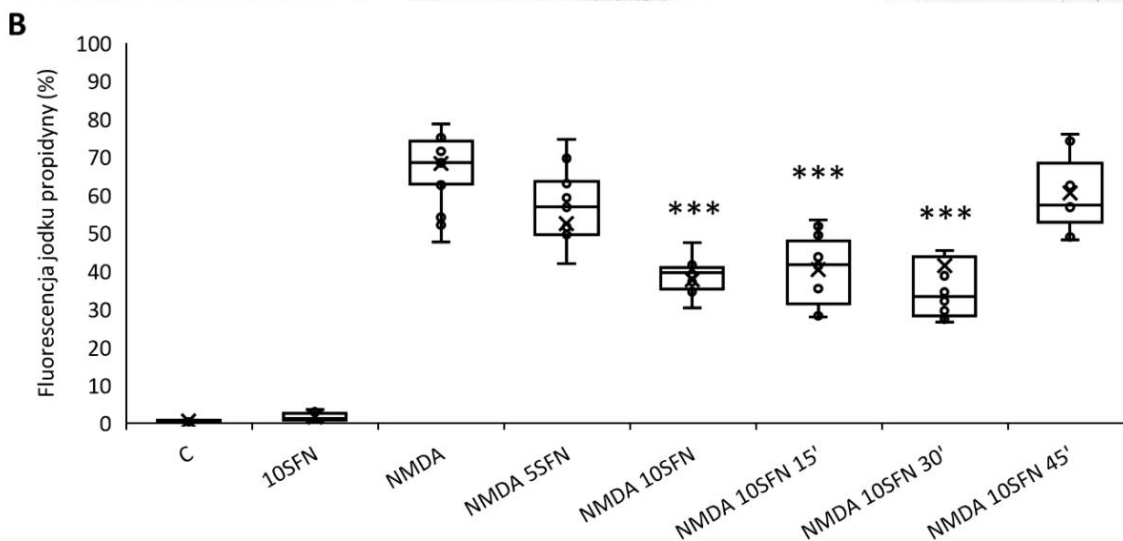
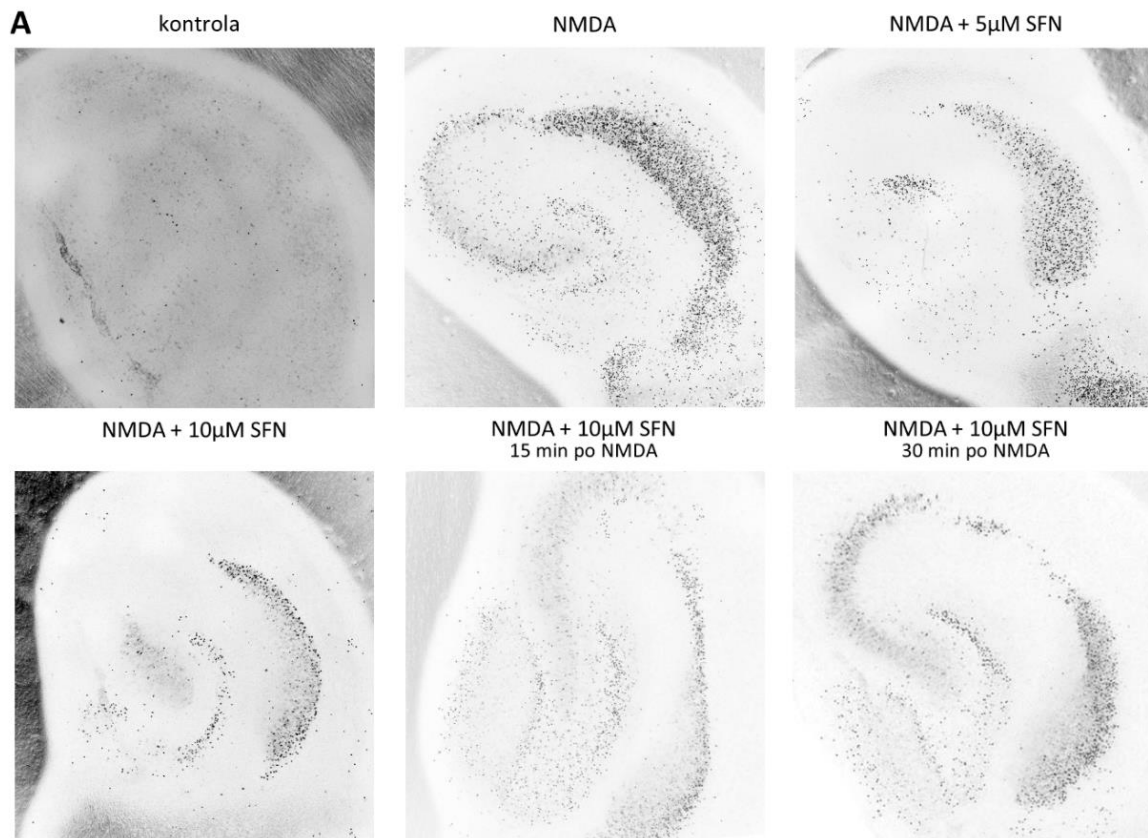
Obserwowane zmiany w immunoreaktywności wybranych białek, będących pod transkrypcyjną regulacją Nrf2, korelują z: większą aktywnością Nrf2 w kontrolnym regionie CA2-3, DG, przejściowym wzrostem aktywności Nrf2 w 24 godzinie reperfuzji w regionie CA1 oraz znaczącym wzrostem jego aktywności w 48 i 72 godzinie reperfuzji w CA2-3, DG (Ryc. 8 A, C).



**Rycina 9.** Analiza Western blot białek regulowanych przez Nrf2: oksygenaza hemowa 1 (A), peroksydaza glutationowa 1 (B), podjednostka katalityczna ligazy glutaminianowo-cysteinowej (C) i podjednostka modulatorowa ligazy glutaminianowo-cysteinowej (D) w CA1 oraz CA2-3, DG, w kontroli i po I/R (5, 30 min lub 1, 2, 24, 36, 48 i 72 h). Wykresy prezentują dane z analizy densytometrycznej HO-1 (A), GPx1 (B), GCLC (C) i GCLM (D) jako procent LDHB (średnia +/- SD), n = 4-5, \*p < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\*p < 0.001. E i F Reprezentatywne Western blot dla HO-1, GPx1, GCLC i GCLM wraz z białkami referencyjnymi.

## **Wpływ farmakologicznej aktywacji Nrf2 na przeżycie neuronów w regionie CA1 hipokampa w modelu ekscytotoksyczności OHC**

W celu weryfikacji czy farmakologiczna aktywacja Nrf2 ochroni neurony regionu CA1 hipokampa przed uszkodzeniem ekscytotoksycznym przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura oraz sulforafanu, aktywatora Nrf2. Uszkodzenie ekscytotoksyczne, indukowane przez 3-godziną inkubację z 25  $\mu$ M NMDA, powodowało około 70% śmiertelność neuronów głównie w regionie CA1 (Ryc. 10 A, B). Podanie SFN w stężeniu 5  $\mu$ M razem z NMDA nie powodowało efektu protekcyjnego w komórkach hipokampa. Natomiast SFN w stężeniu 10  $\mu$ M zmniejszał śmiertelność neuronów w regionie CA1 do około 40%, stąd to stężenie zastosowano w dalszych eksperymentach. Podanie SFN z 15- i 30-minutowym opóźnieniem w stosunku do czynnika uszkadzającego również wywoływało efekt protekcyjny w CA1 (Ryc. 10 A, B). Natomiast podanie SFN z 45-minutowym opóźnieniem nie przyniosło już takiego efektu. Co ważne, dodanie sulforafanu nie miało szkodliwego wpływu na neurony hipokampa.



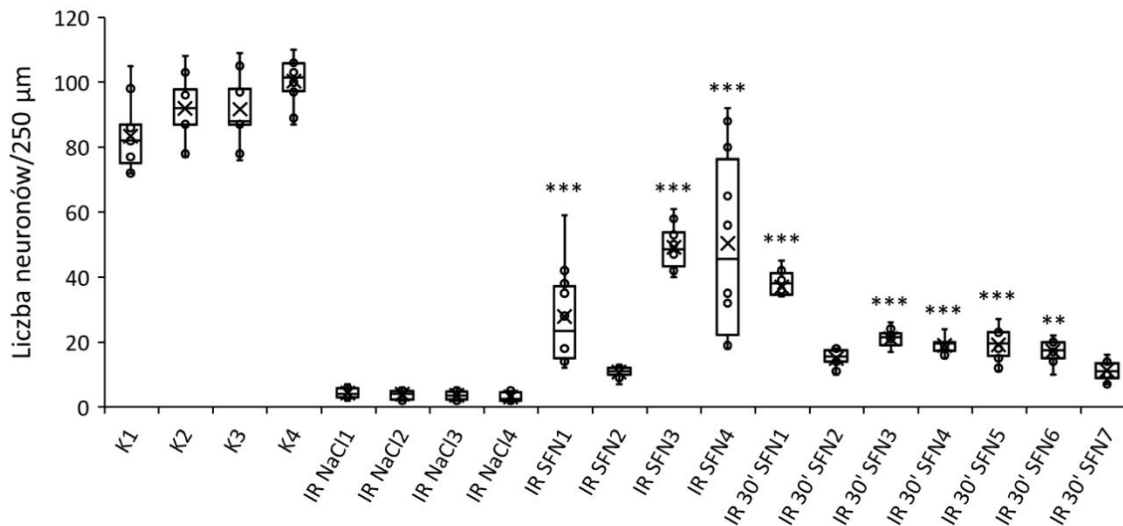
**Rycina 10.** Farmakologiczna aktywacja Nrf2 za pomocą sulforafanu (SFN) chroni neurony regionu CA1 przed uszkodzeniem ekscytotoksycznym w organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura.

**A.** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego reprezentatywnych skrawków hipokampa barwionych jodkiem propidyny. NMDA (25  $\mu$ M NMDA) powoduje rozległe uszkodzenie regionu CA1, które zmniejsza się po zastosowaniu 10  $\mu$ M SFN razem lub w 15- i 30-minutowym opóźnieniu w stosunku do NMDA.

**B.** Wykres pudełkowy prezentuje liczbę pikseli poszczególnych skrawków w stosunku do maksymalnego uszkodzenia 100  $\mu$ M NMDA (mediana, Q1, Q3) n = 7–14, \*\*\*p < 0,001

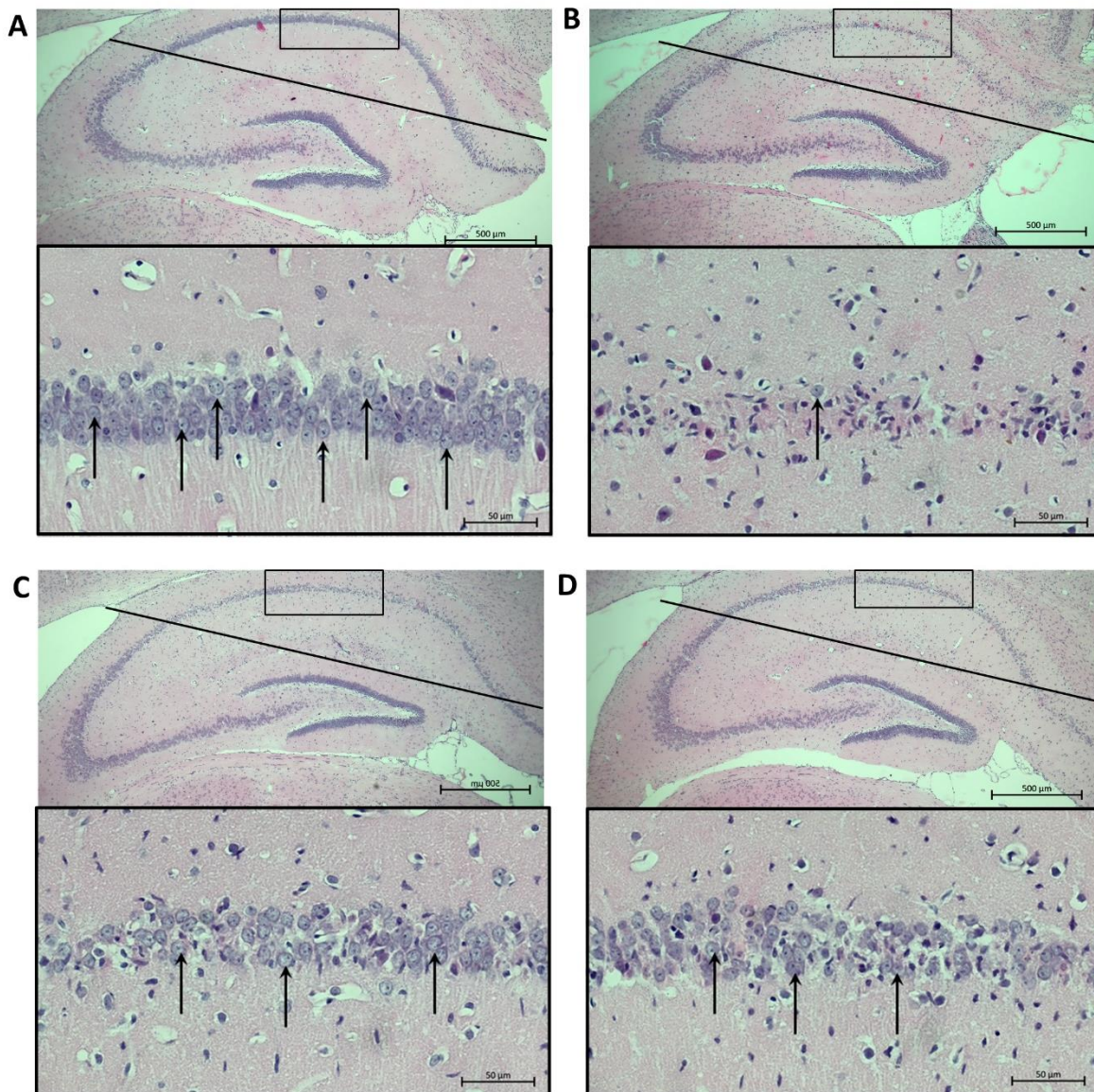
**Wpływ farmakologicznej aktywacji Nrf2 na przeżycie neuronów w regionie CA1 hipokampa w modelu krótkotrwałego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego**

Pozytywny wynik aktywacji Nrf2 i ochrona neuronów hipokampa w OHC skłoniła nas do powtórzeniu tych badań w modelu *in vivo*. Jak pokazano na Rycinie 12, u zwierząt poddanych niedokrwieniu i 7-dniowej reperfuzji, obrazowanie mikroskopowe wykazało uszkodzenie większości neuronów piramidowych w CA1 przy zachowanej morfologii neuronów w CA2-3, DG. W badaniu morfometrycznym regionu CA1 tych zwierząt stwierdzono średnio 4 +/- 0,6 (średnia +/- SD) neurony o prawidłowej morfologii (Ryc. 11). Po dootrzewnowym podaniu 5 mg/kg m.c. SFN w trakcie trwania niedokrwienia, w regionie CA1 obserwowano zwiększone zagęszczenie neuronów o prawidłowej morfologii w stosunku do nieleczonych zwierząt po I/R, a badanie morfometryczne wskazało 35 +/- 19 (średnia +/- SD) neuronów o prawidłowej morfologii (Ryc. 11, 12). Co ciekawe, podanie 5 mg/kg m.c. SFN 30 minut po zakończeniu niedokrwienia również poprawiło morfologię regionu CA1, a w badaniu morfometrycznym naliczono 20 +/- 7 (średnia +/- SD) prawidłowych neuronów. Jednocześnie nie obserwowano zmian morfologii neuronów regionu CA2-3, DG po podaniu SFN.



**Rycina 11.** Farmakologiczna aktywacja Nrf2 z użyciem pojedynczej dawki SFN (5mg/kg m.c.) w trakcie trwania I/R (IR SFN) lub w 30 minucie reperfuzji (IR 30' SFN) zwiększa liczbę prawidłowych neuronów w regionie CA1 hipokampa w porównaniu do zwierząt poddanych I/R którym podano NaCl (IR NaCl). Prawidłowe neurony liczone po 7 dniach reperfuzji z dziesięciu 250  $\mu$ m odcinków regionu CA1 (mediana, Q1, Q3) n = 10, p\*\* < 0,01, \*\*\*p < 0,001

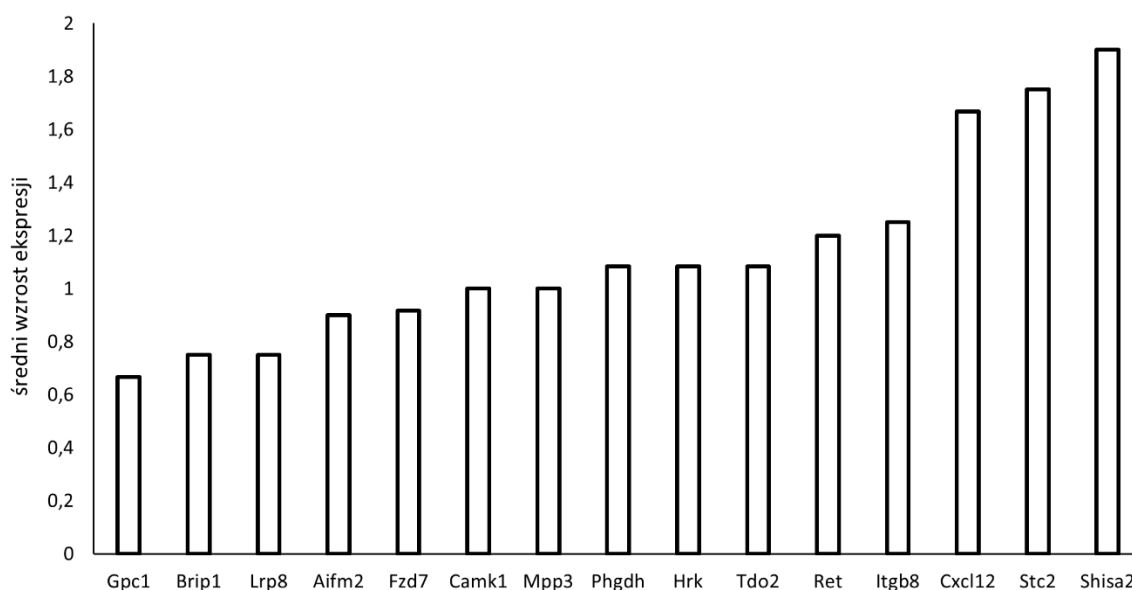




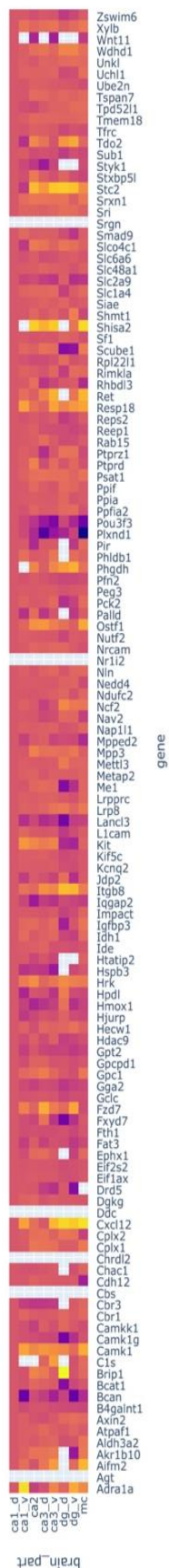
**Rycina 12.** Przykładowe zdjęcia hipokampów kontrolnych (A) oraz izolowanych ze zwierząt 7 dni po I/R (B, C, D) barwionych hematoksyliną i eozyną. A. Dobrze widoczne, prawidłowe neurony (strzałka) kontrolnego regionu CA1. B. Znaczne uszkodzenie regionu CA1 i prawie całkowity ubytek prawidłowych neuronów (strzałka) u osobnika po I/R któremu podano nośnik sulforafanu (NaCl) C i D. Zwiększona liczba prawidłowych neuronów (strzałka) w regionie CA1 po podaniu 5 mg/kg m.c sulforafanu w trakcie trwania niedokrwienia i w 30 minucie reperfuzji, odpowiednio.

## Analiza *in silico* danych pobranych z atlasu sekwencji RNA hipokampa myszy i banku genów regulowanych przez Nrf2

W celu wyłonienia nowych genów regulowanych przez Nrf2 zaangażowanych w naturalne mechanizmy obronne występujące w mózgu przeprowadzono analizę komputerową z wykorzystaniem technik eksploracji danych (ang. data mining). Analiza mapy termicznej pozwoliła na wyłonienie 15 genów o średniej ekspresji wyższej o co najmniej 50% w sektorach tworzących CA2-3, DG niż w CA1 (Ryc. 13, 14). Wyselekcjonowane geny to: *Gpc1*, *Brip1*, *Lrp8*, *Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1*, *Mpp3*, *Phgdh*, *Hrk*, *Tdo2*, *Ret*, *Itgb8*, *Cxcl12*, *Stc2* oraz *Shisa2*. Następnie wyłonione geny przeanalizowano w dostępnym piśmiennictwie pod względem lokalizacji, funkcji i procesów biologicznych w jakie zaangażowane są produkty białkowe (suplement Tabela 1S), a następnie poddano analizie ekspresji mRNA i białka na materiale pochodzącym z kontrolnego hipokampa suwaka mongolskiego oraz w przebiegu I/R.



**Rycina 13.** Wykres przedstawia listę 15 genów wyselekcjonowanych z analizy *in silico* uszeregowanych od genu o najniższym średnim wzroście ekspresji (*Gpc1*) do genu o najwyższym średnim wzroście ekspresji (*Shisa2*). Średni wzrost ekspresji liczono ze znormalizowanych względem ekspresji fragmentu CA1 grzbietowy (przyjętego za 0) oraz zlogarytmowanych wartości ekspresji tych genów we fragmentach kontrolnych hipokampa myszy: CA2 grzbietowy, CA3 grzbietowy i brzuszny, DG grzbietowy i brzuszny oraz MC (komórki mszyste).



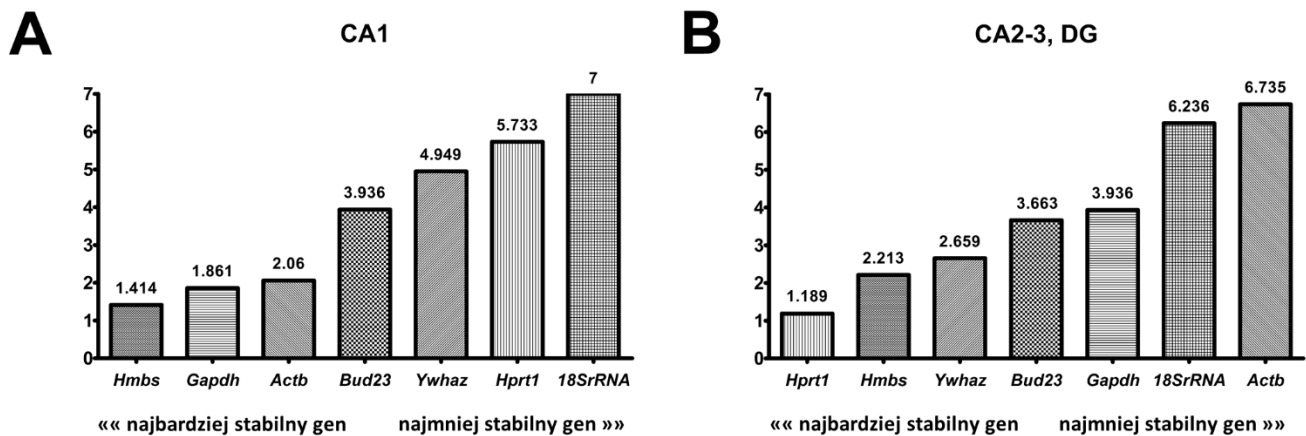
**Rycina 14.** Mapa termiczna logarytmicznej różnicy ekspresji genów regulowanych przez Nrf2 pomiędzy regionem CA1 grzbietowym a CA1 brzuszny, CA2 grzbietowy, CA3 grzbietowy i brzuszny, DG grzbietowy i brzuszny oraz MC (komórki mszyste) w hipokampie myszy. Kolor oznacza logarytm zmiany ekspresji. Pomarańczowy, żółty oznaczają 10x, 100x wzrost ekspresji w danej części w stosunku do fragmentu CA1 grzbietowy. Niebieski oznacza zmniejszenie ekspresji 100x. Szary kolor oznacza brak ekspresji genu w danym regionie.

## Walidacja genu referencyjnego do badania ekspresji genów w hipokampie w modelu krótkotrwałego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego

Przeprowadzenie analizy ekspresji genów z wykorzystaniem metody delta delta Ct wymaga normalizacji uzyskanych danych względem ekspresji, stabilnego w danym modelu, genu referencyjnego. W tym celu przeprowadzono analizę porównawczą 7 kandydatów na gen referencyjny: *Gapdh*, *Actb*, *18SrRNA*, *Hprt1*, *Hmbs*, *Ywhaz* oraz *Bud23* w modelu 5-minutowego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem ogólnodostępnego internetowego narzędzia RefFinder, łączącego 4 algorytmy: Delta Ct, BestKeeper, normFinder, geNorm. Do analizy wybrano 3 punkty czasowe po niedokrwieniu: 3, 48 i 72 godziny. Wybór został dokonany na podstawie długoletnich badań w Pracowni Biologii Molekularnej IMDiK PAN wskazujących na największą zmienność ekspresji genów właśnie w tych punktach czasowych w modelu niedokrwienia przedomózgowia suwaka mongolskiego (28, 29, 83, 84, 141-145).

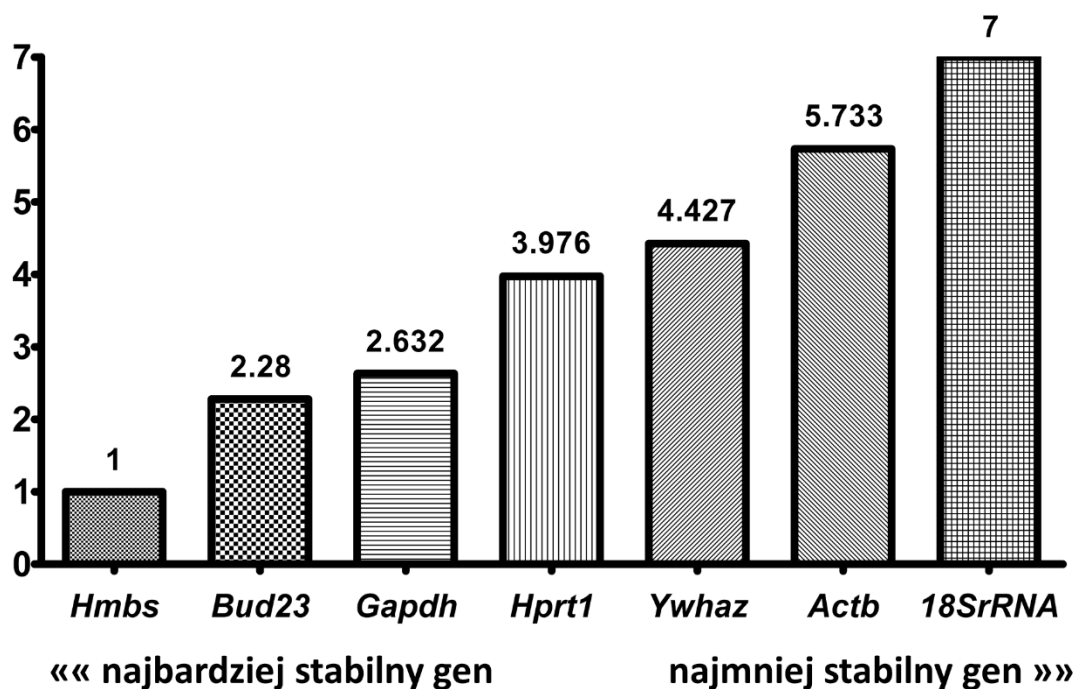
Ranking stabilności dla poszczególnych regionów hipokampa otrzymany w programie RefFinder wykazał, że najbardziej stabilnym (o najniższej średniej geometrycznej) genem referencyjnym w regionie CA1 hipokampa jest *Hmbs* (1,41), a w regionie CA2-3, DG *Hprt1* (1,19) (Ryc. 15). Drugim i trzecim najbardziej stabilnym genem był *Gapdh* (1,86) i *Actb* (2,06) dla CA1 oraz *Hmbs* (2,21) i *Ywhaz* (2,66) dla CA2-3, DG. Gen *Bud23* był czwarty pod względem stabilności w obu sektorach hipokampa. Kolejność pozostałych genów w części CA1 była następująca: *Ywhaz* > *Hprt1* > *18SrRNA*, a w części CA2-3, DG: *Gapdh* > *18SrRNA* > *Actb*. Analiza dwóch regionów hipokampa oddzielnie nie pozwoliła na wyłonienie wspólnego genu referencyjnego. W związku z tym przeprowadzono analizę łączną dla regionu CA1 i CA2-3, DG. Najbardziej stabilnym genem referencyjnym dla CA1+CA2-3, DG okazał się *Hmbs* ze średnią geometryczną równą 1 (Ryc. 16), co świadczy o tym, że był on pierwszy, co do stabilności we wszystkich 4 algorytmach łączonych w programie RefFinder (suplement Tabela 2S). Drugim i trzecim genem był *Bud23* (2,28) i *Gapdh* (2,63). Kolejność pozostałych genów w analizie łączonej była następująca *Hprt1* > *Ywhaz* > *Actb* > *18SrRNA*.

Szczegóły dotyczące walidacji genu referencyjnego w modelu krótkotrwałego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego zostały opublikowane w pracy Lewczuk A. i współpracownicy (146).



**Rycina 15.** Wykresy przedstawiają ranking stabilności 7 genów referencyjnych w regionie CA1 (A) oraz CA2-3, DG (B) hipokampa otrzymany w programie RefFinder. Wyniki przedstawione są w kolejności od najbardziej stabilnego genu (lewa strona wykresu) do genu najmniej stabilnego, n = 15.

## CA1 + CA2-3, DG



Rycina 16. Wykres prezentuje ranking stabilności 7 genów referencyjnych w łączonej analizie dwóch regionów hipokampa otrzymany w programie RefFinder. Wyniki przedstawione są w kolejności od najbardziej stabilnego genu (lewa strona wykresu) do genu najmniej stabilnego, n = 30.

### **Analiza porównawcza ekspresji genów wyselekcjonowanych w analizie *in silico* pomiędzy CA1 a CA2-3, DG w prawidłowym, kontrolnym hipokampie suwaka mongolskiego**

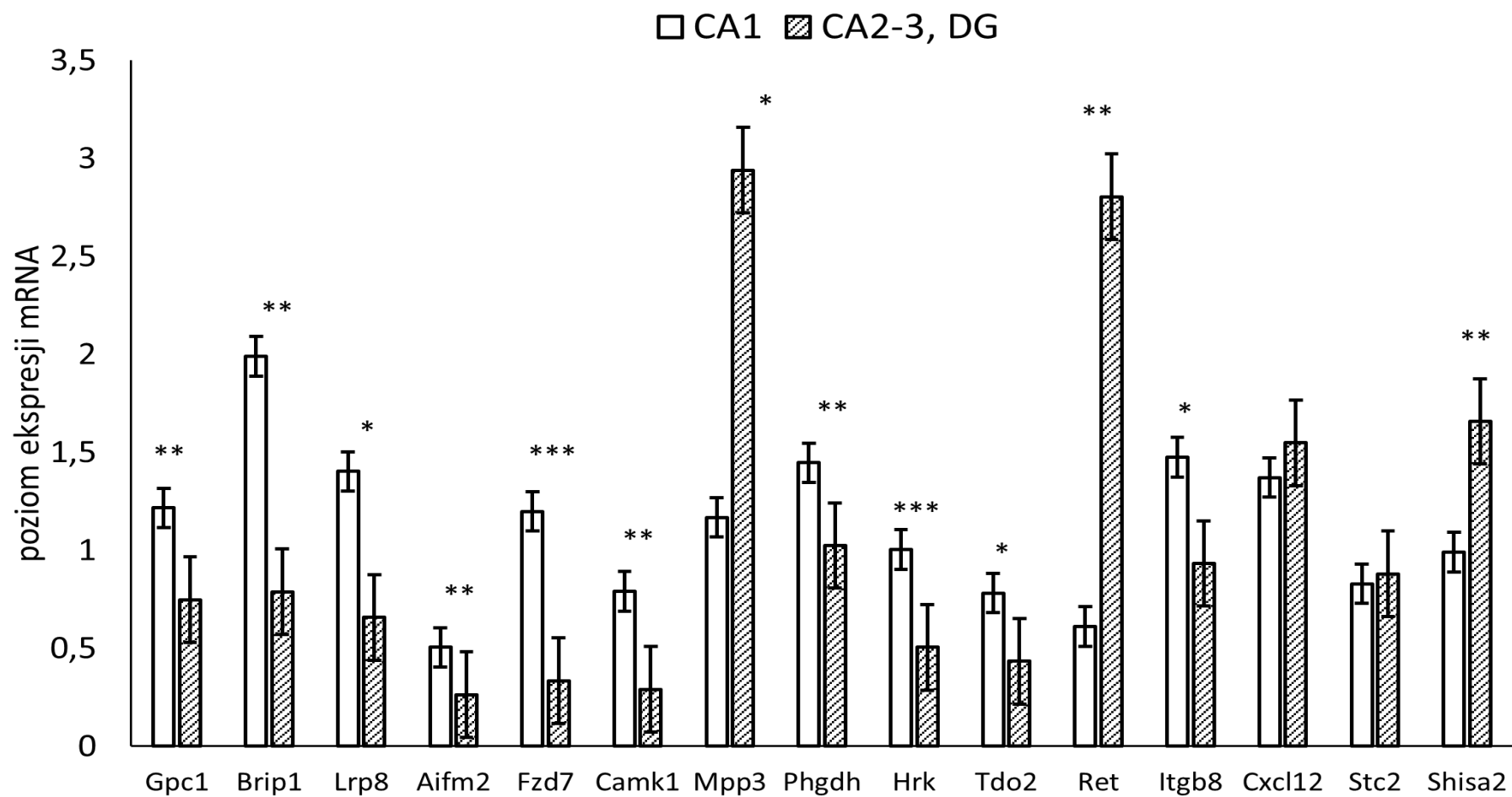
W celu sprawdzenia czy dane uzyskane w analizie *in silico* pokrywają się z ekspresją w mózgu suwaka mongolskiego, przeprowadzono analizę ekspresji wyselekcjonowanych genów w dwóch regionach hipokampa, CA1 i CA2-3, DG u kontrolnych zwierząt.

Spośród 15 wyselekcjonowanych genów 20%, czyli 3 geny: *Mpp3*, *Ret*, *Shisa2* pozytywnie weryfikują hipotezę analizy *in silico*, tj. wykazuje wyższą ekspresję w regionie CA2-3, DG niż w CA1 (Ryc. 17). W przypadku dwóch genów (*Cxcl12*, *Stc2*) nie zaobserwowano różnicy w poziomie ekspresji pomiędzy CA1 a CA2-3, DG. Pozostałe 10 genów (66,6%) (*Gpc1*, *Brip1*, *Lrp8*, *Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1*, *Phgdh*, *Hrk*, *Tdo2*, *Itgb8*) wykazuje statystycznie istotnie wyższą ekspresję w regionie CA1 niż w CA2-3, DG hipokampa kontrolnego suwaka mongolskiego.

Następnie, sprawdzono czy poziom ekspresji mRNA w dwóch regionach prawidłowego, kontrolnego hipokampa koreluje z poziomem immunoreaktywności produktu białkowego danego genu. Ze względu na: 1) brak przeciwciał specyficznych dla suwaka mongolskiego oraz 2) brak zgodności przeciwciał dla innych gatunków z materiałem pochodzącym z suwaka mongolskiego, przeanalizowano 9 białek.

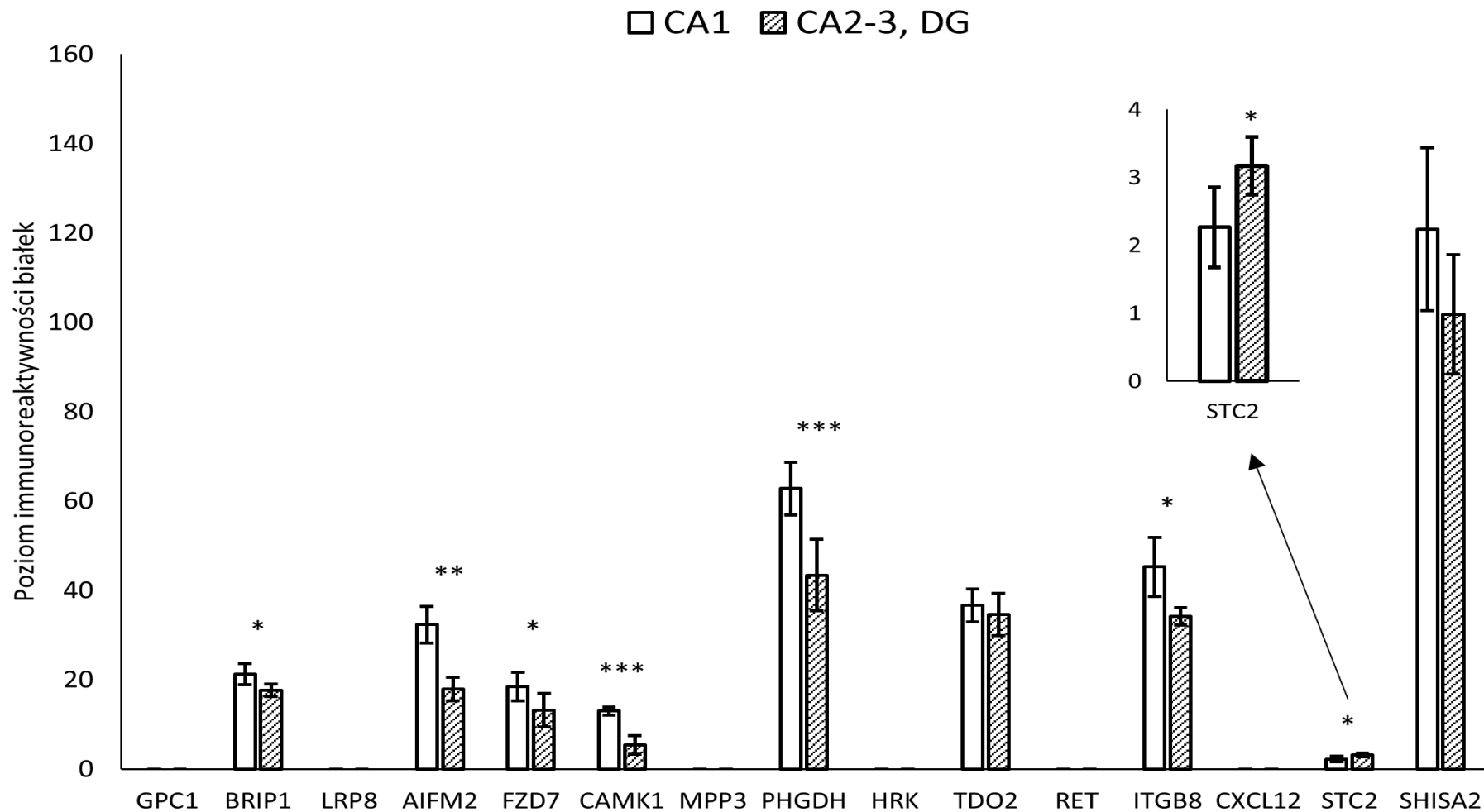
Jak pokazano na Rycinie 18, immunoreaktywność białka SHISA2, którego ekspresja mRNA była wyższa w CA2-3, DG niż w CA1, nie wykazywała różnic pomiędzy badanymi regionami w prawidłowym, kontrolnym hipokampie. Poziom immunoreaktywności białka STC2 był wyższy w CA2-3, DG niż w CA1, chociaż nie obserwowano różnicy na poziomie mRNA. Poziom immunoreaktywności TDO2 był taki sam w obu regionach hipokampa, natomiast ekspresja genu *Tdo2* była wyższa w regionie CA1 niż w CA2-3, DG. Dla pozostałych 6 białek, BRIP1, AIFM2/FSP1, FZD7, CAMK1, PHGDH oraz ITGB8, poziom immunoreaktywności białka był statystycznie istotnie wyższy w regionie CA1 niż CA2-3, DG i korelował z poziomem ekspresji genów.

Przedstawione dane wskazują, że większość analizowanych genów i/lub białek ma niższy poziom ekspresji w CA2-3, DG niż w CA1. Wynik ten może sugerować, że nie należą one do podstawowych genów/białek regulowanych przez Nrf2 w komórkach regionu CA2-3, DG hipokampa. W związku z tym, sprawdziliśmy poziom ekspresji genów i białek w przebiegu niedokrwienia w celu weryfikacji ich przynależności do grupy białek indukowanych przez Nrf2.



**Rycina 17.** Wykres przedstawia poziom ekspresji mRNA 15 genów wyselekcjonowanych w analizie *in silico* w dwóch regionach hipokampa, CA1 i CA2-3, DG, u kontrolnych suwaków mongolskich uzyskany za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qRT-PCR). Poziom ekspresji mRNA każdego genu normalizowano względem dwóch genów referencyjnych, Hmbs oraz Gapdh, z wykorzystaniem metody delta delta Ct (średnia +/- SD), n = 4-5, \*p < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\*p < 0.001





**Rycina 18.** Wykres przedstawia poziom immunoreaktywności 9 produktów białkowych genów wyselekcjonowane w analizie *in silico* w dwóch regionach hipokampa, CA1 i CA2-3, DG, u kontrolnych suwaków mongolskich uzyskany metodą Western blot. Poziom immunoreaktywności białek normalizowano względem LDHB (średnia +/- SD), n = 5-7, \*p < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\*p < 0.001

## **Ekspresja wyselekcjonowanych w analizie *in silico* genów, na poziomie mRNA oraz białka w dwóch regionach hipokampa po I/R**

W celu weryfikacji udziału Nrf2 w mechanizmach endogennej neuroprotekcji, do dalszej analizy, wyselekcjonowane geny zostały podzielone na dwie grupy (Tab. 6): **1)** geny potwierdzające wyniki uzyskane w analizie *in silico* tj. o ekspresji mRNA wyższej w CA2-3, DG niż CA1 oraz geny o takiej samej ekspresji w CA2-3, DG jak w CA1; **2)** geny o ekspresji mRNA wyższej w CA1 niż w CA2-3, DG (Tab. 6). Badania prowadzono w wybranych punktach czasowych po przywróceniu krążenia (24, 48, 72, 96 h), aby sprawdzić potencjalną korelację z aktywacją Nrf2 w odpornej na uszkodzenie części hipokampa (Ryc. 8).

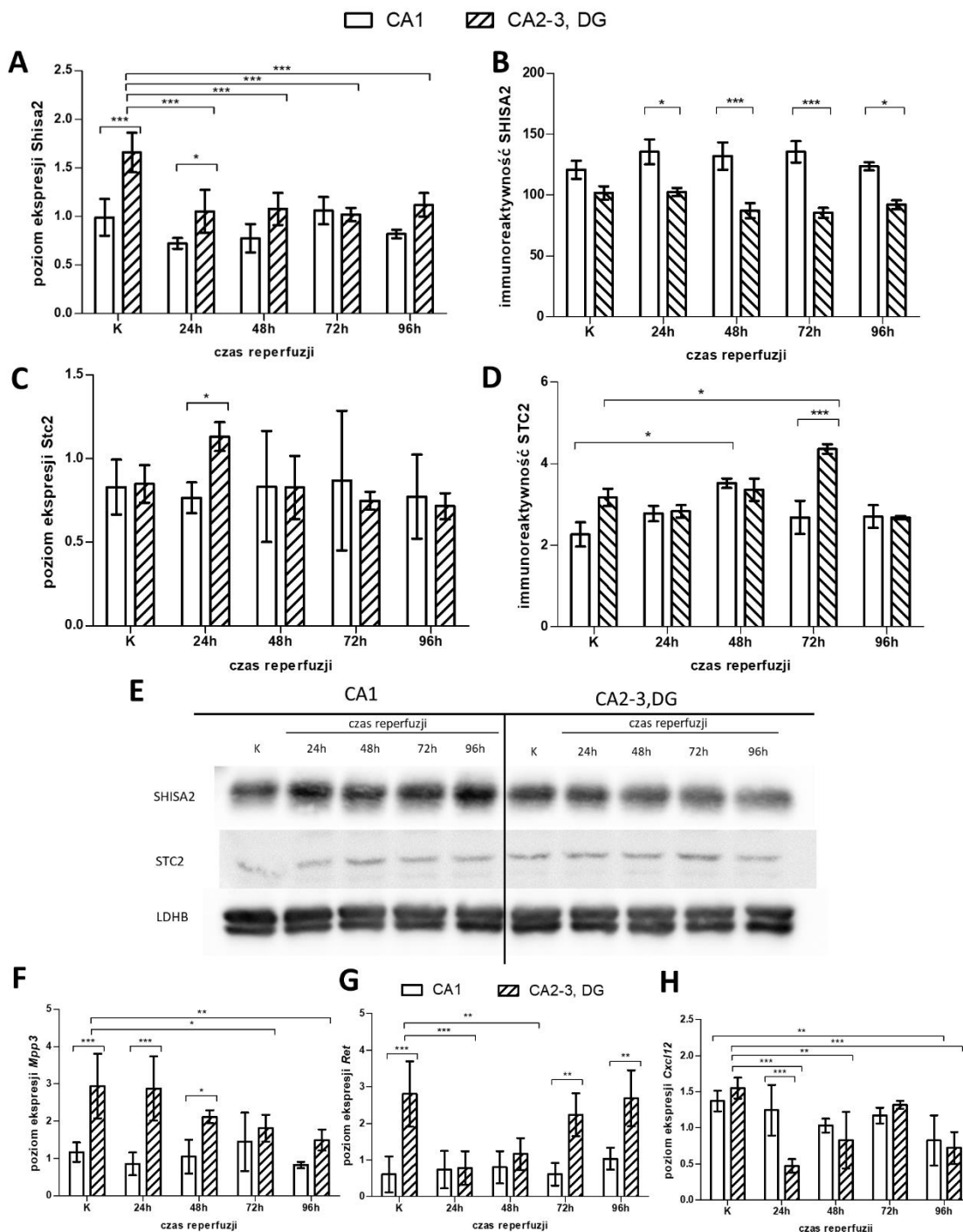
### Geny o ekspresji większej lub równej w regionie CA2-3, DG w porównaniu do CA1 (potwierdzające analizę *in silico*)

Analiza ekspresji mRNA genu *Shisa2* wykazała wyższy poziom ekspresji w regionie CA2-3, DG niż w CA1 w hipokampie kontrolnym (Ryc. 19 A), co jak już wspomniano, koreluje z wynikami otrzymanymi z analizy *in silico* (Ryc. 17). Co ciekawe, poziom mRNA *Shisa2* zmniejsza się w regionie CA2-3, DG i nie zmienia się w CA1 w przebiegu I/R. Pomimo, że nie obserwowano statystycznie istotnych zmian w immunoreaktywności białka SHISA2 w przebiegu I/R w żadnym z badanych regionów hipokampa, (Ryc. 19 B, E), to poziom białka SHISA2 był wyższy w regionie CA1 niż w CA2-3, DG w przebiegu I/R.

Poziom ekspresji mRNA *Stc2* był taki sam w regionach CA1 i CA2-3, DG w kontrolnym hipokampie i praktycznie nie zmieniał się w przebiegu I/R (Ryc. 19 C). W 24 godzinie reperfuzji pojawiła się przejściowa różnica w poziomie ekspresji *Stc2* pomiędzy badanymi regionami hipokampa (CA1 < CA2-3, DG) (Ryc. 19 C). Z kolei, na poziomie białka obserwowano przejściowy, krótkotrwały wzrost produktu białkowego w regionie CA2-3, DG w 72 godzinie reperfuzji (Ryc. 19 D, E).

W kontrolnym hipokampie, poziom ekspresji mRNA *Mpp3* oraz *Ret* był wyższy w regionie CA2-3, DG niż w CA1, a w przypadku *Cxcl12* nie różnił się pomiędzy badanymi regionami hipokampa (Ryc. 19 F, G, H). W przebiegu I/R poziom ekspresji *Mpp3* zmniejszał się w regionie CA2-3, DG w 72 i 96 godzinie

reperfuzji w stosunku do kontroli (Ryc. 19 F). Zmniejszoną ekspresję obserwowano również dla genów *Ret* i *Cxcl12*, z tą różnicą, że była ona widoczna już w 24 godzinie reperfuzy i wróciła do poziomu kontrolnego w 72 godzinie reperfuzy (Ryc. 19 G, H).



**Rycina 19.** Analiza ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR) (A, C, F, G, H) i Western blot (B, D, E) ekspresji genów i ich produktów białkowych, wyłonionych na podstawie analizy *in silico*, w dwóch regionach hipokampa (CA1 oraz CA2-3, DG) w kontroli i po I/R (24, 48, 72 i 96h). Wykresy przedstawiają: 1) Poziom ekspresji *Shisa2* (A) *Stc2* (C) oraz *Mpp3* (F), *Ret* (G) i *Cxcl12* (H) znormalizowane względem dwóch genów referencyjnych, *Hmbs* oraz

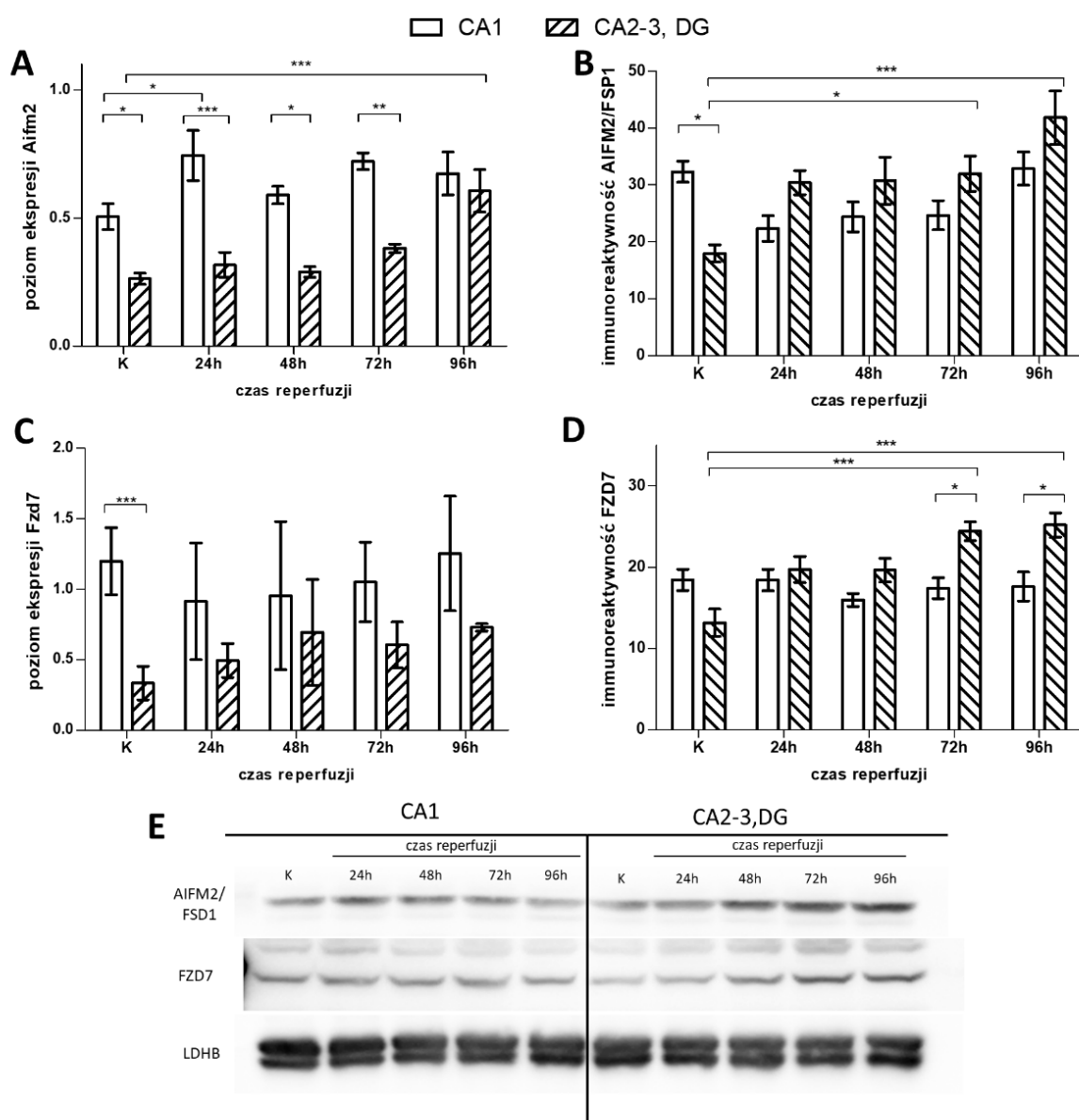
*Gapdh*, z wykorzystaniem metody delta delta Ct; 2) dane z analizy densytometrycznej immunoreaktywności białka SHISA2 (B, E) oraz STC2 (D, E) jako procent LDHB; (średnia +/- SD), n = 4-7, \*p < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\*p < 0.001. E Reprezentatywne Western blot dla SHISA2 i STC2 wraz z białkiem referencyjnym.

### Geny o ekspresji mRNA wyższej w CA1 niż w CA2-3, DG

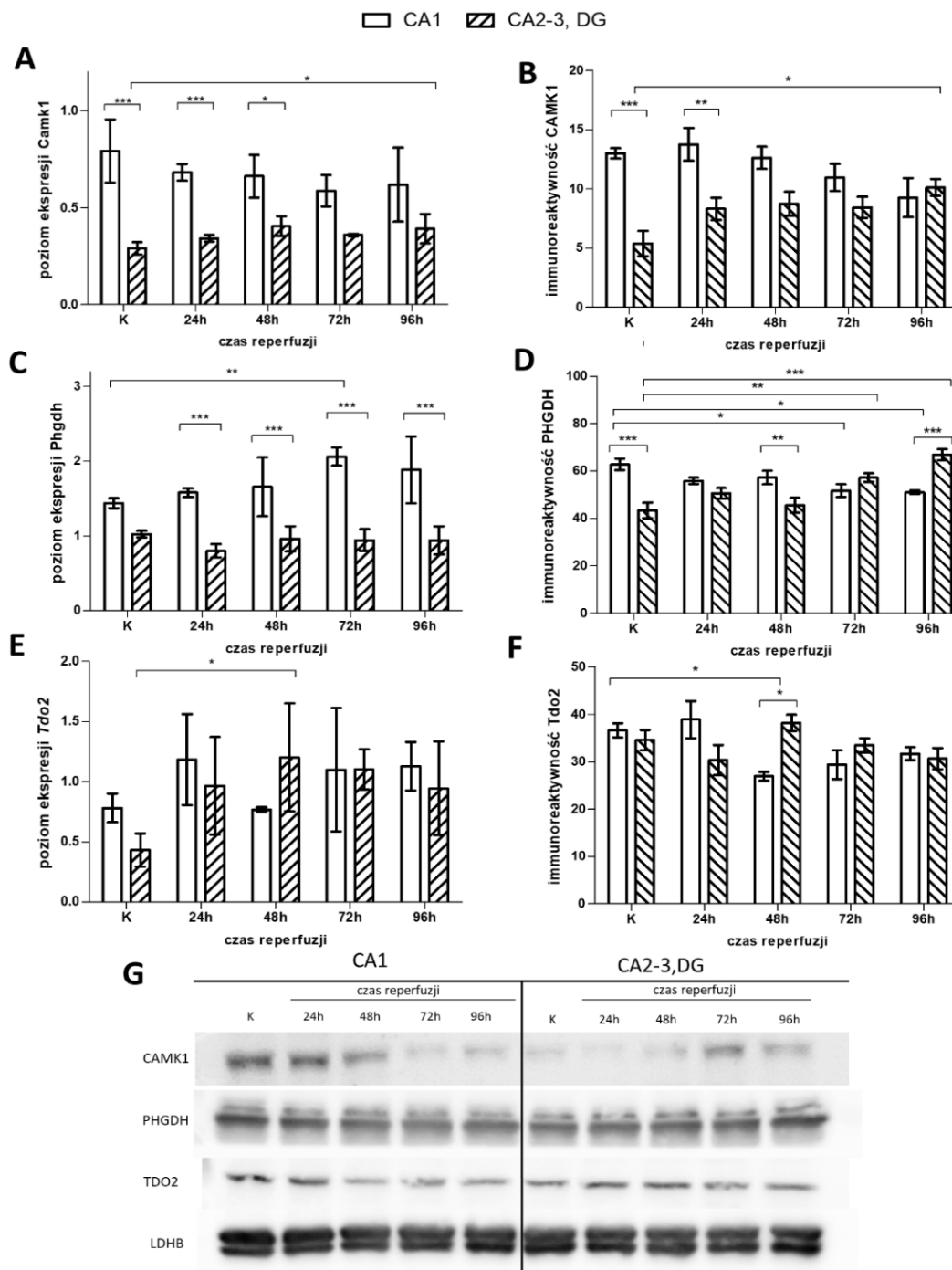
W kontrolnym mózgu poziom ekspresji mRNA oraz białka genu *Aifm2* w regionie CA1 jest wyższy niż w regionie CA2-3, DG (Ryc. 20 A). Co ciekawe, ekspresja mRNA *Aifm2* wzrasta w regionie CA1 w 24 godzinie reperfuzji w stosunku do kontroli, co jednak nie przekłada się na zmiany immunoreaktywności. Co więcej, wspomniany wzrost ekspresji mRNA *Aifm2* w 24 godzinie po I/R koreluje ze wzrostem aktywności Nrf2 we frakcji jądrowej w CA1 hipokampa w tym punkcie czasowym (Ryc. 8). Z kolei, w regionie CA2-3, DG zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA *Aifm2* w 96 godzinie reperfuzji w porównaniu do kontroli. W regionie CA2-3, DG zaobserwowano wzrost immunoreaktywności białka AIFM2/FSP1 w 72 i 96 godzinie reperfuzji (Ryc. 20 B, E), co koreluje z aktywnością Nrf2 w tej części hipokampa (Ryc. 8).

W kontrolnym hipokampie, poziom ekspresji mRNA *Fzd7* jest wyższy w regionie CA1 niż w CA2-3, DG, czego nie obserwujemy na poziomie produktu białkowego (Ryc. 20 C, D, E). W przebiegu I/R analiza zmian ekspresji mRNA oraz produktu białkowego genu *Fzd7* nie wykazała istotnych różnic w regionie CA1. Z kolei, w regionie CA2-3, DG hipokampa widoczna jest tendencja, wskazująca na wzrost ekspresji mRNA *Fzd7* po I/R co koreluje ze wzrostem poziomu białka FZD7 w regionie CA2-3, DG w 72 i 96 godzinie reperfuzji w stosunku do kontroli CA2-3, DG, jak i tożsamy czasów regionu CA1 (Ryc. 20 C, D, E).

Poziom ekspresji mRNA oraz produktu białkowego genu *Camk1* jest istotnie wyższy w regionie CA1 niż w CA2-3 DG w kontrolnym mózgu oraz 24 godziny po I/R (Ryc. 21 A, B, G). W przebiegu I/R zaobserwowano tendencję wzrostową ekspresji mRNA oraz produktu białkowego genu *Camk1* w regionie CA2-3, DG, która w 96 godzinie reperfuzji osiągnęła statystycznie istotny poziom w porównaniu z kontrolą CA2-3, DG.



**Rycina 20.** Analiza qRT-PCR (A, C) i Western blot (B, D, E) ekspresji genów i ich produktów białkowych, wyłonionych na podstawie analizy *in silico* ogólnodostępnych baz danych, w dwóch regionach hipokampa (CA1 oraz CA2-3, DG) w kontroli i po I/R (24, 36, 48, 72 i 96 h). Wykresy przedstawiają: 1) poziom ekspresji *Aifm2* (A) oraz *Fzd7* (C) znormalizowany względem dwóch genów referencyjnych, *Hmbs* oraz *Gapdh*, z wykorzystaniem metody delta delta Ct; 2) dane z analizy densytometrycznej białka AIFM1/FSD1 (B, E) oraz FZD7 (D, E) jako procent LDHB; (średnia +/- SD), n = 4-7, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. E Reprezentatywne Western blot dla AIFM2/FSD1 i FZD7 wraz z białkiem referencyjnym.



**Rycina 21.** Analiza qRT-PCR (A, C, E) i Western blot (B, D, F, G) ekspresji genów i ich produktów białkowych, wyłonionych na podstawie analizy *in silico* ogólnodostępnych baz danych, w dwóch regionach hipokampa (CA1 oraz CA2-3, DG) w kontroli i po I/R (24, 36, 48, 72 i 96 h). Wykresy przedstawiają: 1) poziom ekspresji *Camk1* (A) *Phgdh* (C) oraz *Tdo2* (E) znormalizowany względem dwóch genów referencyjnych, *Hmbs* oraz *Gapdh*, z wykorzystaniem metody delta delta Ct; 2) dane z analizy densytometrycznej białka CAMK1 (B, G) PHGDH (D, G) oraz TDO2 (F, G) jako procent LDHB; (średnia +/- SD), n = 4-7, \*p < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\*p < 0.001. E Reprezentatywne Western blot dla CAMK1, PHGDH i TDO2 wraz z białkiem referencyjnym.

W kontrolnym mózgu, analiza ekspresji mRNA *Phgdh* ujawniła brak różnic pomiędzy CA1 a CA2-3, DG (Ryc. 21 C). W przebiegu I/R zaobserwowano tendencję wzrostową ekspresji mRNA w regionie CA1 ze statystyczną istotnością w 72 godzinie reperfuzji, oraz brak zmian w CA2-3, DG. Z kolei, poziom białka PHGDH w kontroli był wyższy w CA1 niż w CA2-3, DG (Ryc. 21 D, G). Co ciekawe, w przebiegu I/R, w przeciwieństwie do zmian mRNA, zaobserwowano obniżenie poziomu białka PHGDH w regionie CA1 w 72 i 96 godzinie reperfuzji (Ryc. 21 D, G). Natomiast, w regionie CA2-3, DG poziom białka PHGDH wzrósł w 72 i 96 godzinie reperfuzji w stosunku do kontroli CA2-3, DG.

Poziom ekspresji mRNA *Tdo2* w regionie CA1 był wyższy niż w CA2-3, DG w kontroli, bez różnic w immunoreaktywność białka TDO2 (Ryc. 21 E, F, G). W przebiegu I/R poziom ekspresji mRNA *Tdo2* wzrastał w regionie CA2-3, DG jednak tylko w 48 godzinie reperfuzji wynik jest istotny statystycznie (Ryc. 21 E). Nie obserwowano zmian immunoreaktywności białka TDO2 w regionie CA2-3, DG. W regionie CA1 pojawiło się przejściowe obniżenie poziomu TDO2 w 48 godzinie reperfuzji (Ryc. 21 F, G).

W kontrolnym mózgu, poziom ekspresji mRNA genu *Brip1* był wyższy w regionie CA1 niż w CA2-3, DG (Ryc. 22 A). W przebiegu I/R nie obserwowano zmian ekspresji mRNA ani białka genu *Brip1* w regionie CA1. Z kolei, w regionie CA2-3, DG obserwowano wzrost ekspresji mRNA *Brip1* w 24, 48, 72 i 96 godzinie reperfuzji, co w 96 godzinie po I/R przełożyło się na wzrost poziomu jego produktu białkowego (Ryc. 22 A, B, E).

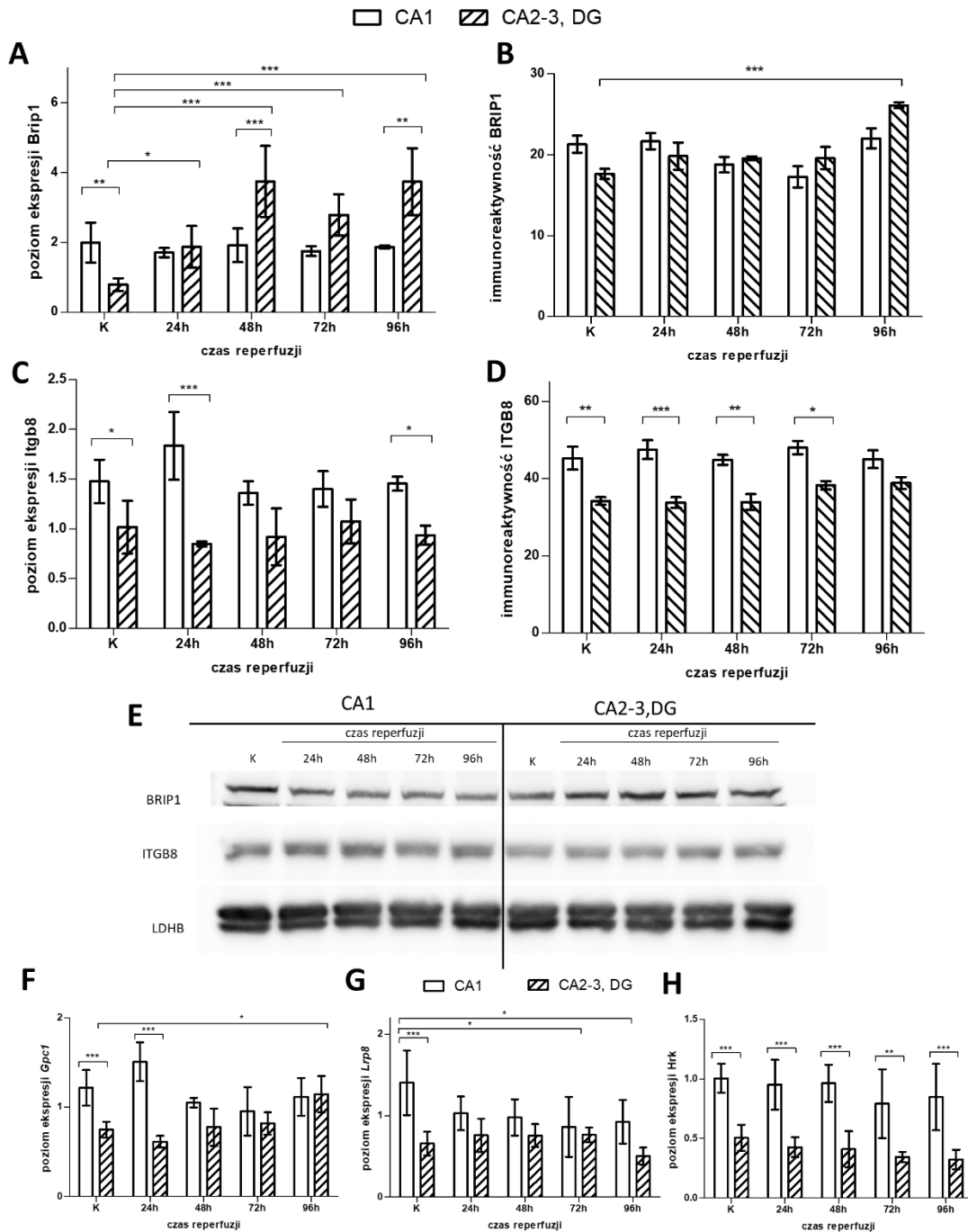
W przypadku ekspresji genu *Itgb8* poziom mRNA był wyższy w regionie CA1 niż w CA2-3, DG w kontrolnym mózgu oraz w 24 i 96 godzinie reperfuzji (Ryc. 22 C). W przebiegu I/R nie obserwowano zmian w poziomie ekspresji ani mRNA *Itgb8* ani białka ITGB8 w badanych regionach hipokampa (Ryc. 22 C, D, E).

Poziom ekspresji genu *Gpc1* był wyższy w CA1 niż w CA2-3, DG w warunkach kontrolnych i w 24 godzinie reperfuzji (Ryc. 22 F). Natomiast w przebiegu poniedokrwiennnej reperfuzji zaobserwowano wzrost ekspresji *Gpc1* w 96 godzinie po przywróceniu krążenia w CA2-3, DG. Analiza ekspresji genów *Lrp8* i

*Hrk* wykazała wyższy poziom mRNA w kontrolnym CA1 niż w CA2-3, DG (Ryc. 22 G, H). W przebiegu I/R ekspresja *Lrp8* obniżała się w CA1 w 72 i 96 godzinie reperfuzy i nie ulegała zmian w CA2-3, DG. W przypadku *Hrk* ekspresja nie ulegała zmian w żadnym z badanych regionów.

Podsumowanie wyników weryfikujących badania *in silico* oraz efekty I/R na ekspresję wybranych genów przedstawiono w Tabeli 6. Wykazano, że w kontrolnym mózgu suwaka 3 spośród 15 wyselekcjonowanych genów ma wyższą ekspresję mRNA w CA2-3, DG niż w CA1. Zależność ta nie jest jednak w pełni odzwierciedlana na poziomie produktu białkowego. Analizy metodą Western blot wykazały, że jedynie białka STC2 jest więcej w regionie CA2-3, DG niż w CA1. Zależności te zmieniają się po bodźcu I/R. Spośród badanych 15 genów, 6 zwiększyło ekspresję mRNA po I/R w CA2-3, DG (*Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1*, *Tdo2*, *Brip1* oraz *Gpc1*) i nie są to geny, których mRNA przeważają w kontrolnym, prawidłowym hipokampie. Natomiast poniedokrwienne przyrosty białek wykazano dla 6 produktów białkowych badanych genów: AIFM2/FSP1, FZD7, CAMK1, PHGDH, BRIP1 oraz STC2. Wydaje się zatem, że w CA2-3, DG, po niedokrwieniu mózgu następuje indukcja ekspresji Nrf2-zależnych genów, co koreluje z aktywacją Nrf2 w tych rejonach hipokampa (Ryc. 8). Co ciekawe, zmiany ekspresji genów nie zawsze są odzwierciedlane na poziomie produktów białkowych.





**Rycina 22.** Analiza qRT-PCR (A, C, F, G, H) i Western blot (B, D, E) ekspresji genów i ich produktów białkowych, wyłonionych na podstawie analizy *in silico* ogólnodostępnych baz danych, w dwóch regionach hipokampa (CA1 oraz CA2-3, DG) w kontroli i po I/R (24, 36, 48, 72 i 96 h). Wykresy przedstawiają: 1) poziom ekspresji *Brip1* (A) *Itgb8* (C) *Gpc1* (F), *Lrp8* (G) i *Hrk* (H) znormalizowany względem dwóch genów referencyjnych, *Hmbs* oraz *Gapdh*, z wykorzystaniem metody delta delta Ct; 2) dane z analizy densytometrycznej białka BRIP1 (B, E) oraz ITGB8 (D, E) jako procent LDHB; (średnia +/- SD), n = 4-7, \*p < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\*p < 0.001. E Reprezentatywne Western blot dla SHISA2 i STC2 wraz z białkiem referencyjnym.

**Tabela 6.** Podsumowanie wyników badania ekspresji genów wyselekcjonowanych w analizie *in silico* oraz ich produktów białkowych w przebiegu reperuzji po 5-minutowym niedokrwieniu przodomózgowia suwaka mongolskiego w porównaniu do aktywności Nrf2 w regionie CA2-3, DG hipokampa.

NAZWA GENU	NAZWA BIAŁKA	POTWIERDZENIE ANALIZY IN SILICO (mRNA CA1 < CA2-3, DG)	GENY Nrf2-ZALEŻNE INDUKOWANE PRZEZ I/R	
			<u>EKSPRESJA GENU</u>	<u>EKSPRESJA BIAŁKA</u>
<i>Gpc1</i>	Glypikan 1 – GPC1	NIE	TAK	Brak danych
<i>Brip1</i>	Helikaza 1 oddziałująca z białkiem BRAC1 - BRIP1	NIE	TAK	TAK
<i>Lrp8</i>	Apolipoproteina E receptor 2 – APOEr2	NIE	NIE	Brak danych
<i>Aifm2</i>	Białko hamujące ferroptozę 1 – AIFM2/FSP1	NIE	TAK	TAK
<i>Fzd7</i>	Białko Frizzled-7 – FZD7	NIE	Tendencja	TAK
<i>Camk1</i>	Kinaza typu I zależna od jonów wapnia i kalmoduliny – CAMK1	NIE	TAK	TAK
<i>Mpp3</i>	Białko podrodziny MAGUK p55 – MPP3	TAK	NIE	Brak danych
<i>Phgdh</i>	Dehydrogenaza D-3-fosfoglicerynianowa - PHGDH	NIE	NIE	TAK
<i>Hrk</i>	Aktywator apoptozy harakiri – HRK	NIE	NIE	Brak danych
<i>Tdo2</i>	2,3-dioksygenaza tryptofanu – TDO2	NIR	TAK	NIE
<i>Ret</i>	Proto-onkogen białka receptorowego kinazy tyrozynowej RET – RET	TAK	NIE	Brak danych
<i>Itgb8</i>	Integryna beta-8 – ITGB8	NIE	NIE	NIE
<i>Cxcl12</i>	Czynnik pochodzenia stromalnego 1 – SDF1	NIE	NIE	Brak danych
<i>Stc2</i>	Stanniokalcyna-2 – STC2	NIE	NIE	TAK
<i>Shisha2</i>	Homolog białka shisa2 / SHISA2	TAK	NIE	NIE

Brak danych – brak przeciwciała i/lub brak reakcji przeciwciała swoistego dla innego gatunku na materiale pochodzącym z suwaka mongolskiego

## Dyskusja

Wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw różnej wrażliwości regionów hipokampa na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (I/R) ma znaczenie nie tylko naukowe, ale również praktyczne. W niniejszej rozprawie doktorskiej zweryfikowano: udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w mechanizmach endogennej neuroprotekcji w obszarze CA2-3, DG hipokampa, wpływ farmakologicznej aktywacji Nrf2 na przeżycie neuronów regionu CA1 hipokampa oraz wskazano nowe, dotychczas niebadane w kontekście endogennej neuroprotekcji, geny regulowane przez Nrf2, z wykorzystaniem modelu krótkotrwałego niedokrwienia przedomózgowia suwaka mongolskiego (oraz organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura).

Procesy zaangażowane w odporność regionu CA2-3, DG hipokampa na epizod niedokrwienno-reperfuzyjny są złożone i obejmują liczne szlaki komórkowe. Jednym z białek regulujących wiele funkcji pro-życiowych komórki jest czynnik transkrypcyjny Nrf2 (147-150). Czynnik ten reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za procesy antyoksydacyjne, przeciwzapalne, detoksykacyjne czy reguluje funkcję mitochondriów (147, 150, 151). Doświadczenia przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały, że odporny na uszkodzenie sektor hipokampa (CA2-3, DG) charakteryzuje się wyższą aktywnością Nrf2 we frakcji jądrowej niż region podatny na uszkodzenie (CA1) już w prawidłowym, kontrolnym mózgu dorosłego suwaka, a bodziec niedokrwienno-reperfuzyjny powoduje znaczny i długotrwały wzrost aktywności Nrf2 w CA2-3, DG w przeciwieństwie do niewielkiego i krótkotrwałego wzrostu w CA1 (Ryc. 8). Wysoka aktywność Nrf2 w kontrolnym CA2-3, DG znajduje odzwierciedlenie w wyższej ekspresji białek regulowanych przez Nrf2: oksygenazy hemowej (HO-1), peroksydazy glutationowej 1 (GPx1), dwóch podjednostek ligazy glutaminianowo-cysteinowej, podjednostki katalitycznej (GCLC) i podjednostki modulatorowej (GCLM). Obserwowane zmiany ekspresji białek regulowanych przez Nrf2 po I/R korelują ze zmianami poziomu Nrf2 we frakcji jądrowej potwierdzają obecność aktywnego Nrf2.

Dotychczasowe badania w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu potwierdzają udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w mechanizmach chroniących komórki przed uszkodzeniem oraz jego wpływ na redukcję obrzęku mózgu czy wielkość zawału (90, 152). Co więcej, wiele badań dowodzi, że ekspresja Nrf2 wzrasta w odpowiedzi na niedokrwienie. W mysim modelu przejściowej okluzji tętnicy środkowej mózgu (tMCAO) zaobserwowano wzrost immunoreaktywności Nrf2 i HO-1 w 24 godziny po niedokrwieniu w korze mózgu oraz prążkowi półkuli objętej niedokrwieniem (148). Wzrost Nrf2 był jednak przejściowy i w 48 godzinie po tMCAO zmiana nie była istotna statystycznie. Inne badania wykorzystujące ten sam model wykazały, za pomocą barwienia immunohistochemicznego, wzrost komórek Nrf2 pozytywnych w obszarze okołozawałowym, w 8, 24 i 72 godzinie po tMCAO ze szczytem w 8 godzinie (153). Co ciekawe, grupa ta zaobserwowała również zmniejszenie liczby komórek KEAP1 pozytywnych, już od drugiej godziny po tMCAO, utrzymujące się do 72 godziny po tMCAO. Wzrost Nrf2 korelował ze wzrostem poziomu białek przez niego regulowanych: TRX (tiodoksyna), GSH (glutation) i HO-1 (oksygenaza hemowa 1) (153). W modelu tMCAO u szczura, Lou i współpracownicy wykazali wzrost immunoreaktywności Nrf2 i HO-1 24 godziny po niedokrwieniu w ekstraktach białkowych otrzymanych z całego hipokampa (154). Podobne wyniki otrzymali Ren i współpracownicy, którzy badali poziom Nrf2 w jądrach komórkowych oraz HO-1 w cytoplazmie komórek kory mózgowej szczura po tMCAO (155). Zaobserwowali wzrost Nrf2 i HO-1 już 2 godziny po niedokrwieniu, który utrzymywał się do 24 godziny po I/R. W badaniu z wykorzystaniem szczurzego modelu przejściowego, globalnego niedokrwienia mózgu (zaciśnięcie czterech naczyń na 10 minut) immunoreaktywność jądrowego Nrf2 nie ulegała zmianie w regionie CA1 hipokampa w 6, 24 i 72 godzinie I/R, chociaż w 30 minucie reperfuzji pojawiła się tendencja wzrostowa (156). W innym szczurzym modelu, 3 dni po 20 minutowym zaciśnięciu dwóch tętnic szyjnych badacze zaobserwowali wzrost całkowitego i cytoplazmatycznego Nrf2, bez zmian w poziomie jądrowego Nrf2 oraz białka efektorowego - HO-1 (157). Co ciekawe, w badaniu z wykorzystaniem suwaków mongolskich poddanych 5-minutowemu zaciśnięciu tętnicy szyjnych, Park i współpracownicy, zaobserwowali nieznaczny

wzrost immunoreaktywności Nrf2 we frakcji jądrowej otrzymanej z regionu CA1 hipokampa w 48 godzinie reperfuzji (158).

Jak przedstawiono powyżej, większość badań – w tym te przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej – potwierdzają hipotezę o aktywacji ścieżki Nrf2 w różnych modelach udaru mózgu. Większość z nich ogranicza się jednak do badania pojedynczych punktów czasowych. Nasze badania, poprzez uwzględnienie wielu punktów czasowych w trakcie reperfuzji, pozwoliły na prześledzenie dynamiki zmian jądrowego poziomu Nrf2 w dwóch regionach hipokampa, CA1 i CA2-3, DG, odmiennie reagujących na bodziec I/R. Wysoki, wyjściowy poziom Nrf2 w odpornym na uszkodzenie regionie hipokampa (CA2-3, DG) oraz dodatkowy wzrost pojawiający się w 48 i 72 godzinie reperfuzji odpowiadają dwufazowej tolerancji opisywanej w hartowaniu niedokrwinnym (159, 160). Wczesna tolerancja (zwana również klasyczną lub szybką) rozpoczyna się już 30 minut po negatywnym bodźcu i trwa przez około 2 godziny. Natomiast drugie okno tolerancji występuje około 24 godziny później i może trwać od 2 do 7 dni. Każda z faz tolerancji reprezentuje dwa odmiennie mechanizmy działania. Wczesna tolerancja na negatywny bodziec związana jest ze zmianą aktywności i/lub modyfikacją potranslacyjną już istniejących białek, natomiast opóźniona tolerancja wymaga zmiany ekspresji genów oraz syntezy białek *de novo*, co wymaga czasu i związane jest z przeprogramowaniem genetycznym (161). Idąc tym tropem, wydaje się, że odporna na uszkodzenie część hipokampa jest przygotowana na ochronę neuronów w warunkach zadziałania negatywnego bodźca poprzez wysoki poziom Nrf2 już w warunkach kontrolnych (wczesna tolerancja) oraz na rozwój „pełnowymiarowej” protekcji poprzez wzrost aktywnego Nrf2 we frakcji jądrowej 2 dni od niedokrwienia (późna tolerancja). Z kolei, krótkotrwały wzrost poziomu Nrf2 we frakcji jądrowej regionu CA1, który pojawia się w 24 godzinie reperfuzji można uznać za próbę uruchomienia mechanizmów ochronnych w tej części hipokampa. Prawdopodobnie jednak wzrost ten jest za słaby aby wywołać efekt. Brak następstw związanych ze wzrostem Nrf2 w CA1 można również tłumaczyć trwałym zahamowaniem syntezy białek w niedokrwiniennych neuronach tego regionu (162) co uniemożliwia translację białek regulowanych przez Nrf2. Co ciekawe, wzrost

Nrf2 w regionie CA1 hipokampa koreluje z obniżeniem poziomu jego cytoplazmatycznego inhibitora – KEAP1 – w tym regionie. Wynik ten może sugerować, że aktywacja Nrf2 w regionie CA1 związana jest z obniżeniem poziomu KEAP1. Nie zaobserwowano zmian w poziomie KEAP1 w regionie CA2-3, DG co może sugerować utlenienie reszt cysteinowych KEAP1 w wyniku I/R, uwolnienie Nrf2 z kompleksu i jego translokację do jądra komórki (Ryc. 2) lub wynikać z innego mechanizmu aktywacji Nrf2.

Czynnik transkrypcyjny Nrf2 uważany jest za jeden z głównych regulatorów odpowiedzi antyoksydacyjnej komórki. Można przypuszczać zatem, że komórki odporne na uszkodzenie, bogate w Nrf2, powinny posiadać dobrze rozwinięte mechanizmy obronne przed stresem oksydacyjnym. W celu weryfikacji tego założenia sprawdzono poziom białek biorących udział w syntezie i utlenianiu glutationu – GCLC, GCLM oraz GPx1. GCLC oraz GCLM katalizują pierwszy etap, limitujący szybkość, syntezы glutationu (163). Natomiast GPx1 bierze udział w reakcji utlenienia glutationu/redukcji wolnych rodników (164). Jak wynika z naszych badań, immunoreaktywność tych białek jest wyższa w CA2-3, DG niż w CA1, już w prawidłowym, kontrolnym mózgu a w przebiegu I/R różnica ta pogłębia się na korzyść CA2-3, DG (Ryc. 9). Wynik ten z jednej strony potwierdza, większą aktywność Nrf2 w CA2-3, DG, a z drugiej, dowodzi że procesy przeciwutleniające dominują w CA2-3, DG. Stąd, komórki regionu CA2-3, DG wydają się być przygotowane na dodatkową syntezę glutationu oraz wymiatanie wolnych rodników. W badaniu z wykorzystaniem myszy pozbawionych GPx1 i poddanych 2-godzinnemu MCAO, zaobserwowano wzrost poziomu nadtlenków lipidowych oraz wzrost wielkości zawału i liczby martwych komórek w korze mózgu (165), co potwierdza naszą koncepcję. Co ciekawe, mysie fibroblasty embrionalne (MEF ang. mouse embryonic fibroblasts) pozbawione Nrf2 zawierają około 20% mniej glutationu niż fibroblasty dzikie, co związane jest z obniżeniem poziomu GCLC oraz GCLM (166). Dane te sugerują, że wysoki poziom białek związanych z syntezą i metabolizmem glutationu zapewnia komórkom regionu CA2-3, DG ochronę przed stresem oksydacyjnym, a przynajmniej zapewnia dostępność jednej ze ścieżek ochrony przed nim. Podobny wzór immunoreaktywności jak dla GCLC, GCLM i

GPx1 otrzymaliśmy dla HO-1 (Ryc. 9). Oksygenaza hemowa 1 katalizuje reakcję degradacji hemu do tlenku węgla, jonów żelaza i biliwerdyny. Powstająca biliwerdyna jest redukowana do silnego przeciwutleniacza jakim jest bilirubina (167, 168). Tlenek węgla reguluje apoptozę, proliferację komórek, stany zapalne, włóknienie i angiogenezę (169). Natomiast obecność wolnych jonów żelaza indukuje syntezę ferrytyny, która je wychwytuje i wiąże. (167). Jest to istotne, ponieważ wolne jony żelaza, jak również tlenek węgla, mogą mieć negatywny wpływ na komórki poprzez zwiększanie stresu oksydacyjnego (170). Badania w modelu tMCAO u szczurów wykazały, że aktywacja ścieżki Nrf2/HO-1 chroni neurony po I/R przed ferroptozą (171). Natomiast badania w mysim modelu dwukrotnej, 20-minutowej dwustronnej okluzji tętnicy szyjnej wspólnej wykazały wzrost poziomu Nrf2 i HO-1 w hipokampach myszy 4 tygodnie po I/R, a farmakologiczna aktywacja Nrf2 i HO-1 poprawiła morfologię neuronów regionu CA1 (172).

Wyniki badań dotyczące białek regulowanych przez Nrf2: GCLC, GCLM, GPx1 oraz HO-1 korelują z danymi uzyskanymi w naszych badaniach dotyczących Nrf2 (Ryc. 8). Analizując zmiany poziomu tych białek w hipokampie w porównaniu z aktywnością Nrf2 po I/R można powiedzieć, że białka GCLM, GPx1 oraz HO-1 należą do białek podstawowych jak i indukowanych przez Nrf2 ze względu na ich wyższą immunoreaktywność w warunkach kontrolnych w CA2-3, DG niż w CA1 oraz wzrost poziomu w 48 i 72 godzinie reperfuzji. Natomiast GCLC charakteryzuje się takim samym poziomem w obu regionach hipokampa w kontroli i wzrostem w 48 i 72 godzinie reperfuzji w regionie CA2-3, DG co czyni go białkiem indukowanym przez Nrf2.

Dotychczasowe badania oraz prezentowane tutaj wyniki, wskazują na udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w mechanizmach endogennej neuroprotekcji. Sprawdzone zatem czy farmakologiczna aktywacja Nrf2 ochroni neurony wrażliwego na uszkodzenie sektora hipokampa (CA1). Rezultaty doświadczeń z użyciem sulforafanu (SFN) – aktywatora Nrf2 – wykazują, że jego zastosowanie zmniejsza liczbę martwych neuronów w regionie CA1 hipokampa zarówno w modelu *ex vivo* (organotypowa hodowla skrawków hipokampa szczura) jak i *in vivo* (5-minutowe zaciśnięcie tętnic szyjnych suwaka mongolskiego). Co więcej, efekt ten

obserwowano zarówno, gdy aktywator podawano w trakcie trwania uszkodzenia jak i w opóźnieniu do negatywnego bodźca (Ryc. 10, 11, 12). W modelu OHC podanie 10  $\mu$ M SFN 15 lub 30 minut po rozpoczęciu uszkodzenia ekscytotoksycznego nadal zmniejszało liczbę uszkodzonych komórek w regionie CA1 hipokampa w stosunku do samego NMDA (Ryc. 10). W badaniu z wykorzystaniem modelu *in vivo* efekt ochronny SFN był nadal widoczny nawet jeżeli aktywator podano w 30 minucie reperfuzji dootrzewnowo w dawce 5 mg/kg m.c. (Ryc. 11, 12). Wyniki te świadczą, że farmakologiczna aktywacja Nrf2 w trakcie lub po uszkodzeniu I/R uruchamia mechanizmy pozwalające przetrwać komórkom regionu CA1 hipokampa działanie szkodliwego bodźca. Badania prowadzone w różnych modelach niedokrwienia mózgu również potwierdzają, że aktywacja Nrf2 zmniejsza obszar martwicy mózgu oraz liczbę martwych neuronów chroniąc tym samym mózg przed szkodliwym/negatywnym bodźcem. W modelu lewostronnego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu szczurów, jednokrotne podanie 5 mg/kg m.c. SFN w 15 minucie trwania niedokrwienia zmniejszało wielkość obszaru martwicy mózgu 3 dni po procedurze (173). Zaobserwowano również wzrost ekspresji genu *Hmox-1* oraz immunoreaktywności HO-1 w neuronach i astrocytach 24 godziny po niedokrwieniu (173). W modelu niedotlenieniowo-niedokrwiennym (HI) osesków szczurzych, jednokrotne podanie 5 mg/kg m.c. SFN 30 minut przed rozpoczęciem niedokrwienia, zmniejszało obszar mózgu objęty uszkodzeniem oraz liczbę martwych neuronów w korze oraz hipokampie 24 godziny po HI (134). W modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa myszy, poddanych toksycznemu działaniu heminy lub pozbawieniu tlenu i glukozy, zastosowanie 0,5  $\mu$ M SFN 24 godziny przed heminą lub podczas przywracania warunków tlenowych, zwiększało procent żywych komórek wybarwionych kalceiną (174). W celu potwierdzenia udziału Nrf2 w ochronie bariery krew-mózg przez SFN, Zhao i współpracownicy, podali SFN osobnikom pozbawionym Nrf2 (myszy Nrf2<sup>-/-</sup>) w modelu traumatycznego uszkodzenia mózgu. Ochronny efekt SFN na barierę krew-mózg zaobserwowany u dzikich osobników, został zniesiony u osobników Nrf2<sup>-/-</sup> (175). Jak wynika z moich oraz innych badań, terapia celowana na Nrf2 jest bardzo atrakcyjna w kontekście leczenia niedokrwienia mózgu (105). Co więcej, prezentowane wyniki wskazują na możliwość aktywacji Nrf2 i uzyskanie efektu ochronnego nawet po



zadziałania bodźca I/R. Jest to niezwykle istotne w kontekście pacjentów po epizodach niedokrwiennych lub niedokrwiennie-reperfuzyjnych do których pomoc zwykle dociera po kilku godzinach od wystąpienia pierwszych objawów.

Aby pogłębić wiedzę o neuroprotekcyjnych mechanizmach naturalnie występujących w odpornym regionie hipokampa poszukiwano nowych genów regulowanych przez Nrf2, które mogą być zaangażowane w to zjawisko. W tym celu przeprowadzono analizę komputerową z wykorzystaniem technik eksploracji danych (ang. data mining). Korzystając z ogólnodostępnego atlasu sekwencji RNA hipokampa myszy <https://hipposeq.janelia.org> oraz bazy genów regulowanych przez Nrf2 udało się wybrać 15 genów (Tabela 6, suplement Tabela 1S), których poziom ekspresji w regionach tworzących: CA2-3, DG hipokampa jest wyższy niż w regionie CA1. Zastosowanie analizy komputerowej pozwoliło na wyłonienie genów które mogą być nowym celem w kontekście protekcyjnego działania Nrf2 a przy okazji pozwoliło ograniczyć liczbę zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach.

Rosnąca czułość i specyficzność dostępnych metod molekularnych pozwala na generowanie ogromnych baz danych np. genomowych, co wiąże się z rozwojem systemów komputerowych niezbędnych do ich analizy (176, 177). Niemniej, trzeba mieć na uwadze, że analizy *in silico* z wykorzystaniem technik data mining mogą generować wiele niespójności i chociaż rozwijają się z zawrotną prędkością, posiadają wiele punktów krytycznych (178). Po pierwsze, standardowe założenie statystyczne na poziomie istotności 5% daje średnio 400 fałszywie dodatnich wyników podczas analizy bazy danych składającej się z 8 tysięcy wartości (179, 180). Po drugie, bazy danych zawierające informacje o poziomie ekspresji dziesiątek tysięcy genów oparte są na podstawie raptem kilku powtórzeń biologicznych (178). Związane jest to głównie z wysokim kosztem wielkoskalowych metod oraz ograniczoną dostępnością materiału biologicznego. Innym problemem jest fakt, że wykorzystywane algorytmy obliczeniowe nie są w stanie wyszukać wszystkich możliwych rozwiązań (181). Dlatego wykorzystuje się algorytmy, które przeszukują małą część danych i na tej podstawie odnajdują możliwe rozwiązania. Analizy wielkoskalowe mogą również zaliczać do odczytów szumy i/lub przypadkowe reakcje razem z faktycznymi, biologicznymi informacjami (178). Jednym z ostatnich

problemów związanym z analizą komputerową jest fakt, że łączy ona ze sobą zazwyczaj kilka baz danych, które powstały w różny sposób, są dostępne w różnych formatach i są obciążone wszystkimi powyżej wymienionymi problemami (178). Zatem w analizie łączonej, więcej niż jednej bazy danych, możemy wygenerować jeszcze więcej fałszywie dodatnich wyników (178). Mimo to, wykorzystanie technik komputerowych oraz dostępnych baz danych staje się coraz bardziej powszechne. Należy jednak pamiętać o niedoskonałościach technik komputerowych i o potrzebie weryfikacji uzyskanych wyników za pomocą standardowych, sprawdzonych i wiarygodnych metod.

W związku z powyższym, w niniejszej rozprawie doktorskiej wykorzystano ilościową reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR) w celu weryfikacji wyników uzyskanych za pomocą analizy komputerowej. Jednak, aby rozpocząć analizę ekspresji wyselekcjonowanych genów z użyciem tej techniki w pierwszej kolejności przeprowadzono weryfikację siedmiu kandydatów na gen referencyjny w modelu krótkotrwałego niedokrwienia przedomózgowia suwaka mongolskiego. Wybranie stabilnych w danym modelu genów referencyjnych jest kluczowe w kontekście uzyskania wiarygodnych wyników ekspresji genów docelowych. Powszechnie stosowane geny referencyjne jak *Actb*, *Gapdh* czy *18SrRNA* często nie są weryfikowane w konkretnych modelach badawczych, więc normalizacja za ich pomocą może prowadzić do błędnej interpretacji ekspresji badanych genów, szczególnie tych o niskiej ekspresji (182). W niniejszej rozprawie, oprócz powszechnie stosowanych genów referencyjnych, zweryfikowano także *Hmbs*, *Hprt1* i *Ywhaz* oraz nowy gen *Bud23*, dotychczas nie badany w kontekście wykorzystania jako referencja. Co ciekawe, wyniki qRT-PCR analizowane z wykorzystaniem programu RefFinder wskazały, że to właśnie *Actb* oraz *18SrRNA* są najmniej stabilnymi genami w modelu przejściowego niedokrwienia przedomózgowia suwaka mongolskiego (Ryc. 15, 16). Najbardziej stabilnym genem referencyjnym w badanym modelu okazał się *Hmbs*. W związku z tym, że *Bud23*, gen drugi w rankingu stabilności, podobnie jak *Hmbs* charakteryzuje się niskim poziomem ekspresji, do analizy genów wyselekcjonowanych w badaniu *in silico*, jako drugi gen referencyjny wybrano *Gapdh* ze względu na jego wyższy poziom

ekspresji. Wybór genów referencyjnych o różnym poziomie ekspresji (niskokopijny i wysokokopijny) są istotne podczas badania ekspresji genów o nieznanym poziomie ekspresji.

Walidacja genów referencyjnych pozwoliła rozpocząć weryfikację wyników uzyskanych w analizie *in silico* oraz weryfikację wpływu I/R na ekspresję wybranych genów. Analiza ekspresji genów w kontrolnym hipokampie suwaka mongolskiego wykazała, że 3 spośród 15 wyselekcjonowanych genów (*Mpp3*, *Ret*, *Shisa2*) wykazywały wyższą ekspresję w CA2-3, DG niż w CA1, potwierdzając w ten sposób wyniki otrzymane w analizie komputerowej (Ryc. 17). Biorąc pod uwagę wymienione punkty krytyczne technik komputerowych oraz fakt, że analizowane dane pochodziły z atlasu ekspresji genów myszy, uzyskana pozytywna weryfikacja na materiale pochodzącym z kontrolnych suwaków mongolskich na poziomie 20% może być uznana za satysfakcjonujący wynik. Co ważne, zmiany ekspresji genów *Mpp3*, *Ret*, *Shisa2* korelują z wyższą aktywnością Nrf2 w kontrolnym CA2-3, DG. Można zatem uznać je za geny podstawowe regulowane przez Nrf2. Dla produktu białkowego genu *Shisa2* przeprowadzono analizę Western blot. Wykazała ona, że poziom białka SHISA2 w obu regionach kontrolnego, prawidłowego hipokampa był taki sam (Ryc. 19 B, E), zatem wysoka ekspresja *Shisa2* w kontrolnym CA2-3, DG nie była odzwierciedlona w poziomie produktu białkowego. Co więcej, analiza ekspresji mRNA i białka genu *Shisa2* po epizodzie I/R wskazała na obniżenie ekspresji mRNA po I/R w CA2-3, DG do poziomu z CA1 i brak zmian poziomu białka SHISA2 w obu regionach hipokampa po I/R (Ryc. 19 A, B, E). Białko SHISA2 należy do rodziny białek SHISA, która u kręgowców składa się z 9 podrodzin (183, 184). Białko SHISA zostało opisane przez Yamamoto i współpracowników (185) jako antagonistą szlaku sygnalizacyjnego Wnt i FGF oraz białko niezbędne w embriogenezie w procesie formowania głowy płaza *Xenopus*. SHISA oddziałuje z niedojrzałymi formami receptora Wnt, Frizzled oraz receptora FGF w siateczce śródplazmatycznej, hamując ich modyfikacje potranslacyjne oraz dojrzewanie i przemieszczanie się na powierzchnię komórki (185, 186). Wykazano także, że SHISA2 jest związana z tworzeniem segmentów podczas somitogenezy u *Xenopus* oraz rozwoju zarodków kurzych (187) poprzez hamowanie szlaku Wnt i FGF (188). Wysoką ekspresję *Shisa2*

stwierdzono w niektórych liniach komórek nowotworowych np. nowotworu prostaty (183) czy drobnokomórkowego raka płuc (189). Wykazano, że wysoki poziom *Shisa2* zwiększa wzrost, proliferację, żywotność oraz inwazyjność komórek nowotworowych (183, 189). Trudno jednak spekulować o roli tego białka w mechanizmach endogennej neuroprotekcji biorąc pod uwagę brak efektu w postaci produktu białkowego pomimo wysokiego poziomu mRNA w CA2-3, DG u kontrolnego suwaka mongolskiego i brak zmian poziomu białka SHISA2 po I/R.

Następnym etapem badań było sprawdzenia czy ekspresja wyselekcjonowanych genów koreluje ze wzrostem aktywności Nrf2 w odpornym na uszkodzenie regionie hipokampa po I/R (Ryc. 8). W tym celu zweryfikowano wpływ I/R na poziom mRNA 15 wyselekcjonowanych genów. Ekspresja 4 spośród nich, *Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1* oraz *Gpc1* ulegała wzrostowi w 96 godzinie reperfuzji w regionie CA2-3, DG hipokampa suwaka mongolskiego (Ryc. 20 A, C Ryc. 21 A Ryc. 22 F). Zaobserwowano także przejściowy wzrost ekspresji genu *Tdo2* w regionie CA2-3, DG w 48 godzinie reperfuzji (Ryc. 21 E) oraz wzrost ekspresja genu *Brip1* od 24 do 96 godziny reperfuzji tego samego regionu (Ryc. 22 A). Wskazane wzrosty ekspresji korelują ze wzrostem aktywności czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w odpornym na uszkodzenie regionie hipokampa (Ryc. 8). Co ciekawe, analiza Western blot wykazała wzrost produktu białkowego w regionie CA2-3, DG w 72 i/lub 96 godzinie reperfuzji dla 4 z wymienionych genów: *Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1* oraz *Brip1* (Ryc. 20 A, D, E Ryc. 21 B, G Ryc. 22 B, E). Można zatem uznać, że wskazane geny i ich produkty białkowe są indukowane przez Nrf2 w wyniku stresu niedokrwienno-reperfuzyjnego. Na poziomie białkowym, w regionie CA2-3, DG, zaobserwowano również przejściowy wzrost białka STC2 w 72 godzinie reperfuzji oraz wzrost poziomu białka PHGDH w 72 i 96 godzinie po przywróceniu krążenia (Ryc. 19 D, E Ryc. 21 D, G). Jednak wzrostom tym nie towarzyszyły zmiany na poziomie mRNA. W przypadku *Tdo2* zaobserwowany wzrost poziomu ekspresji mRNA nie był odzwierciedlony we wzroście jego produktu białkowego w regionie CA2-3, DG po I/R (Ryc. 21. E, F, G). Biorąc pod uwagę, że to białko jest efektem ekspresji genu, to właśnie geny (*Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1* oraz *Brip1*), których wzrostowi mRNA towarzyszył wzrost poziomu produktów białkowych, wydają się najbardziej

interesujące w kontekście mechanizmów endogennej neuroprotekcji i to im poświęcono kolejną część dyskusji. Podsumowanie informacji o wszystkich 15 genach i ich produktach białkowym znajduje się w suplemencie niniejszej rozprawy doktorskiej w Tabeli 1S.

Dotychczasowe badania wykazały, że białko AIFM2 (apoptosis-inducing factor mitochondria-2), znane również jako FSP1 (Ferroptosis suppressor protein 1) posiada zarówno zdolność indukcji apoptozy jak i ochroną komórek przed ferroptozą (190-192). Badania z użyciem tandemowego spektrometru mas (MS/MS) wykazały, że 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) ma zdolność addycji His174 i Cys187 białka AIFM2/FSP1 (193). Badania zmodyfikowanego HNE białkiem AIFM2/FSP1 w linii komórkowej kardiomiocytów H9C2 z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego wykazały, że modyfikacje te są niezbędne do wydostania się AIFM2/FSP1 z mitochondriów, a spektrofotometryczne badania aktywności oksydoreduktazy ujawniły, że modyfikacje wywołane HNE mogą powodować przełączenia pomiędzy aktywnością oksydoreduktazy NAD(P)H a aktywnością proapoptotyczną AIFM2/FSP1 (50). Wiadomym jest, że 4-hydroxy-2-nonenal to aldehyd powstający podczas peroksydacji lipidów błonowych w wyniku stresu oksydacyjnego. Może to zatem sugerować, że białko AIFM2/FSP1 w niedokrwiennych neuronach hipokampa, w których epizod I/R skutkuje rozwojem stresu oksydacyjnego, posiada modyfikacje aktywujące postać oksydoreduktazy NAD(P)H tego białka. AIFM2/FSP1 w tej postaci katalizuje redukcję koenzymu Q10 (CoQ10, ubichinon) do ubichinolu (CoQ10H2), który jest silnym przeciwutleniaczem, wyłapującym wolne rodniki lipidowe (190, 194). Co więcej, wykazano, że białko AIFM2/FSP1 hamuje ferroptozę, niezależnie od GPX4, chociaż mechanizm antyferroptyczny AIFM2/FSP1 pozostaje niejasny (194). Badania w modelu niedotlenieniowo-niedokrwiennym noworodków (HI) myszy pozbawionych genu *Aif2* (AIF2 KO) wykazały zwiększenie uszkodzenia mózgu w 72 godzinie po HI oraz wzrost markerów stresu oksydacyjnego: 8-hydroksyguanozyny i 3-nitrotyrozyny w 6 godzinie po HI lub dialdehydu malonowego w 24 godzinie po HI (195). Również nasze wcześniejsze badania metabolomiczne w modelu krótkotrwałego niedokrwienia mózgu suwaka wskazują na metabolizm glicerofosfolipidów oraz puryn jako istotne w kontekście wrażliwości regionu CA1

na I/R (74). Badania na komórkach nowotworu płuc H1299 i H23 pozbawionych KEAP1 wykazały wzrost ekspresji AIFM2/FSP1, co wskazuje na regulację jego ekspresji przez Nrf2 (196). W modelu wszczepienia podskórnie myszom Foxn1nu/Foxn1nu komórek nowotworu płuc H1299 utrata KEAP1 przyspieszyła wzrost guza, a delecja AIFM2/FSP1 zahamowała jego wzrost (196). Co ciekawe, wyciszenie AIFM2/FSP1 i/lub farmakologiczne zahamowanie FSP1 lub związanych z nim ścieżek, przywróciło guzom płuc pozbawionych KEAP1 wrażliwość na radioterapię, prawdopodobnie poprzez przywrócenie ferroptozy (196). Wyniki naszych badań pokazują, że po I/R zwiększa się poziom ekspresji *Aifm2* i produktu białkowego AIFM2/FSD1 w regionie hipokampa odpornym na uszkodzenie. Jak sugerują badania przedstawione powyżej, związki powstające w stresie oksydacyjnym, który jest nieodłączną składową uszkodzenia I/R, mogą działać jako „przełączniki” aktywności AIFM2/FSD1 z aktywności proapoptotycznej na antyferroptotyczną. Stąd, wzrost ekspresji genu *Aifm2* i jego produktu białkowego w regionie CA2-3, DG mogą sugerować włączenie mechanizmów ochronnych przed ferropotzą w neuronach tego regionu hipokampa. Wydaje się, że podobny mechanizm przejściowo aktywowany jest w regionie CA1, gdzie w 24 godzinie reperfuzji zwiększa się poziom ekspresji *Aifm2*, jednak bez efektu w postaci białka, co może być związane z trwałym zahamowaniem syntezy białek we wrażliwym na I/R obszarze hipokampa (162).

Kolejne badane białko, Frizzled 7, należy do rodziny receptorów w której skład wchodzi 9 białek. Białko FZD7 zbudowane jest z N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej, domeny siedmiokrotnie przechodzącej przez błonę komórkową oraz C-końcowej domeny cytoplazmatycznej. FZD7 w obecności ko-receptorów, białek LRP5 i LRP6, może reagować na białka Wnt i aktywować kanoniczny szlak  $\beta$ -kateiny lub w obecności innego ko-receptora, białka ROR2, może aktywować nie-kanoniczną ścieżkę Wnt (197). Szlak sygnałowy Wnt jest ewolucyjnie konserwowaną częścią wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału, która reguluje wiele procesów jak proliferacja, różnicowanie i migracja komórek oraz decyzje o losie komórki podczas rozwoju (198). Co więcej, udowodniono udział szlaku sygnalizacji Wnt/ $\beta$ -kateiny w wewnątrzkomórkowych mechanizmach mających zapewnić prawidłowe funkcjonowanie komórek nerwowych w odpowiedzi na

negatywny bodziec np. niedokrwienie mózgu czy uszkodzenie rdzenia kręgowego (199-201). Biorąc pod uwagę fakt, że FZD7 jest receptorem biorącym udział w aktywacji ścieżki Wnt, jego obecność może być niezbędną do wywołania wyżej opisanego efektu. W mysim modelu krwotoku śródmózgowego (ICH) zaobserwowano wzrost poziomu FZD7 12, 24 godziny i 3 dni po ICH w półkuli poddanej procedurze (202). Co więcej, dodatkowa aktywacja FZD7 zmniejszyła powierzchnię obrzęku mózgu, a wyciszenie FZD7 pogarszało obrzęk mózgu w tym modelu (202). Wiele badań wskazuje, że białko FZD7 jest receptorem Wnt ulegającym nadaktywacji w różnych nowotworach np. raku jelita grubego (203, 204), raku wątrobowokomórkowym (205, 206) czy glejaku (207). Badania z wykorzystaniem tkanek ludzkiego glejaka o niskiej i wysokiej złośliwości, wykazały że poziom FZD7 koreluje ze stopniem złośliwości glejaka – wyższy poziom FZD7 = bardziej złośliwy glejak, a wyciszenie ekspresji *Fzd7* w dwóch liniach komórkowych glejaka U87 i LN229 zmniejszyło proliferację, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych (207). Co ciekawe, taką samą korelację ze stopniem złośliwości glejaka wykazano dla *Nrf2* (wyższy poziom *Nrf2* = bardziej złośliwy glejak), zarówno *in vivo* (208) jak i *in vitro* w liniach komórkowych glejaka U87 i LN229 (209). Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują na tendencję wzrostową ekspresji *Fzd7* w CA2-3, DG po uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym. Widoczny jest jednak statystycznie istotny wzrost poziomu białka FZD7 w 72 i 96 godzinie reperfuzyjii. Zatem możemy uznać gen *Fzd7* i jego produkt białkowy za gen indukowany przez *Nrf2*. Pomimo, że analiza terminów z bazy ontologii genów wiązała geny indukowane głównie z terminem „odpowiedź na stres oksydacyjny”, a geny podstawowe z terminem „proliferaacja komórek” (95), otrzymane wyniki na tle doniesień na temat FZD7, sugerują że wzrost jego poziomu w odpornej na uszkodzenie części hipokampa może przyczyniać się do zwiększonej aktywności ścieżki sygnałowej Wnt, co może mieć przełożenie na większą plastyczność tego regionu i być częścią mechanizmów endogennej neuroprotekcji. Co więcej, na tle doniesień o hamowaniu receptorów Frizzled przez białka z rodziny SHISA (185, 186), możemy spekulować, że brak zmian poziomu białka SHISA2 po I/R w regionie CA2-3, DG hipokampa jest częścią mechanizmów endogennej neuroprotekcji mających na celu umożliwienie dojrzewania i przemieszczania

receptorów Frizzled, w tym FZD7, z siateczki śródplazmatycznej do błony endosomów i błony komórkowej co w konsekwencji umożliwia aktywację ścieżki sygnałowej Wnt.

Ważną częścią kaskady niedokrwienia, opisanej we wstępie, jest wzrost poziomu jonów wapnia w cytoplazmie. Jony te w komórce mogą tworzyć kompleks z kalmoduliną, który aktywuje jedną z rodzin kinaz serynowo-treonionowych - kinazy CaM. Jedną z nich jest kinaza białkowa CAMK1. Ekspresja *Camk1* w mózgu jest wysoka a produkt białkowy zlokalizowany jest głównie w cytoplazmie (210, 211). CAMK1 do pełnej aktywności wymaga obecności kinazy CaMKK, która ją fosforyluje (212). Badania w mysim modelu nadekspresji *Camk1* wskazały udział szlaku CaMKK-CAMK1 w wydłużaniu dendrytów i/lub aksonów neuronów korowych (213). W badaniach *in vitro* w hodowli komórkowej neuronów hipokampalnych oraz komórek ziarnistych mózdzku szczura zahamowanie CaMKK, CAMK1 lub CAMK4 skutkowało skróceniem neurytów o około 70% w stosunku do komórek kontrolnych (214). W obu typach komórek zahamowanie kinaz CaMKK, CAMK1 lub CAMK4 powodowało zahamowanie wzrostu zarówno aksonów jak i niedojrzałych dendrytów (214). Co ciekawe, w hodowli komórek hipokampa noworodków szczura, stymulacja komórek glutaminianem lub depolaryzacja jonami K<sup>+</sup> zwiększała aktywność CAMK1 2,4- lub 3,6-krotnie w stosunku do kontroli (211). Podobny efekt, w postaci wzrostu aktywności CAMK1, zaobserwowano po zastosowaniu NMDA i AMPA (211). Schmitt i współpracownicy (212) zaobserwowali zależność pomiędzy ścieżką ERK (kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym) a CAMK1. Depolaryzacja komórek linii nerwiaka płodowego NG108 powoduje rozległą aktywację ścieżki ERK (212). Natomiast zahamowanie CaMKK lub CAMK1 efekt ten znosi, sugerując, że szlak CaMKK-CAMK1 jest niezbędny do aktywacji ścieżki ERK w warunkach depolaryzacji i podwyższonego stężenia jonów wapnia w tym typie komórek (212). Zatem CAMK1 może uczestniczyć w aktywacji białka ERK związanego z sygnalizacją pro-życiową komórek oraz protekcją neuronów (215, 216). Co więcej, niedawne badania Yang i współpracowników wskazały na możliwość fosforylacji białka PINK1 przez CAMK1 (217). Obniżenie ekspresji CAMK1 w linii komórek progenitorowych śródbłonna



(EPC ang. Endothelial Progenitor Cell) powodowało istotne obniżenie poziomu ufosforylowanego białka PINK1, podczas gdy wzrost stężenia jonów wapnia w pożywce, które zwiększają aktywność CAMK1 (218), powodował wzrost poziomu ufosforylowanego białka PINK1 (217). Wyniki tych badań oraz obserwowany przez nas wzrost poziom ekspresji *Camk1* i jego produktu białkowego w 96 godzinie reperfuzji w regionie CA2-3, DG są spójne z ostatnio opublikowanymi przez naszą grupę wynikami, wskazującymi na aktywację mitofagi zależnej od PINK1 w regionie CA2-3, DG hipokampa suwaka mongolskiego po I/R (83). Jednak, funkcja białka CAMK1 w komórkach mózgu dotkniętych niedokrwieniem są nadal poznawane. Przedstawione doniesienia sugerują, że wzrost ekspresji genu *Camk1* w poniedokrwienym CA2-3, DG może być częścią mechanizmów endogennej neuroprotekcji poprzez aktywację ścieżki ERK czy wpływ na metabolizm mitochondriów.

Na początku XXI wieku wykazano, że inaktywacyjne mutacje w genie *Brip1* w obu allelach są przyczyną rozwoju anemii Fanconiego typu J (219-221). Badania nad produktem białkowym genu *Brip1* ujawniły, że białko to oddziałuje z domeną BRACT białka BRCA1 oraz, że posiada funkcję ATPazy zależnej od DNA i 5' do 3' helikazy DNA zależnej od ATP (222, 223). Co więcej, jednoallelowe mutacje w genie *Brip1* predysponują do rozwoju raka piersi, jako że istnieje ścisła zależność pomiędzy prawidłową funkcją BRAC1 a BRIP1 (224-226). Przedstawione doniesienia na temat genu *Brip1* powstały niemalże jednocześnie, stąd w wielu publikacjach produkt białkowy genu *Brip1* pojawia się pod różnymi nazwami: FANCI - Homolog białka grupy J anemii Fanconiego, BRIP1 - Helikaza 1 oddziałująca z białkiem BRAC1 lub BACH1 - Helikaza 1 związana z C-końcową domeną białka BRAC1. W niniejszej rozprawie doktorskiej przyjęto nazwę BRIP1. Badania *in vitro* na komórkach linii raka piersi MCF7 z wyciszoną ekspresją *BRIP1* poddanych uszkodzeniu promieniowaniem jonizującym (PJ) wykazały opóźnioną w stosunku do komórek kontrolnych naprawę pęknięć nici DNA oraz obniżony poziom białka BRAC1 (225). Co więcej, w tym samym modelu w komórkach MCF7 typu dzikiego poddanych działaniu PJ, białko BRIP1 zlokalizowano w jądrze komórkowym w miejscu pęknięć nici DNA (225), co było zgodne, z wynikami otrzymanymi przez

inną grupę badawczą, dotyczącymi lokalizacji jądrowej białka BRAC1 w miejscu uszkodzenia DNA (227). Podobne wyniki uzyskali Cantro i współpracownicy, którzy w komórkach U2OS, pozbawionych białka BRIP1, wykazali opóźnioną naprawę pęknięć nici DNA po ekspozycji na promieniowanie jonizujące gamma (223). Kolejne badania wykazały, że lokalizacja jądrowa białka BRIP1 w miejscu uszkodzenia DNA pojawiała się także w odpowiedzi na uszkodzenie komórek MCF7 spowodowane hydroksymocznikiem czy mitomycyną C (228). W roku 2022, grupa Maniego i współpracowników wykazała wysoki poziom białka BRIP1 w hipokampie myszy, w szczególności w zakręcie zębatym (229). Co więcej, grupa ta wykazała, że komórki nerwowe pozbawione BRIP1 wykazują zwiększoną formację pętli R nici DNA (mogących prowadzić do pęknięcia chromosomów czy utraty informacji generycznej) w kontroli oraz w odpowiedzi na nadtlenek wodoru, a uszkodzenie ekscytotoksyczne, indukowane kwasem L-glutaminowym w komórkach pozbawianych BRIP1, zwiększa poziom stresu oksydacyjnego, pogarsza stan mitochondriów oraz zwiększa liczbę martwych komórek w stosunku do kontroli. W naszych badaniach ekspresja *Brip1* po uszkodzeniu I/R wzrasta już od 24 godziny reperfuzji w regionie CA2-3 DG, a poziom jego produktu białkowego wzrasta w 96 godzinie po niedokrwieniu. Rozważając otrzymane dane na tle obecnych doniesień na temat genu *Brip1*, wzrost jego ekspresji w CA2-3, DG w odpowiedzi na bodziec I/R może być mechanizmem obronnym mającym na celu naprawę uszkodzeń nici DNA powstających w wyniku niedokrwienia. Wzrost na poziomie białka dotyczył jedynie 96 godziny reperfuzji, jednak badania z wykorzystaniem całkowitych ekstraktów białkowym mogły zamaskować wzrost poziomu tego białka w miejscu powstawania uszkodzeń nici DNA – jądrze komórkowym. Stąd, w celu ustalenia dokładnego udziału białka BRIP1 w mechanizmach endogennej neuroprotekcji niezbędne są dalsze badania.

Opisane powyżej geny i ich produkty białkowe, wyłonione w analizie *in silico*, mogą brać udział w mechanizmach endogennej neuroprotekcji jako geny indukowane przez Nrf2 w odpowiedzi na bodziec I/R. Jednak, w celu poznania i ustalenia ich dokładnego udziału w naturalnej ochronie neuronów regionu CA2-3, DG niezbędne są dalsze badania, a analizy przeprowadzone w niniejszej rozprawie

doktorskiej są tylko punktem wyjścia do eksploracji przedstawionych białek i ścieżek molekularnych, w które są zaangażowane.

Ciekawym zagadnieniem, które pojawiło się podczas analizy wyników jest częściowy brak korelacji pomiędzy ekspresją genu a poziomem produktu białkowego. Sytuacja ta może wynikać z mechanizmów regulujących etapy pomiędzy mRNA a powstaniem białka jak modyfikacje potranskrypcyjne czy obecność niekodującego RNA lub wynikać z zahamowania syntezy białek w mózgu po I/R. W latach 70 XX wieku udowodniono, że mRNA, podobnie jak rRNA czy tRNA, ulega obróbce potranskrypcyjnej (230). Do najczęstszych modyfikacji należy metylacja, choć może również dochodzić m.in. do zmiany w wiązaniach glikozydowych mRNA (230, 231). Modyfikacje potranskrypcyjne mRNA wpływają na jego splicing, transport czy stabilność i mogą oddziaływać na powstawanie białek. Jednak, same zmiany w obrębie mRNA nie są możliwe do uwidocznienia za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (230). Coraz więcej doniesień naukowych wskazuje na udział niekodującego RNA w regulacji ekspresji genów poprzez wpływ na stabilność mRNA czy proces translacji (232-235). Ponadto, brak zmian poziomu białek w regionie CA1 hipokampa pomimo zmian ekspresji ich genów może wynikać z trwałego zahamowania translacji w tym regionie hipokampa w odpowiedzi na bodziec I/R (162). W regionie odpornym na uszkodzenie I/R, zahamowanie syntezy białek jest przejściowe i 24 godziny po bodźcu uszkadzającym translacja wraca do prawidłowego poziomu, co pozwala na syntezę białek w tym białek cytoprotekcyjnych (236-238). Przykładem genu, którego wzrost ekspresji mRNA nie jest odzwierciedlony we wzroście poziomu produktu białkowego, jest *Tdo2*. Statystycznie istotny wzrost ekspresji *Tdo2* zaobserwowano w odpornym na uszkodzenie regionie hipokampa w 48 godzinie reperfuzji w porównaniu z grupą kontrolną. W pozostałych badanych punktach czasowych po I/R (24, 72 i 96 godzina) stwierdzono tendencję wzrostową, która w porównaniach wielokrotnych ANOVA nie była statystycznie istotna. Natomiast, poziom produktu białkowego genu *Tdo2* nie zmieniał się w CA2-3, DG po I/R. Gen *Tdo2* koduje enzym, 2,3-dioksygenazę tryptofanu. Tryptofan ulega katabolizmowi do serotoniny jedynie po przekroczeniu bariery krew-mózg natomiast 95% tryptofanu, w

warunkach fizjologicznych, jest metabolizowana na drodze szlaku kynureninowego (239). TDO2 katalizuje nieodwracalny rozszczep pierścienia indolowego L-tryptofanu w wyniku czego powstaje N-formylo-L-kinurenina (240). Zwiększona aktywność oksygenaz tryptofanu, w tym TDO2, prowadzi do powstawania nadmiernych ilości związków neuroaktywnych o potencjale neurotoksycznym np. kinureniny (241). W badaniach z wykorzystaniem mysiego modelu MCAO dootrzewnowe podanie L-kinureniny zwiększało obszar zawału w stosunku do kontroli po samym MCAO (242). Co więcej, w tym samym modelu wykazano, że zahamowanie aktywności TDO2, ale nie IDO (2,3-dioksygenaza indolaminy), zmniejsza obszar zawału. Wynik ten wskazuje, że to TDO2 jest odpowiedzialny za biosyntezę L-kinureniny w mózgu myszy po udarze (242). W kontekście przedstawionych danych, wzrost ekspresji genu *Tdo2* bez odpowiedzi w postaci białka TDO2 może być protekcyjne dla regionu CA2-3, DG. Ponadto, wynik ten może sugerować, że częścią mechanizmów endogennej neuroprotekcji jest ścisła regulacja procesu translacji. Warto też zaznaczyć, że przemiany tryptofanu są wielokierunkowe i mogą prowadzić do syntezy serotoniny lub indolu (240). W naszych wcześniejszych badaniach metabolomicznych zwróciliśmy uwagę na istotne różnice w zawartości tryptofanu i indolu w częściach hipokampa o różnej wrażliwości na I/R (74). Zatem można sugerować, że dalsze badania tych szlaków metabolicznych mogą być cennym wkładem w zrozumienie zjawiska endogennej neuroprotekcji.

Spośród pozostałych genów wyselekcjonowanych w analizie *in silico* tylko *Gpc1* (Ryc. 22 E) charakteryzował się wzrostem ekspresji w CA2-3, DG po niedokrwieniu. Ekspresja *Lrp8* i *Hrk* nie zmieniała się w odpornym na uszkodzenie regionie hipokampa (Ryc. 22 E), a ekspresję *Cxcl12* charakteryzuje falisty wzór obecności mRNA (Ryc. 19 F). Jednak nie udało się zweryfikować poziomu produktów białkowych tych genów w dwóch regionach hipokampa, ze względu na brak przeciwciał lub brak sygnału przy wykorzystaniu przeciwciał swoistych dla innych gatunków na materiale pochodzącym od suwaka mongolskiego. Poziom ekspresji *Phgdh* wzrastał w CA1 i nie zmieniał się w CA2-3, DG, natomiast poziom białka PHGDH wzrastał w CA2-3, DG a malał w CA1 po I/R. PHGDH katalizuje

pierwszy etap syntezy L-seryny, a wiele doniesień wskazuje, że dostarczenie seryny do astrocytów jest niezbędne dla przeżycia neuronów i prawidłowego ich funkcjonowania (243-245). Ekspresja kolejnego genu, *Stc2* nie zmieniała się w żadnym regionie hipokampa, natomiast poziom białka STC2 wzrastał przejściowo w CA1 w 48 godzinie reperfuzji oraz w CA2-3, DG 72 godziny po niedokrwieniu. Stanniokalcyna 2 zaangażowana jest w wiele procesów komórkowych (246) (suplement Tabela 1S). Badania dotyczące STC2 w szczurzym modelu tMCAO wykazały wzrost ekspresji *Stc2* w korze mózgu od 3,5 do 24 godzin po 90 minutowym niedokrwieniu (247). Zaobserwowano również wzrost poziomu białka STC2 od 6 do 48 godzin po 120 minutowym MCAO. Wyciszenie STC2 w komórkach mysiej neuroblastomy N2a zmniejszało przeżycie komórek poddanych działaniu nadtlenu wodoru lub tapsigarginy sugerując udział stanniokalcyny 2 w przeżyciu komórek w odpowiedzi na stres (247). W tym świetle, wzrost poziomu białek PHGDH i STC2 w odpornym na uszkodzenie regionie hipokampa po I/R może być składową naturalnych mechanizmów obronnych tj. endogennej neuroprotekcji tego regionu.

Wiele lat badań, dokładne poznanie mechanizmów prowadzących do śmierci komórek nerwowych w wyniku uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego oraz próby ich zahamowania nie pozwoliły na ustalenie efektywnej strategii terapii. Fascynującym kierunkiem badań jest zgłębianie i wykorzystanie w leczeniu, naturalnych mechanizmów obronnych, jakie posiadają komórki nerwowe w reakcji na szkodliwe bodźce. W niniejszej rozprawie doktorskiej pokazano udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w naturalnych mechanizmach obronnych regionu CA2-3, DG. Co więcej, dowiedziono, że farmakologiczna aktywacja Nrf2 chroni komórki regionu podatnego na uszkodzenie (CA1) przed działaniem szkodliwego bodźca. Istotną i innowacyjną informacją uzyskaną w toku badań jest możliwość wywołania efektu ochronnego po zastosowaniu aktywatora Nrf2 w opóźnieniu do negatywnego bodźca (*ex vivo* 15 i 30 minut, *in vivo* 30 minut). Co więcej, dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik komputerowych i eksploracji danych udało się ustalić nowe geny i białka zaangażowane w mechanizmy endogennej neuroprotekcji regionu CA2-3, DG w odpowiedzi na uszkodzenie

niedokrwienno/reperfuzyjne, co jest nowatorskim podejściem do problemu niedokrwienia mózgu i mechanizmów endogennej neuroprotekcji. Wyniki te przyczyniają się do lepszego zrozumienia naturalnie występujących mechanizmów protekcyjnych oraz szerszego spojrzenia na procesy biologiczne zaangażowane w endogenną neuroprotekcję co może pozwolić na ustalenie sposobów w jakie komórki nerwowe chronią się same i naprawiają po uszkodzeniu. Wiedza ta może przysłużyć się nie tylko grupom badawczym zajmującym się problemem udaru, ale również innych chorób neurodegeneracyjnych.

## Podsumowanie

1. Aktywność Nrf2 we frakcji jądrowej regionu CA2-3, DG jest wyższa niż w CA1 już w kontrolnym, prawidłowym hipokampie, a epizod niedokrwienno-reperfuzyjny powoduje znaczny wzrost jego poziomu w 48 i 72 godzinie reperfuzyjii.
2. Poziom cytoplazmatycznego inhibitora Nrf2, KEAP1, jest statystycznie wyższy w kontrolnym CA1 niż w CA2-3, DG. I/R nie wpływa na poziom KEAP1 w CA2-3, DG i powoduje jego obniżenie w CA1.
3. Poziom białek regulowanych przez Nrf2: HO-1, GCLM i GPx1 jest wyższy w CA2-3, DG niż w CA1 już w kontrolnym hipokampie, a bodziec I/R powoduje dodatkowy wzrost HO-1, GCLM, GCLC i GPx1 w CA2-3, DG co koreluje ze wzrostem Nrf2 w tym regionie hipokampa i świadczy o obecności aktywnego Nrf2 w jądrach komórkowych.
4. Farmakologiczna aktywacja Nrf2 za pomocą sulforafanu chroni neurony regionu CA1 przed uszkodzeniem ekscytotoksycznym w modelu *ex vivo* organotypowej hodowli skrawków hipokampa oraz przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym w modelu *in vivo* przejściowego niedokrwienie mózgu suwaka mongolskiego.
5. Analiza komputerowa pozwoliła na wytypowanie 15 genów regulowanych przez Nrf2 o ekspresji wyższej w CA2-3, DG niż w CA1.
6. W przypadku 3 genów z 15 wytypowanych (*Mpp3*, *Ret*, *Shisa2*) ekspresja mRNA była wyższa w regionie CA2-3, DG hipokampa suwaka mongolskiego niż w CA1.
7. Ekspresja 6 genów spośród 15 badanych uległa nasileniu w CA2-3, DG na skutek epizodu I/R: *Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1*, *Tdo2*, *Brip1* oraz *Gpc1*. Na poziomie białka wzrost po I/R obserwowano dla 6 produktów białkowych badanych genów AIFM2/FSP1, FZD7, CAMK1, PHGDH, BRIP1 oraz STC2. Korelacja wzrostu ekspresji mRNA i poziomu białka ze wzrostem Nrf2 w regionie CA2-3, DG pozwala na zakwalifikowanie wymienionych genów i białek do ścieżek indukowanych przez Nrf2 w odpowiedzi na I/R.

## Wnioski

1. Czynniki transkrypcyjne Nrf2 jest istotną częścią mechanizmów naturalnej odporności neuronów regionu CA2-3, DG na epizod niedokrwienno-reperfuzyjny (I/R). U dorosłych osobników jego aktywność w rejonie odpornym jest wyższa niż w innych częściach mózgu, a bodziec I/R dodatkowo zwiększa jego aktywność w tym obszarze hipokampa.
2. Mechanizm neuroprotekcynego działania Nrf2 opiera się o aktywację dużej grupy genów związanych m.in. z wewnątrzkomórkowymi szlakami antyoksydacyjnymi, antyapoptotycznymi, zapobiegającymi ekscytotoksyczności, regulującymi plastyczność mózgu czy naprawę DNA.
3. Farmakologiczna aktywacja Nrf2 przez sulforafan skutkuje ochroną neuronów regionu wrażliwego na epizod niedokrwienno-reperfuzyjny (CA1), co może być podstawą do rozwoju terapii użytecznej klinicznie.
4. Badania wielkoskalowe z wykorzystaniem technik komputerowych i eksploracji danych pozwoliły na wyłonienie i poszerzenie wiedzy na temat udziału genów regulowanych przez Nrf2 w naturalnych mechanizmach obronnych mózgu.



## Suplement

**Tabela 1S.** Tabela przedstawia informacje na temat lokalizacji, funkcji i procesów biologicznych w jakie są zaangażowane produkty białkowe 15 genów wyselekcjonowanych w analizie komputerowej z repozytorium genów regulowanych przez Nrf2 oraz ogólnodostępnego atlasu sekwencji RNA hipokampa myszy <https://hipposeq.janelia.org/>.

GEN/BIAŁKO	LOKALIZACJA SUBKOMÓRKOWA	FUNKCJA
<i>Gpc1</i> / Glypikan 1	Endosomy, błona komórkowa, macierz zewnątrzkomórkowa	Jeden z sześciu glikoprotein należących do proteoglikanów siarczanu heparanu. GPC1 może działać jako koreceptor dla cząsteczek sygnałowych regulujących wzrost, ruchliwość i różnicowanie komórek takich jak czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń A (VEGF-A), transformujący czynnik wzrostu B (TGF-B), czy szlak sygnalizacji Wnt (248). GPC1 jest ważny dla prawidłowego funkcjonowania mózgu, jego brak zmniejsza rozmiar mózgu o 30% (249).
<i>Brip1</i> / Helikaza 1 oddziałująca z białkiem BRAC1	Jądro komórkowe, cytoplazma	ATPaza zależna od DNA i helikaza DNA od 5' do 3' niezbędna do utrzymania stabilności chromosomów (222, 223). Zaangażowana w naprawę pęknięć podwójnej helisy DNA (225, 227).
<i>Lrp8</i> / Apolipoproteina E receptor 2	Błona komórkowa, macierz zewnątrzkomórkowa	Receptor ApoER2 to białko transbłonowe typu I zaangażowane w utrzymanie metabolizmu lipidów, a jego ekspresja w mózgu jest wysoka (250, 251). Związany jest z transdukcją sygnału wielu szlaków sygnałowych jak Akt, Rho, szlak sygnałowy integriny czy kinazy białkowe aktywowane mitogenem (MAPK) (250). W ośrodkowym układzie nerwowym moduluje przeżycie neuronów, wzrost neurytów, regenerację komórek oraz sygnalizację wapniową (251).
<i>Aifm2</i> / Białko hamujące ferroptozę 1	Jądro komórkowe, błona mitochondrialna, błona komórkowa, cytoplazma, kople lipidowe	Oksydoreduktaza zależna od NAD(P)H związana z odpowiedzią komórek na stres oksydacyjny. Niezależnie od GPX4 hamuje utlenianie fosfolipidów i ferroptozę (śmierć komórkowa związana ze wzrostem poziomu nadtlenków lipidów) (194). Jednak, może również w warunkach stresu oksydacyjnego translokować do jądra komórki, gdzie powoduje uszkodzenie DNA co w

		konsekwencji prowadzi do śmierci komórki (193).
<i>Fzd7</i> / Białko Frizzled-7	Błona endosomów, błona komórkowa	Receptor dla białek Wnt, związany z kanoniczną i niekanoniczną ścieżką sygnałową. Może prowadzić do zahamowania GSK-3, jądrowej akumulacji beta-kateniny, aktywacji genów regulowanych przez Wnt oraz aktywacji białek dishevelled (197).
<i>Camk1</i> / Kinaza typu I zależna od jonów wapnia i kalmoduliny	Jądro komórkowe, cytoplazma	Kinaza białkowa zależna od jonów wapnia i kalmoduliny która reguluje wydłużanie aksonów i aktywność stożka wzrostu w neuronach hipokampa, mózdzku, kory mózgowej (213, 214). Podczas napływu jonów wapnia przez receptory NMDA, jest niezbędny do rozwoju długotrwałego wzmocnienia synaptycznego oraz aktywacji translacji zależnej od ERK (212).
<i>Mpp3</i> / Białko podrodziny MAGUK p55	Błona komórkowa, połączenia międzykomórkowe (przylegające)	MPP3 to palmitoilowane białko błonowe 3 należące do rodziny białek związanych z błoną komórkową MAGUK (homologi kinazy guanylowej związane z błoną). MPP3 uczestniczy w utrzymywaniu przylegających połączeń międzykomórkowych (252, 253).
<i>Phgdh</i> / Dehydrogenaza D-3-fosfoglicerynianowa	Błona komórkowa, cytoplazma	PHGDH katalizuje pierwszy etap syntezy L-seryny, utlenianie 3-fosfoglicerynianu do 3-fosfohydroksypirogronianu. Seryna jest ko-agonistą wymagany do pobudzenia receptora NMDA i neuronów glutaminergicznych. PHGDH występuje głównie w astrocytach. (243-245).
<i>Hrk</i> /Aktywator apoptozy harakiri	Mitochonria	Reguluje proces apoptozy prawdopodobnie poprzez oddziaływanie i hamowanie białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL (254, 255).
<i>Tdo2</i> /2,3-dioksygenaza tryptofanu	Cytoplazma	Enzym katalizujący reakcję utlenienia L-tryptofanu do N'-formylokinurenianu która jest pierwszą i limitującą reakcją szlaku kinureninowego (prowadzącego do produkcji NAD <sup>+</sup> ) (240). Zahamowanie TDO2 ma działanie protekcyjne w mysim modelu MCAO, poprzez zmniejszenie ilości L-kinureniny (242).
<i>Ret</i> / Proto-onkogen białka receptorowego kinazy tyrozynowej RET	Błona endosomów, błona komórkowa	Białko RET jest związane z wieloma mechanizmami komórkowymi jak proliferacja, migracja, różnicowanie czy przeżycie komórek m.in. poprzez aktywację przez czynnik neurotroficzny

		<p> pochodzenia glejowego (GDNF) (256-258).</p>
<i>Itgb8</i> / Integryna beta-8	Błona komórkowa	<p>ITGB8 bierze udział w aktywacji transformującego czynnika wzrostu beta (TGF-<math>\beta</math>) (259, 260) Badania w modelu uszkodzenia niedotlenieniowo-niedokrwinnego (HI) mózgu szczurzych osesków wykazały wzrost ekspresji <i>Itgb8</i> po HI, a ITGB8 znaleziono głównie w astrocytach mózgu osesków (261).</p>
<i>Cxcl12</i> /Czynnik pochodzenia stromalnego 1	Macierz zewnątrzkomórkowa	<p>SDF1 działa chemotaktycznie na limfocyty i monocyty i reguluje ich diapedezę przez barierę krew-mózg (262, 263). SDF1 reguluje również migrację, proliferację i różnicowanie neuronalnych komórek progenitorowych, śródbłonkowych komórek progenitorowych, mezenchymalnych komórek macierzystych czy hematopoetycznych komórek macierzystych (264-267)</p>
<i>Stc2</i> / Stanniokalcyna-2	Macierz zewnątrzkomórkowa	<p>Białko STC2 bierze udział w regulacji homeostazy jonów wapnia, transporcie jonów, wzroście i rozwoju, ochronie komórek oraz angiogenezie (246, 247, 268, 269). Komórki pozbawione STC2 poddane działaniu nadtlenu wodoru lub tapsigarginy wykazują zwiększoną śmiertelność (247).</p>
<i>Shisha2</i> / Homolog białka shisa2	Błona retikulum endoplazmatycznego	<p>Udowodniono rolę białka SHISA2 w dojrzewaniu presomatycznych komórek mezodermy poprzez osłabienie sygnalizacji FGF (fibroblast growth factor) oraz Wnt (185, 187, 188).</p>

**Tabela 2S.** Wyniki otrzymane z obliczeń programu RefFinder i każdego z czterech algorytmów: Delta Ct, BestKeeper, normFinder, geNorm. Analiza wartości cyklu granicznego (Ct, cycle threshold) dla łączonych wyników CA1 i CA2-3, DG. SV – wartość stabilności (stability value), R – ranga

GEN	REFFINDER		DELTA CT		BESTKEEPER		NORMFINDER		GENORM	
	SV	R	SV	R	SV	R	SV	R	SV	R
<i>Gapdh</i>	2.632	3	0.598	2	0.575	4	0.319	2	0.455	3
<i>Actb</i>	5.733	6	0.741	6	0.593	5	0.585	6	0.57	6
<i>18SrRNA</i>	7.00	7	1.018	7	0.962	7	0.936	7	0.698	7
<i>Hprt1</i>	3.976	4	0.67	5	0.525	2	0.447	5	0.529	5
<i>Hmbs</i>	1.00	1	0.59	1	0.452	1	0.26	1	0.422	1
<i>Ywhaz</i>	4.427	5	0.656	4	0.647	6	0.432	4	0.507	4
<i>Bud23</i>	2.28	2	0.612	3	0.534	3	0.341	3	0.422	1

## Literatura

1. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins S, Sacco RL, Hacke W, et al. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke* 2022;17(1):18-29.
2. Organization TWH. Cerebrovascular disorders: A clinical and research classification. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37194>: WHO, 1978.
3. Prabhakaran D, Anand S, Gaziano TA, Mbanya JC, Wu Y, Nugent R. Cardiovascular, Respiratory, and Related Disorders, 2017.
4. Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke* 2009;40(6):2276-93.
5. Perry JJ, Yadav K, Syed S, Shamy M. Transient ischemic attack and minor stroke: diagnosis, risk stratification and management. *CMAJ* 2022;194(39):E1344-E9.
6. Messé SR, Jauch EC. Transient ischemic attack: diagnostic evaluation. *Ann Emerg Med* 2008;52(2):S17-26.
7. . StatPearls, 2023.
8. Meyer FB, Sundt TM, Yanagihara T, Anderson RE. Focal cerebral ischemia: pathophysiologic mechanisms and rationale for future avenues of treatment. *Mayo Clin Proc* 1987;62(1):35-55.
9. Sanganalmath SK, Gopal P, Parker JR, Downs RK, Parker JC, Dawn B. Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology and diagnostic modalities. *Mol Cell Biochem* 2017;426(1-2):111-27.
10. Shehjar F, Maktabi B, Rahman ZA, Bahader GA, James AW, Naqvi A, et al. Stroke: Molecular mechanisms and therapies: Update on recent developments. *Neurochem Int* 2023;162:105458.
11. Sharma D, Smith M. The intensive care management of acute ischaemic stroke. *Curr Opin Crit Care* 2022;28(2):157-65.
12. Barthels D, Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;1866(4):165260.
13. Frank D, Zlotnik A, Boyko M, Gruenbaum BF. The Development of Novel Drug Treatments for Stroke Patients: A Review. *Int J Mol Sci* 2022;23(10).
14. Dhir N, Medhi B, Prakash A, Goyal MK, Modi M, Mohindra S. Pre-clinical to Clinical Translational Failures and Current Status of Clinical Trials in Stroke Therapy: A Brief Review. *Curr Neuropharmacol* 2020;18(7):596-612.
15. Macrae IM. Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *Br J Pharmacol* 2011;164(4):1062-78.
16. Zhou Z, Lu J, Liu WW, Manaenko A, Hou X, Mei Q, et al. Advances in stroke pharmacology. *Pharmacol Ther* 2018;191:23-42.
17. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2020;21(20).
18. Yang SH, Lou M, Luo B, Jiang WJ, Liu R. Precision Medicine for Ischemic Stroke, Let Us Move Beyond Time Is Brain. *Transl Stroke Res* 2018;9(2):93-5.
19. Phipps MS, Cronin CA. Management of acute ischemic stroke. *BMJ* 2020;368:l6983.
20. Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 1994;17(6):251-7.
21. Ham PB, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol* 2017;157:92-116.

22. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology* 2008;55(3):289-309.
23. Singh V, Mishra VN, Chaurasia RN, Joshi D, Pandey V. Modes of Calcium Regulation in Ischemic Neuron. *Indian J Clin Biochem* 2019;34(3):246-53.
24. Gafaniz R, Sanches J. ATP consumption and neural electrical activity: a physiological model for brain imaging. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2010;2010:5480-3.
25. Zemke D, Smith JL, Reeves MJ, Majid A. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology* 2004;25(6):895-904.
26. Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 2010;47(2):122-9.
27. Zabłocka B, Domańska-Janik K. Involvement of protein kinase C in various cellular systems transducing ischemia evoked signal. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1993;53(1):25-9.
28. Krupska O, Sarnowska A, Fedorczyk B, Gewartowska M, Misicka A, Zabłocka B, et al. Ischemia/Reperfusion-Induced Translocation of PKC $\beta$ II to Mitochondria as an Important Mediator of a Protective Signaling Mechanism in an Ischemia-Resistant Region of the Hippocampus. *Neurochem Res* 2017;42(8):2392-403.
29. Kowalczyk JE, Kawalec M, Beręsewicz M, Dębski J, Dadlez M, Zabłocka B. Protein kinase C beta in postischemic brain mitochondria. *Mitochondrion* 2012;12(1):138-43.
30. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett* 2018;592(5):692-702.
31. Kristián T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 1998;29(3):705-18.
32. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22(9):391-7.
33. Schaller B, Graf R. Cerebral venous infarction: the pathophysiological concept. *Cerebrovasc Dis* 2004;18(3):179-88.
34. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 2009;40(5):e331-9.
35. Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* 2000;17(10):811-29.
36. Gan B. Mitochondrial regulation of ferroptosis. *J Cell Biol* 2021;220(9).
37. Wu Y, Yu C, Luo M, Cen C, Qiu J, Zhang S, et al. Ferroptosis in Cancer Treatment: Another Way to Rome. *Front Oncol* 2020;10:571127.
38. Beresewicz-Haller M. Hippocampal region-specific endogenous neuroprotection as an approach in the search for new neuroprotective strategies in ischemic stroke. Fiction or fact? *Neurochem Int* 2023;162:105455.
39. Yu Z, Liu N, Liu J, Yang K, Wang X. Neuroglobin, a novel target for endogenous neuroprotection against stroke and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 2012;13(6):6995-7014.
40. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;26(5):248-54.
41. Mergenthaler P, Dirnagl U. Protective conditioning of the brain: expressway or roadblock? *J Physiol* 2011;589(17):4147-55.
42. Yokobori S, Mazzeo AT, Hosein K, Gajavelli S, Dietrich WD, Bullock MR. Preconditioning for traumatic brain injury. *Transl Stroke Res* 2013;4(1):25-39.
43. Gao P, Tang S, Chen H, Zhou X, Ou Y, Shen R, et al. Preconditioning increases brain resistance against acute brain injury via neuroinflammation modulation. *Exp Neurol* 2021;341:113712.
44. Rejdak R, Rejdak K, Sieklucka-Dziuba M, Stelmasiak Z, Grieb P. Brain tolerance and preconditioning. *Pol J Pharmacol* 2001;53(1):73-9.
45. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982;239(1):57-69.

46. Hoyte LC, Papadakis M, Barber PA, Buchan AM. Improved regional cerebral blood flow is important for the protection seen in a mouse model of late phase ischemic preconditioning. *Brain Res* 2006;1121(1):231-7.
47. Lusardi TA, Farr CD, Faulkner CL, Pignataro G, Yang T, Lan J, et al. Ischemic preconditioning regulates expression of microRNAs and a predicted target, MeCP2, in mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30(4):744-56.
48. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990;528(1):21-4.
49. Zamani M, Soleimani M, Golab F, Mohamadzadeh F, Mehdizadeh M, Katebi M. NeuroProtective effects of adenosine receptor agonist coadministration with ascorbic acid on CA1 hippocampus in a mouse model of ischemia reperfusion injury. *Metab Brain Dis* 2013;28(3):367-74.
50. Ara J, Fekete S, Frank M, Golden JA, Pleasure D, Valencia I. Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia-ischemia in newborn piglet brain. *Neurobiol Dis* 2011;43(2):473-85.
51. Shu L, Wang C, Wang J, Zhang Y, Zhang X, Yang Y, et al. The neuroprotection of hypoxic preconditioning on rat brain against traumatic brain injury by up-regulated transcription factor Nrf2 and HO-1 expression. *Neurosci Lett* 2016;611:74-80.
52. Yang T, Sun Y, Li Q, Li S, Shi Y, Leak RK, et al. Ischemic preconditioning provides long-lasting neuroprotection against ischemic stroke: The role of Nrf2. *Exp Neurol* 2020;325:113142.
53. Yang T, Sun Y, Mao L, Zhang M, Li Q, Zhang L, et al. Corrigendum to "Brain ischemic preconditioning protects against ischemic injury and preserves the blood-brain barrier via oxidative signaling and Nrf2 activation" [Redox Biol. 17 (2018) 323-337]. *Redox Biol* 2019;22:101067.
54. Huang L, Wu S, Li H, Dang Z, Wu Y. Hypoxic preconditioning relieved ischemic cerebral injury by promoting immunomodulation and microglia polarization after middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 2019;1723:146388.
55. Du X, Yang J, Liu C, Wang S, Zhang C, Zhao H, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  Have Beneficial Effects in Remote Ischemic Preconditioning Against Stroke by Modulating Inflammatory Responses in Aged Rats. *Front Aging Neurosci* 2020;12:54.
56. Ding ZM, Wu B, Zhang WQ, Lu XJ, Lin YC, Geng YJ, et al. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning and postconditioning on global brain ischemia in rats through the same effect on inhibition of apoptosis. *Int J Mol Sci* 2012;13(5):6089-101.
57. Koch S. Preconditioning the human brain: practical considerations for proving cerebral protection. *Transl Stroke Res* 2010;1(3):161-9.
58. Kirino T. Delayed neuronal death. *Neuropathology* 2000;20 Suppl:S95-7.
59. Ordy JM, Wengenack TM, Bialobok P, Coleman PD, Rodier P, Baggs RB, et al. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Exp Neurol* 1993;119(1):128-39.
60. Sugawara T, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci* 1999;19(22):RC39.
61. Rytter A, Cronberg T, Asztely F, Nemali S, Wieloch T. Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to in vitro "ischemia" show selective and delayed CA1 damage that is aggravated by glucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(1):23-33.
62. Sieber FE, Traystman RJ, Martin LJ. Delayed neuronal death after global incomplete ischemia in dogs is accompanied by changes in phospholipase C protein expression. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17(5):527-33.
63. Horn M, Schlote W. Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia. *Acta Neuropathol* 1992;85(1):79-87.
64. Petitto CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 1987;37(8):1281-6.

65. Lee CH, Park JH, Yoo KY, Choi JH, Hwang IK, Ryu PD, et al. Pre- and post-treatments with escitalopram protect against experimental ischemic neuronal damage via regulation of BDNF expression and oxidative stress. *Exp Neurol* 2011;229(2):450-9.
66. Hwang IK, Yoo KY, Suh HW, Kim YS, Kwon DY, Kwon YG, et al. Folic acid deficiency increases delayed neuronal death, DNA damage, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 immunoreactivity, and gliosis in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2008;86(9):2003-15.
67. Aarts MM, Tymianski M. Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Curr Mol Med* 2004;4(2):137-47.
68. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995;15(4):961-73.
69. Cristea IM, Degli Esposti M. Membrane lipids and cell death: an overview. *Chem Phys Lipids* 2004;129(2):133-60.
70. Strosznajder J, Zambrzycka A, Kacprzak MD, Kopczuk D, Strosznajder RP. Alteration of phosphoinositide degradation by cytosolic and membrane-bound phospholipases after forebrain ischemia-reperfusion in gerbil: effects of amyloid beta peptide. *Neurochem Res* 1999;24(10):1277-84.
71. Hefti F, Lapchak PA. Pharmacology of nerve growth factor in the brain. *Adv Pharmacol* 1993;24:239-73.
72. Greene JG, Borges K, Dingledine R. Quantitative transcriptional neuroanatomy of the rat hippocampus: evidence for wide-ranging, pathway-specific heterogeneity among three principal cell layers. *Hippocampus* 2009;19(3):253-64.
73. Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 2001;30(2):489-502.
74. Krupska O, Kowalczyk T, Beręsewicz-Haller M, Samczuk P, Pietrowska K, Zabłocki K, et al. Hippocampal Sector-Specific Metabolic Profiles Reflect Endogenous Strategy for Ischemia-Reperfusion Insult Resistance. *Mol Neurobiol* 2021;58(4):1621-33.
75. Sato K, Matsuki N. A 72 kDa heat shock protein is protective against the selective vulnerability of CA1 neurons and is essential for the tolerance exhibited by CA3 neurons in the hippocampus. *Neuroscience* 2002;109(4):745-56.
76. Nowak TS. Localization of 70 kDa stress protein mRNA induction in gerbil brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11(3):432-9.
77. Vass K, Welch WJ, Nowak TS. Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia. *Acta Neuropathol* 1988;77(2):128-35.
78. Nakajima T, Hata R, Kondo T, Takenaka S. Proteomic analysis of the hippocampus in naïve and ischemic-preconditioned rat. *J Neurol Sci* 2015;358(1-2):158-71.
79. Zhang M, Li WB, Liu YX, Liang CJ, Liu LZ, Cui X, et al. High expression of GLT-1 in hippocampal CA3 and dentate gyrus subfields contributes to their inherent resistance to ischemia in rats. *Neurochem Int* 2011;59(7):1019-28.
80. Bruhn T, Levy LM, Nielsen M, Christensen T, Johansen FF, Diemer NH. Ischemia induced changes in expression of the astrocyte glutamate transporter GLT1 in hippocampus of the rat. *Neurochem Int* 2000;37(2-3):277-85.
81. Gozal E, Gozal D, Pierce WM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, Sachleben LR, et al. Proteomic analysis of CA1 and CA3 regions of rat hippocampus and differential susceptibility to intermittent hypoxia. *J Neurochem* 2002;83(2):331-45.
82. Gerhart DZ, Leino RL, Taylor WE, Borson ND, Drewes LR. GLUT1 and GLUT3 gene expression in gerbil brain following brief ischemia: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;25(3-4):313-22.
83. Kawalec M, Wojtyniak P, Bielska E, Lewczuk A, Boratyńska-Jasińska A, Beręsewicz-Haller M, et al. Mitochondrial dynamics, elimination and biogenesis during post-ischemic recovery in ischemia-



- resistant and ischemia-vulnerable gerbil hippocampal regions. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2023;1869(3):166633.
84. Beręsewicz-Haller M, Krupska O, Bochomulski P, Dudzik D, Chęcińska A, Hilgier W, et al. Mitochondrial Metabolism behind Region-Specific Resistance to Ischemia-Reperfusion Injury in Gerbil Hippocampus. Role of PKC $\beta$ II and Phosphate-Activated Glutaminase. *Int J Mol Sci* 2021;22(16).
85. Yin B, Barrionuevo G, Batinic-Haberle I, Sandberg M, Weber SG. Differences in Reperfusion-Induced Mitochondrial Oxidative Stress and Cell Death Between Hippocampal CA1 and CA3 Subfields Are Due to the Mitochondrial Thioredoxin System. *Antioxid Redox Signal* 2017;27(9):534-49.
86. Wang X, Pal R, Chen XW, Kumar KN, Kim OJ, Michaelis EK. Genome-wide transcriptome profiling of region-specific vulnerability to oxidative stress in the hippocampus. *Genomics* 2007;90(2):201-12.
87. Wang X, Pal R, Chen XW, Limpeanchob N, Kumar KN, Michaelis EK. High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;140(1-2):120-6.
88. Mattiasson G, Friberg H, Hansson M, Elmér E, Wieloch T. Flow cytometric analysis of mitochondria from CA1 and CA3 regions of rat hippocampus reveals differences in permeability transition pore activation. *J Neurochem* 2003;87(2):532-44.
89. Sandberg M, Patil J, D'Angelo B, Weber SG, Mallard C. NRF2-regulation in brain health and disease: implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology* 2014;79:298-306.
90. Liu L, Locascio LM, Doré S. Critical Role of Nrf2 in Experimental Ischemic Stroke. *Front Pharmacol* 2019;10:153.
91. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 2018;29(17):1727-45.
92. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci* 2014;39(4):199-218.
93. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018;1865(5):721-33.
94. Telakowski-Hopkins CA, King RG, Pickett CB. Glutathione S-transferase Ya subunit gene: identification of regulatory elements required for basal level and inducible expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(4):1000-4.
95. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res* 2010;38(17):5718-34.
96. Sakoda E, Igarashi K, Sun J, Kurisu K, Tashiro S. Regulation of heme oxygenase-1 by transcription factor Bach1 in the mouse brain. *Neurosci Lett* 2008;440(2):160-5.
97. Li W, Yu S, Liu T, Kim JH, Blank V, Li H, et al. Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783(10):1847-56.
98. Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* 2010;3(112):re3.
99. Kwak MK, Kensler TW. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;244(1):66-76.
100. Higgins LG, Kelleher MO, Eggleston IM, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Transcription factor Nrf2 mediates an adaptive response to sulforaphane that protects fibroblasts in vitro against the cytotoxic effects of electrophiles, peroxides and redox-cycling agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;237(3):267-80.
101. Liu P, Kerins MJ, Tian W, Neupane D, Zhang DD, Ooi A. Differential and overlapping targets of the transcriptional regulators NRF1, NRF2, and NRF3 in human cells. *J Biol Chem* 2019;294(48):18131-49.

102. Esteras N, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 activation in the treatment of neurodegenerative diseases: a focus on its role in mitochondrial bioenergetics and function. *Biol Chem* 2016;397(5):383-400.
103. Sadrkhanloo M, Entezari M, Orouei S, Zabolian A, Mirzaie A, Maghsoudloo A, et al. Targeting Nrf2 in ischemia-reperfusion alleviation: From signaling networks to therapeutic targeting. *Life Sci* 2022;300:120561.
104. Clausen BH, Lundberg L, Yli-Karjanmaa M, Martin NA, Svensson M, Alfsen MZ, et al. Fumarate decreases edema volume and improves functional outcome after experimental stroke. *Exp Neurol* 2017;295:144-54.
105. Dinkova-Kostova AT, Copple IM. Advances and challenges in therapeutic targeting of NRF2. *Trends Pharmacol Sci* 2023.
106. Lastra D, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Perspectives on the Clinical Development of NRF2-Targeting Drugs. *Handb Exp Pharmacol* 2021;264:93-141.
107. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:9372182.
108. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012;22(1):66-79.
109. Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2003;23(23):8786-94.
110. Højsgaard Chow H, Talbot J, Lundell H, Marstrand L, Gøbel Madsen C, Bach Søndergaard H, et al. Dimethyl fumarate treatment of primary progressive multiple sclerosis: results of an open-label extension study. *Mult Scler Relat Disord* 2023;70:104458.
111. Callegari I, Derfuss T, Galli E. Update on treatment in multiple sclerosis. *Presse Med* 2021;50(2):104068.
112. Reszke R, Szepletowski JC. A safety evaluation of dimethyl fumarate in moderate-to-severe psoriasis. *Expert Opin Drug Saf* 2020;19(4):373-80.
113. Dayalan Naidu S, Dinkova-Kostova AT. Omaveloxolone (Skyclarys). *Trends Pharmacol Sci* 2023;44(6):394-5.
114. Lee A. Omaveloxolone: First Approval. *Drugs* 2023;83(8):725-9.
115. Shiina A, Kanahara N, Sasaki T, Oda Y, Hashimoto T, Hasegawa T, et al. An Open Study of Sulforaphane-rich Broccoli Sprout Extract in Patients with Schizophrenia. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2015;13(1):62-7.
116. Li Z, Zhang T, Xu L, Wei Y, Tang Y, Hu Q, et al. Decreasing risk of psychosis by sulforaphane study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical multi-centre trial. *Early Interv Psychiatry* 2021;15(3):585-94.
117. Zolnourian AH, Franklin S, Galea I, Bulters DO. Study protocol for SFX-01 after subarachnoid haemorrhage (SAS): a multicentre randomised double-blinded, placebo controlled trial. *BMJ Open* 2020;10(3):e028514.
118. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(6):2399-403.
119. Yagishita Y, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Kensler TW. Broccoli or Sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? *Molecules* 2019;24(19).
120. Jazwa A, Rojo AI, Innamorato NG, Hesse M, Fernández-Ruiz J, Cuadrado A. Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(12):2347-60.
121. Huang C, Wu J, Chen D, Jin J, Wu Y, Chen Z. Effects of sulforaphane in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 2019;853:153-68.

122. Sun Y, Yang T, Mao L, Zhang F. Sulforaphane Protects against Brain Diseases: Roles of Cytoprotective Enzymes. *Austin J Cerebrovasc Dis Stroke* 2017;4(1).
123. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(18):11908-13.
124. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(7):2040-5.
125. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2003;23(22):8137-51.
126. Russo M, Spagnuolo C, Russo GL, Skalicka-Woźniak K, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, et al. Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018;58(8):1391-405.
127. Yagishita Y, Gatbonton-Schwager TN, McCallum ML, Kensler TW. Current Landscape of NRF2 Biomarkers in Clinical Trials. *Antioxidants (Basel)* 2020;9(8).
128. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991;37(2):173-82.
129. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
130. Ohnishi ST, Barr JK. A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagents. *Anal Biochem* 1978;86(1):193-200.
131. Alfieri A, Srivastava S, Siow RCM, Cash D, MODO M, Duchon MR, et al. Sulforaphane preconditioning of the Nrf2/HO-1 defense pathway protects the cerebral vasculature against blood-brain barrier disruption and neurological deficits in stroke. *Free Radic Biol Med* 2013;65:1012-22.
132. Folbergrová J, Ješina P, Otáhal J. Protective Effect of Sulforaphane on Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Associated with Status Epilepticus in Immature Rats. *Mol Neurobiol* 2023.
133. Porritt MJ, Andersson HC, Hou L, Nilsson Å, Pekna M, Pekny M, et al. Photothrombosis-induced infarction of the mouse cerebral cortex is not affected by the Nrf2-activator sulforaphane. *PLoS One* 2012;7(7):e41090.
134. Ping Z, Liu W, Kang Z, Cai J, Wang Q, Cheng N, et al. Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain Res* 2010;1343:178-85.
135. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40(15):e115.
136. Kõressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raime K, Andreson R, Remm M. Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* 2018;34(11):1937-8.
137. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 2007;23(10):1289-91.
138. Guo YY, Chi QS, Zhang XY, Liu W, Hao SY, Wang DH. Brown adipose tissue plays thermoregulatory role within the thermoneutral zone in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Therm Biol* 2019;81:137-45.
139. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, et al. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem* 2011;286(28):25256-64.
140. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* 2012.
141. Domańska-Janik K, Zabłocka B. Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. *Mol Chem Neuropathol* 1993;20(2):111-23.

142. Zabłocka B, Lukasiuk K, Lazarewicz JW, Domańska-Janik K. Modulation of ischemic signal by antagonists of N-methyl-D-aspartate, nitric oxide synthase, and platelet-activating factor in gerbil hippocampus. *J Neurosci Res* 1995;40(2):233-40.
143. Zabłocka B, Dłużniewska J, Zajac H, Domańska-Janik K. Opposite reaction of ERK and JNK in ischemia vulnerable and resistant regions of hippocampus: involvement of mitochondria. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;110(2):245-52.
144. Zabłocka B, Maternicka K, Zalewska T, Domańska-Janik K. Expression of Ca<sup>2+</sup>-dependent (classical) PKC mRNA isoforms after transient cerebral ischemia in gerbil hippocampus. *Brain Res* 1998;779(1-2):254-8.
145. Domańska-Janik K, Bong P, Bronisz-Kowalczyk A, Zajac H, Zabłocka B. AP1 transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils. *J Neurosci Res* 1999;57(6):840-6.
146. Lewczuk A, Boratyńska-Jasińska A, Zabłocka B. Validation of the Reference Genes for Expression Analysis in the Hippocampus after Transient Ischemia/Reperfusion Injury in Gerbil Brain. *Int J Mol Sci* 2023;24(3).
147. Abdalkader M, Lampinen R, Kanninen KM, Malm TM, Liddell JR. Targeting Nrf2 to Suppress Ferroptosis and Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration. *Front Neurosci* 2018;12:466.
148. Takagi T, Kitashoji A, Iwawaki T, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, et al. Temporal activation of Nrf2 in the penumbra and Nrf2 activator-mediated neuroprotection in ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2014;72:124-33.
149. Moratilla-Rivera I, Sánchez M, Valdés-González JA, Gómez-Serranillos MP. Natural Products as Modulators of Nrf2 Signaling Pathway in Neuroprotection. *Int J Mol Sci* 2023;24(4).
150. Leonardo CC, Doré S. Dietary flavonoids are neuroprotective through Nrf2-coordinated induction of endogenous cytoprotective proteins. *Nutr Neurosci* 2011;14(5):226-36.
151. Luo JH, Li J, Shen ZC, Lin XF, Chen AQ, Wang YF, et al. Advances in health-promoting effects of natural polysaccharides: Regulation on Nrf2 antioxidant pathway. *Front Nutr* 2023;10:1102146.
152. Farina M, Vieira LE, Buttari B, Profumo E, Saso L. The Nrf2 Pathway in Ischemic Stroke: A Review. *Molecules* 2021;26(16).
153. Tanaka N, Ikeda Y, Ohta Y, Deguchi K, Tian F, Shang J, et al. Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 2011;1370:246-53.
154. Lou J, Cao G, Li R, Liu J, Dong Z, Xu L. β-Caryophyllene Attenuates Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Nrf2/HO-1 Pathway in Rats. *Neurochem Res* 2016;41(6):1291-304.
155. Ashabi G, Khalaj L, Khodaghali F, Goudarzvand M, Sarkaki A. Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metab Brain Dis* 2015;30(3):747-54.
156. Wang R, Tu J, Zhang Q, Zhang X, Zhu Y, Ma W, et al. Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 signaling. *Hippocampus* 2013;23(7):634-47.
157. Chen B, Cao H, Chen L, Yang X, Tian X, Li R, et al. Rifampicin Attenuated Global Cerebral Ischemia Injury via Activating the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor Pathway. *Front Cell Neurosci* 2016;10:273.
158. Park CW, Ahn JH, Lee TK, Park YE, Kim B, Lee JC, et al. Post-treatment with oxcarbazepine confers potent neuroprotection against transient global cerebral ischemic injury by activating Nrf2 defense pathway. *Biomed Pharmacother* 2020;124:109850.
159. Durukan A, Tatlisumak T. Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for cerebroprotection. *Exp Transl Stroke Med* 2010;2(1):2.
160. Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 2009;8(4):398-412.
161. Koerner I, Alkayed N, Bhardwaj A, Alkayed N, Kirsch J. Acute stroke, bench to bedside. *New York, Informa Healthcare* 2006:345-53.

162. Paschen W, Proud CG, Mies G. Shut-down of translation, a global neuronal stress response: mechanisms and pathological relevance. *Curr Pharm Des* 2007;13(18):1887-902.
163. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med* 2009;30(1-2):86-98.
164. Handy DE, Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic Biol Med* 2022;188:146-61.
165. Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, de Haan J, Hertzog P, Iannello RC, et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem* 2001;78(6):1389-99.
166. Higgins LG, Hayes JD. The cap'n'collar transcription factor Nrf2 mediates both intrinsic resistance to environmental stressors and an adaptive response elicited by chemopreventive agents that determines susceptibility to electrophilic xenobiotics. *Chem Biol Interact* 2011;192(1-2):37-45.
167. Jansen T, Daiber A. Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase? *Front Pharmacol* 2012;3:30.
168. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;235(4792):1043-6.
169. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(13):5171-6.
170. Schipper HM, Song W, Tavitian A, Cressatti M. The sinister face of heme oxygenase-1 in brain aging and disease. *Prog Neurobiol* 2019;172:40-70.
171. Hu Q, Zuo T, Deng L, Chen S, Yu W, Liu S, et al.  $\beta$ -Caryophyllene suppresses ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion via activation of the NRF2/HO-1 signaling pathway in MCAO/R rats. *Phytomedicine* 2022;102:154112.
172. Xu L, Gao Y, Hu M, Dong Y, Xu J, Zhang J, et al. Edaravone dextroborneol protects cerebral ischemia reperfusion injury through activating Nrf2/HO-1 signaling pathway in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2022;36(5):790-800.
173. Zhao J, Kobori N, Aronowski J, Dash PK. Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neurosci Lett* 2006;393(2-3):108-12.
174. Soane L, Li Dai W, Fiskum G, Bambrick LL. Sulforaphane protects immature hippocampal neurons against death caused by exposure to hemin or to oxygen and glucose deprivation. *J Neurosci Res* 2010;88(6):1355-63.
175. Zhao J, Moore AN, Redell JB, Dash PK. Enhancing expression of Nrf2-driven genes protects the blood brain barrier after brain injury. *J Neurosci* 2007;27(38):10240-8.
176. Yang J, Li Y, Liu Q, Li L, Feng A, Wang T, et al. Brief introduction of medical database and data mining technology in big data era. *J Evid Based Med* 2020;13(1):57-69.
177. Bellazzi R, Zupan B. Towards knowledge-based gene expression data mining. *J Biomed Inform* 2007;40(6):787-802.
178. Lee JK, Williams PD, Cheon S. Data mining in genomics. *Clin Lab Med* 2008;28(1):145-66, viii.
179. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(16):9440-5.
180. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(9):5116-21.
181. Soukup M, Cho H, Lee JK. Robust classification modeling on microarray data using misclassification penalized posterior. *Bioinformatics* 2005;21 Suppl 1:i423-30.
182. Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One* 2015;10(11):e0141853.
183. Tamura K, Furihata M, Satake H, Hashida H, Kawada C, Osakabe H, et al. SHISA2 enhances the aggressive phenotype in prostate cancer through the regulation of WNT5A expression. *Oncol Lett* 2017;14(6):6650-8.

184. Pei J, Grishin NV. Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors. *Cell Signal* 2012;24(3):758-69.
185. Yamamoto A, Nagano T, Takehara S, Hibi M, Aizawa S. Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell* 2005;120(2):223-35.
186. He X. Antagonizing Wnt and FGF receptors: an enemy from within (the ER). *Cell* 2005;120(2):156-8.
187. Hedge TA, Mason I. Expression of Shisa2, a modulator of both Wnt and Fgf signaling, in the chick embryo. *Int J Dev Biol* 2008;52(1):81-5.
188. Nagano T, Takehara S, Takahashi M, Aizawa S, Yamamoto A. Shisa2 promotes the maturation of somitic precursors and transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos. *Development* 2006;133(23):4643-54.
189. Zhu Y, Tsuchida A, Yamamoto A, Furukawa K, Tajima O, Tokuda N, et al. Expression and roles of a xenopus head-forming gene homologue in human cancer cell lines. *Nagoya J Med Sci* 2008;70(3-4):73-82.
190. Peeples ES, Genaro-Mattos TC. Ferroptosis: A Promising Therapeutic Target for Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 2022;23(13).
191. Marshall KR, Gong M, Wodke L, Lamb JH, Jones DJ, Farmer PB, et al. The human apoptosis-inducing protein AMID is an oxidoreductase with a modified flavin cofactor and DNA binding activity. *J Biol Chem* 2005;280(35):30735-40.
192. Wu M, Xu LG, Li X, Zhai Z, Shu HB. AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277(28):25617-23.
193. Miriyala S, Thippakorn C, Chaiswing L, Xu Y, Noel T, Tovmasyan A, et al. Novel role of 4-hydroxy-2-nonenal in AIFm2-mediated mitochondrial stress signaling. *Free Radic Biol Med* 2016;91:68-80.
194. Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, da Silva MC, Ingold I, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* 2019;575(7784):693-8.
195. Rodriguez J, Zhang Y, Li T, Xie C, Sun Y, Xu Y, et al. Lack of the brain-specific isoform of apoptosis-inducing factor aggravates cerebral damage in a model of neonatal hypoxia-ischemia. *Cell Death Dis* 2018;10(1):3.
196. Koppula P, Lei G, Zhang Y, Yan Y, Mao C, Kondiparthi L, et al. A targetable CoQ-FSP1 axis drives ferroptosis- and radiation-resistance in KEAP1 inactive lung cancers. *Nat Commun* 2022;13(1):2206.
197. King TD, Zhang W, Suto MJ, Li Y. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell Signal* 2012;24(4):846-51.
198. Eubelen M, Bostaille N, Cabochette P, Gauquier A, Tebabi P, Dumitru AC, et al. A molecular mechanism for Wnt ligand-specific signaling. *Science* 2018;361(6403).
199. Cheng P, Liao HY, Zhang HH. The role of Wnt/mTOR signaling in spinal cord injury. *J Clin Orthop Trauma* 2022;25:101760.
200. Menet R, Lecordier S, ElAli A. Wnt Pathway: An Emerging Player in Vascular and Traumatic Mediated Brain Injuries. *Front Physiol* 2020;11:565667.
201. Chong ZZ, Shang YC, Hou J, Maiese K. Wnt1 neuroprotection translates into improved neurological function during oxidant stress and cerebral ischemia through AKT1 and mitochondrial apoptotic pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2010;3(2):153-65.
202. He W, Lu Q, Sherchan P, Huang L, Hu X, Zhang JH, et al. Activation of Frizzled-7 attenuates blood-brain barrier disruption through Dvl/ $\beta$ -catenin/WISP1 signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice. *Fluids Barriers CNS* 2021;18(1):44.
203. Ueno K, Hiura M, Suehiro Y, Hazama S, Hirata H, Oka M, et al. Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Neoplasia* 2008;10(7):697-705.

204. Ueno K, Hazama S, Mitomori S, Nishioka M, Suehiro Y, Hirata H, et al. Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. *Br J Cancer* 2009;101(8):1374-81.
205. Bengochea A, de Souza MM, Lefrançois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, et al. Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2008;99(1):143-50.
206. Merle P, Kim M, Herrmann M, Gupte A, Lefrançois L, Califano S, et al. Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005;43(5):854-62.
207. Zhou F, Cao W, Xu R, Zhang J, Yu T, Xu X, et al. MicroRNA-206 attenuates glioma cell proliferation, migration, and invasion by blocking the WNT/ $\beta$ -catenin pathway via direct targeting of Frizzled 7 mRNA. *Am J Transl Res* 2019;11(7):4584-601.
208. Boustani MR, Khoshnood RJ, Nikpasand F, Taleshi Z, Ahmadi K, Yahaghi E, et al. Overexpression of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in human gliomas. *J Neurol Sci* 2016;363:249-52.
209. Tsai WC, Hueng DY, Lin CR, Yang TC, Gao HW. Nrf2 Expressions Correlate with WHO Grades in Gliomas and Meningiomas. *Int J Mol Sci* 2016;17(5).
210. Picciotto MR, Zoli M, Bertuzzi G, Nairn AC. Immunochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Synapse* 1995;20(1):75-84.
211. Uezu A, Fukunaga K, Kasahara J, Miyamoto E. Activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2002;82(3):585-93.
212. Schmitt JM, Wayman GA, Nozaki N, Soderling TR. Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J Biol Chem* 2004;279(23):24064-72.
213. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, et al. Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Neurosci* 2009;29(43):13720-9.
214. Wayman GA, Kaech S, Grant WF, Davare M, Impey S, Tokumitsu H, et al. Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I. *J Neurosci* 2004;24(15):3786-94.
215. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2014;115:157-88.
216. Cao Q, Qian M, Wang XF, Wang B, Wu HW, Zhu XJ, et al. Negative feedback regulation of Raf/MEK/ERK cascade after sublethal cerebral ischemia in the rat hippocampus. *Neurochem Res* 2011;36(1):153-62.
217. Yang J, Sun M, Cheng R, Tan H, Liu C, Chen R, et al. Pitavastatin activates mitophagy to protect EPC proliferation through a calcium-dependent CAMK1-PINK1 pathway in atherosclerotic mice. *Commun Biol* 2022;5(1):124.
218. Cisneros-Barroso E, Yance-Chávez T, Kito A, Sugiura R, Gómez-Hierro A, Giménez-Zaragoza D, et al. Negative feedback regulation of calcineurin-dependent Prz1 transcription factor by the CaMKK-CaMK1 axis in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 2014;42(15):9573-87.
219. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 2005;37(9):934-5.
220. Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, et al. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell* 2005;8(3):255-65.
221. Levrán O, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 2005;37(9):931-3.
222. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, Lin Y, Han J, Pamidi S, et al. The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(8):2357-62.

223. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001;105(1):149-60.
224. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 2006;38(11):1239-41.
225. Peng M, Litman R, Jin Z, Fong G, Cantor SB. BACH1 is a DNA repair protein supporting BRCA1 damage response. *Oncogene* 2006;25(15):2245-53.
226. Cantor SB, Andreassen PR. Assessing the link between BACH1 and BRCA1 in the FA pathway. *Cell Cycle* 2006;5(2):164-7.
227. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000;10(15):886-95.
228. Zhang F, Fan Q, Ren K, Auerbach AD, Andreassen PR. FANCD2 recruitment and regulation of FANCD2 in DNA damage responses. *Chromosoma* 2010;119(6):637-49.
229. Mani C, Acharya G, Kshirsagar S, Vijayan M, Khan H, Reddy PH, et al. A Novel Role for BRIP1/FANCD2 in Neuronal Cells Health and in Resolving Oxidative Stress-Induced DNA Lesions. *J Alzheimers Dis* 2022;85(1):207-21.
230. Liu N, Pan T. RNA epigenetics. *Transl Res* 2015;165(1):28-35.
231. Jiang J, Seo H, Chow CS. Post-transcriptional Modifications Modulate rRNA Structure and Ligand Interactions. *Acc Chem Res* 2016;49(5):893-901.
232. Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22(2):96-118.
233. Pecoraro V, Rosina A, Polacek N. Ribosome-Associated ncRNAs (rancRNAs) Adjust Translation and Shape Proteomes. *Noncoding RNA* 2022;8(2).
234. Karakas D, Ozpolat B. The Role of LncRNAs in Translation. *Noncoding RNA* 2021;7(1).
235. Park YB, Kim JM. Identification of long non-coding RNA-mRNA interactions and genome-wide lncRNA annotation in animal transcriptome profiling. *J Anim Sci Technol* 2023;65(2):293-310.
236. Widmann R, Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA. [<sup>14</sup>C]leucine incorporation into brain proteins in gerbils after transient ischemia: relationship to selective vulnerability of hippocampus. *J Neurochem* 1991;56(3):789-96.
237. Shigeno T, Yamasaki Y, Kato G, Kusaka K, Mima T, Takakura K, et al. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. *Neurosci Lett* 1990;120(1):117-9.
238. Bodsch W, Barbier A, Oehmichen M, Grosse Ophoff B, Hossmann KA. Recovery of monkey brain after prolonged ischemia. II. Protein synthesis and morphological alterations. *J Cereb Blood Flow Metab* 1986;6(1):22-33.
239. Oxenkrug GF. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1199:1-14.
240. Moroni F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur J Pharmacol* 1999;375(1-3):87-100.
241. Morris G, Carvalho AF, Anderson G, Galecki P, Maes M. The Many Neuroprogressive Actions of Tryptophan Catabolites (TRYCATs) that may be Associated with the Pathophysiology of Neuro-Immune Disorders. *Curr Pharm Des* 2016;22(8):963-77.
242. Cuartero MI, Ballesteros I, de la Parra J, Harkin AL, Abautret-Daly A, Sherwin E, et al. L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke. *Circulation* 2014;130(23):2040-51.
243. Verleysdonk S, Hamprecht B. Synthesis and release of L-serine by rat astroglia-rich primary cultures. *Glia* 2000;30(1):19-26.
244. Yamagata K, Shoji Y, Terashima T, Yokogoshi H. Glutamate reduces secretion of l-serine in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 2006;143(3):729-37.



245. Le Douce J, Maugard M, Veran J, Matos M, Jégo P, Vigneron PA, et al. Impairment of Glycolysis-Derived l-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab* 2020;31(3):503-17.e8.
246. Joshi AD. New Insights Into Physiological and Pathophysiological Functions of Stanniocalcin 2. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:172.
247. Ito D, Walker JR, Thompson CS, Moroz I, Lin W, Veselits ML, et al. Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties. *Mol Cell Biol* 2004;24(21):9456-69.
248. Pan J, Ho M. Role of glypican-1 in regulating multiple cellular signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2021;321(5):C846-C58.
249. Jen YH, Musacchio M, Lander AD. Glypican-1 controls brain size through regulation of fibroblast growth factor signaling in early neurogenesis. *Neural Dev* 2009;4:33.
250. Passarella D, Ciampi S, Di Liberto V, Zuccarini M, Ronci M, Medoro A, et al. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 8 at the Crossroad between Cancer and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2022;23(16).
251. Gallo CM, Ho A, Beffert U. ApoER2: Functional Tuning Through Splicing. *Front Mol Neurosci* 2020;13:144.
252. Dudok JJ, Sanz AS, Lundvig DM, Sothilingam V, Garcia Garrido M, Klooster J, et al. MPP3 regulates levels of PALS1 and adhesion between photoreceptors and Müller cells. *Glia* 2013;61(10):1629-44.
253. Dudok JJ, Sanz AS, Lundvig DM, Wijnholds J. MPP3 is required for maintenance of the apical junctional complex, neuronal migration, and stratification in the developing cortex. *J Neurosci* 2013;33(19):8518-27.
254. Kaya-Aksoy E, Cingoz A, Senbabaoglu F, Seker F, Sur-Erdem I, Kayabolen A, et al. The pro-apoptotic Bcl-2 family member Harakiri (HRK) induces cell death in glioblastoma multiforme. *Cell Death Discov* 2019;5:64.
255. Inohara N, Ding L, Chen S, Núñez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 1997;16(7):1686-94.
256. Salvatore D, Santoro M, Schlumberger M. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 2021;17(5):296-306.
257. Li AY, McCusker MG, Russo A, Scilla KA, Gittens A, Arensmeyer K, et al. RET fusions in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2019;81:101911.
258. Takahashi M. RET receptor signaling: Function in development, metabolic disease, and cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2022;98(3):112-25.
259. Kumar V, Maurya VK, Joshi A, Meeran SM, Jha RK. Integrin beta 8 (ITGB8) regulates embryo implantation potentially via controlling the activity of TGF-B1 in mice. *Biol Reprod* 2015;92(4):109.
260. Cambier S, Gline S, Mu D, Collins R, Araya J, Dolganov G, et al. Integrin alpha(v)beta8-mediated activation of transforming growth factor-beta by perivascular astrocytes: an angiogenic control switch. *Am J Pathol* 2005;166(6):1883-94.
261. Zhang L, Qu Y, Tang B, Zhao F, Xiong T, Ferriero D, et al. Integrin  $\beta$ 8 signaling in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurotox Res* 2012;22(4):280-91.
262. McCandless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein RS. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177(11):8053-64.
263. Selvaraj UM, Ortega SB, Hu R, Gilchrist R, Kong X, Partin A, et al. Preconditioning-induced CXCL12 upregulation minimizes leukocyte infiltration after stroke in ischemia-tolerant mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017;37(3):801-13.
264. Li Y, Tang G, Liu Y, He X, Huang J, Lin X, et al. CXCL12 Gene Therapy Ameliorates Ischemia-Induced White Matter Injury in Mouse Brain. *Stem Cells Transl Med* 2015;4(10):1122-30.

265. Sharma M, Afrin F, Satija N, Tripathi RP, Gangenahalli GU. Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling: indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow. *Stem Cells Dev* 2011;20(6):933-46.
266. Hayakawa J, Migita M, Ueda T, Fukazawa R, Adachi K, Ooue Y, et al. Dextran sulfate and stromal cell derived factor-1 promote CXCR4 expression and improve bone marrow homing efficiency of infused hematopoietic stem cells. *J Nippon Med Sch* 2009;76(4):198-208.
267. Robin AM, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Katakowski M, Zhang L, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(1):125-34.
268. Law AY, Wong CK. Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in HUVECs via VEGF/VEGFR2 and angiopoietin signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2013;374(1-2):73-81.
269. Xiao LJ, Yuan JX, Song XX, Li YC, Hu ZY, Liu YX. Expression and regulation of stanniocalcin 1 and 2 in rat uterus during embryo implantation and decidualization. *Reproduction* 2006;131(6):1137-49.