

## Różna wrażliwość mózgu suwaka mongolskiego (*Meriones unquiculatus*) na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w endogennej neuroprotekcji.

lek. wet. Anita Chęcińska

Promotor/promotor pomocniczy: Prof. dr hab. Barbara Zabłocka/dr Małgorzata Beręsewicz-Haller

Udar mózgu pozostaje jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności oraz śmierci na świecie. Pomimo wielu lat badań, obecne możliwości terapeutyczne są niewielkie i ograniczone do leczenia zamkniętego. Wydaje się, że mechanizmy naturalnej protekcji występujące w mózgu mogą przyczynić się do ustalenia innowacyjnych punktów uchwytu terapii pacjentów po niedokrwieniu mózgu. Przykładem takiego zjawiska, nazywanego endogenną neuroprotekcją, jest odporność komórek regionów CA2, CA3, CA4 i DG hipokampa na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (IR) w przeciwieństwie do selektywnej śmierci neuronów piramidowych regionu CA1. Pomimo wielu lat badań, kwestia różnej wrażliwości na uszkodzenie w obrębie hipokampa pozostaje niewyjaśniona.

Powyzszy projekt skupia się na roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) w mechanizmach endogennej neuroprotekcji w modelu 5-minutowego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych suwaka mongolskiego. Nrf2 jako czynnik transkrypcyjny reguluje ekspresję wielu genów zaangażowanych w procesy antyoksydacyjne, przeciwzapalne, cytoprotekcyjne, jak również regulujące metabolizm komórki i bioenergetykę mitochondriów. Korzystny wpływ aktywacji Nrf2 został wykazany w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych (np. chorobach Parkinsona i Alzheimer), a jeden z jego aktywatorów – fumaran dimetylu – jest stosowany w leczeniu stwardnienia rozsianego.

Celem projektu jest poznanie mechanizmów modulowanych przez Nrf2 w obszarach odpornych na uszkodzenie IR aby znaleźć punkty uchwytu dla przyszłych, nowych terapii udaru mózgu.

Dotychczasowe wyniki prowadzonych badań pokazały, że dwie części hipokampa, CA1 oraz CA2-4, DG, różnią się wyjściową immunoreaktywnością Nrf2 w jądrach komórkowych, a uszkodzenie IR wywołuje opóźniony, długotrwały wzrost aktywności Nrf2 w odpornej na niedokrwienie części CA2-4, DG. Wyniki potwierdzono badając immunoreaktywność znanych białek regulowanych przez Nrf2 m.in. oksygenazy hemowej 1 (HO1) czy podjednostek syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej (GCL), których poziom w kontrolnych i poddanych IR hipokampach korelował z aktywnością Nrf2. Co więcej, otrzymane wyniki pokazują, że farmakologiczna aktywacja Nrf2 działa ochronnie na komórki regionu CA1 w modelu *ex vivo* organotypowej hodowli skrawków hipokampa poddanych uszkodzeniu ekscytotoksycznemu.

Wyniki uzyskane w modelu *ex vivo* potwierdzone zostały w doświadczeniu *in vivo*. Suwacom mongolskim poddanym 5-minutowemu zaciśnięciu tętnic szyjnych podano dootrzewnowo aktywator Nrf2 – sulforafan (SFN, 5 mg/kg mc). Iniekcji dokonano w trakcie trwania niedokrwienia lub w 30 minucie reperfuzji. Zwierzęta poświęcono w 7 dniu po ischemii, a mózgi po perfuzyjnym utrwaleniu poddano analizie histologicznej. Tkanki barwiono standardowym barwieniem topograficznym hematoksylina-eozyna i oceniano w mikroskopie świetlnym. Podobnie jak w modelu *ex vivo*, farmakologiczna aktywacja czynnika transkrypcyjnego Nrf2 *in vivo* istotnie zmniejszyła ilość martwych komórek w regionie CA1 hipokampa w stosunku do osobników poddanych 5-minutowemu zaciśnięciu tętnic szyjnych z podaniem nośnika SFN. Co ważne, efekt protekcyjny zaobserwowano zarówno przy podaniu aktywatora w trakcie trwania niedokrwienia jak i z 30 minutowym opóźnieniem. Wynik ten wskazuje na istnienie okna terapeutycznego dla zastosowania farmakologicznej aktywacji Nrf2. Dzięki temu przydatność kliniczna aktywacji Nrf2 daje realne szanse pacjentom poudarowym którzy trafiają do szpitala już po ostrej fazie uszkodzenia.

W celu poznania nowych ścieżek molekularnych odpowiedzialnych za mechanizmy endogennej neuroprotekcji pod kontrolą Nrf2 przeprowadzono analizę *in silico* z zastosowaniem technik data mining. Korzystając z ogólnodostępnego atlasu sekwencji RNA hipokampa myszy, bazy genów regulowanych przez Nrf2 oraz przeglądu literatury udało się wybrać geny których poziom ekspresji w CA2, CA3, CA4 i DG jest różny od dorsal CA1. Na tej podstawie wyselekcjonowano aż 16 genów wykazujących większą ekspresję w CA2-4, DG niż w dorsal CA1. Takie podejście pozwoliło na wytypowanie nowych szlaków i procesów które mogą być zaangażowane w mechanizm endogennej neuroprotekcji. Rzeczywisty udział wybranych genów i białek w badanym procesie jest aktualnie analizowany.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że CA2-4, DG charakteryzuje się większą aktywnością Nrf2, co wiąże się z naturalną odpornością tego obszaru na stres, a farmakologiczna aktywacja Nrf2 działa protekcyjnie w obszarze CA1 w modelu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego.