



Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

Mgr Karolina Przepiórska-Drońska

**Identyfikacja molekularnych mechanizmów działania  
amorfutyny B w komórkowych modelach  
hipoksyjno-ischemicznych uszkodzeń mózgu: badania  
z wykorzystaniem pierwotnych hodowli mysich neuronów  
i ludzkiej linii mikrogleju**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Farmakologii Uzależnień  
w Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

Promotor:

Prof. dr hab. Małgorzata Kajta

Promotor pomocniczy:

Dr hab. Agnieszka Wnuk

Kraków, 2024 r.

*Pragnę złożyć podziękowania dla Pani Promotor, prof. dr hab. Małgorzaty Kajty, za poświęcony czas, uzyskanie funduszy do przeprowadzenia niniejszych badań, udostępnienie aparatury badawczej oraz cenne uwagi i pomoc okazaną przy powstawaniu niniejszej pracy*

*Z całego serca dziękuję Pani Promotor Pomocniczej, dr. hab. Agnieszce Wnuk, za ciągłą opiekę, przekazanie cennych umiejętności badawczych, zaangażowanie i życzliwość na każdym kroku oraz niezastąpione wsparcie i motywację do dalszej pracy*

*Dziękuję Zespołowi Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki, mgr Bernadecie Pietrzak-Wawrzyńskiej, mgr. inż. Andrzejowi Łachowi oraz Katarzynie Tomczyk, za perfekcyjną atmosferę pracy, cenne dyskusje oraz pomoc w wykonywaniu doświadczeń i nie tylko*

*Dziękuję Pani Dyrektor, prof. dr hab. Małgorzacie Filip oraz Zastępcy Dyrektora ds. Naukowych Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, prof. dr hab. Janowi Manuelowi Rodriguezie Parkitnie, za umożliwienie prowadzenia badań w Instytucie, otwartość na rozmowy i okazane wsparcie*

*Najszersze podziękowania składam Rodzinie i Przyjaciółom, którzy wspierali mnie duchowo i niejednokrotnie służyli pomocą*

*Szczególne podziękowania dla mojego Męża, Mamy i Taty za anielską cierpliwość, opiekę, troskę i oparcie w każdej chwili oraz nieprzemijającą wiarę w moje możliwości*

*Badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach funduszy pochodzących z grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS 16 (nr 2018/31/B/NZ7/01815) na projekt pt. „Poszukiwanie skutecznych strategii ochrony komórek nerwowych przed niedotlenieniem i niedokrwieniem: Identyfikacja mechanizmów neuroprotekcijnego działania nowych ligandów receptorów AhR i PPAR $\gamma$  w eksperymentalnych modelach udaru”.*

*Kierownik grantu: prof. dr hab. Małgorzata Kajta.*



NARODOWE CENTRUM NAUKI

## SPIS TREŚCI

<b>LISTA PRAC STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ</b> .....	1
<b>WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	2
<b>WSTĘP</b> .....	4
Udar niedokrwienny mózgu – patofizjologia i leczenie.....	4
Asfiksja okołoporodowa – patofizjologia i leczenie .....	5
Mechanizmy odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie mózgu wywołane przez deficyty tlenu i substancji odżywczych.....	7
<i>Apoptoza</i> .....	8
<i>Autofagia</i> .....	8
<i>Reakcja zapalna</i> .....	9
<i>Stres oksydacyjny</i> .....	11
<i>Zmiany epigenetyczne</i> .....	11
Badania kliniczne z użyciem nowych metod leczenia niedotlenienia i niedokrwienia mózgu	13
Charakterystyka oraz neuroprotektoryjny potencjał receptora aktywowanego przez proliferatory peroksydomów typu gamma (PPAR $\gamma$ ).....	13
Selektywna modulacja PPAR $\gamma$ przez amorfrutynę B jako nowa propozycja terapeutyczna wobec uszkodzeń hipoksyjno-ischemicznych.....	16
<b>HIPOTEZA BADAWCZA</b> .....	21
<b>CEL BADAŃ</b> .....	22
<b>PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ</b> .....	23
<b>BADANIA STANOWIĄCE OPISOWĄ CZĘŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ</b> .....	24
Metodyka zastosowana w badaniach włączonych do opisowej części rozprawy doktorskiej.	25
Podsumowanie wykorzystanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów	31
Uzasadnienie badań.....	32
Wyniki badań włączonych do opisowej części rozprawy doktorskiej .....	33
<b>PUBLIKACJA 1</b> .....	44
Podsumowanie wykorzystanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów	45
Uzasadnienie badań.....	46
Wyniki badań.....	47

<b>PUBLIKACJA 2</b> .....	50
Podsumowanie wykorzystanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów	51
Uzasadnienie badań .....	52
Wyniki badań .....	53
<b>DYSKUSJA</b> .....	56
Dyskusja wyników uzyskanych z wykorzystaniem mysich neuronów kory mózgowej .....	57
<i>Modele</i> .....	57
<i>Neuroprotekcja i PPARy</i> .....	59
<i>Stres oksydacyjny, apoptoza, autofagia</i> .....	61
<i>Mechanizmy epigenetyczne</i> .....	62
Dyskusja wyników uzyskanych z wykorzystaniem ludzkiej linii mikrogleju HMC3 .....	65
<i>Modele</i> .....	65
<i>Aktywacja mikrogleju i procesy zapalne</i> .....	67
<i>Potencjał proliferacyjny, aktywność metaboliczna i funkcja mitochondriów</i> .....	68
<b>PODSUMOWANIE</b> .....	70
Opisowa część rozprawy doktorskiej .....	70
Publikacja 1 .....	73
Publikacja 2 .....	76
<b>WNIOSKI</b> .....	80
<b>WNIOSKI KOŃCOWE</b> .....	82
<b>STRESZCZENIE</b> .....	84
<b>SUMMARY</b> .....	85
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	87

## **LISTA PRAC STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Przedłożona rozprawa doktorska stanowi pracę hybrydową łącząc elementy tradycyjnej monografii stanowiące część opisową (pkt. 1) oraz wyniki zawarte w opublikowanych artykułach naukowych (pkt. 2 i 3).

1. W opisowej części rozprawy doktorskiej zamieszczono część wyników (Fig. 3, 5, 6, 7, 8 i 10) z publikacji, w której pełnię rolę jednego z dwóch pierwszych autorów o takim samym wkładzie w powstanie publikacji: Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia*. Biomedicines. 2021 Jul 21;9(8):854. doi: 10.3390/biomedicines9080854.

IF<sub>2021</sub> = 4,757; IF<sub>5-letni</sub> = 4,1; MNiSW = 100

Pozostałe wyniki wymienionej publikacji (Fig. 1, 2, 4 i 9) zostały wykorzystane w dziele habilitacyjnym dr hab. Agnieszki Wnuk.

2. Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M. *Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation*. Mol Neurobiol. 2023 Feb;60(2):576-595. doi: 10.1007/s12035-022-03087-9.

IF<sub>2023</sub> = 4,6; IF<sub>5-letni</sub> = 4,7; MNiSW = 100

3. Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

IF<sub>2023</sub> = 5,2; IF<sub>5-letni</sub> = 5,2; MNiSW = 100

*Publikacja nr 1 posiada 2 pierwszych autorów i z tego względu część tej publikacji została włączona do dzieła habilitacyjnego dr hab. Agnieszki Wnuk (wykresy 1, 2, 4 i 9), a pozostała część została włączona do obecnej rozprawy doktorskiej (wykresy 3, 5, 6, 7, 8 i 10) i przedstawiona jako opisowa część rozprawy doktorskiej.*

## WYKAZ NAJCZEŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

**8-OHdG** - 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna, ang. *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*

**AMPA** - kwas  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy, ang.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

**BrdU** - bromodeoksyurydyna, ang. *bromodeoxyuridine*

**Ct** - cykl progowy, ang. *cycle threshold*

**DNMT** - metylotransferaza DNA, ang. *DNA methyltransferase*

**ELISA** - test immunoenzymatyczny, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*

**FBS** - płodowa surowica bydlęca, ang. *fetal bovine serum*

**HAT** - acetylotransferaza histonowa, ang. *histone acetyltransferase*

**HDAC** - deacetylaza histonowa, ang. *histone deacetylase*

**HIF1 $\alpha$**  - czynnik indukowany hipoksją 1-alfa, ang. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*

**HMC3** - linia komórkowa ludzkich komórek mikrogleju klon 3, ang. *human microglial clone 3 cell line*

**LDH** - dehydrogenaza mleczanowa, ang. *lactate dehydrogenase*

**LPS** - lipopolisacharyd, ang. *lipopolysaccharide*

**MCAO** - zamknięcie środkowej tętnicy mózgowej, ang. *middle cerebral artery occlusion*

**mGluR** - metabotropowy receptor glutaminianu, ang. *metabotropic glutamate receptor*

**miRNA** - mikroRNA, ang. *microRNA*

**mRNA** - matrycowy RNA, ang. *messenger RNA*

**MTT** - bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenyltetrazoliowy, ang. *3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenyltetrazolium bromide*

**NMDA** - N-metylo-D-asparaginian, ang. *N-methyl-D-aspartate*

**PGC1 $\alpha$**  - koaktywator receptora gamma aktywowanego przez proliferatory peroksysomów 1 alfa, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

**PPAR $\gamma$**  - receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów typu gamma, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

**PPRE** - element odpowiedzi na proliferatory peroksysomów, ang. *peroxisome proliferator response element*

**qPCR** - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. *quantitative polymerase chain reaction*

**ROS** - reaktywne formy tlenu, ang. *reactive oxygen species*

**rtPA** - rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu, ang. *recombinant tissue plasminogen activator*

**RXR** - receptor retinoidowy X, ang. *retinoid x receptor*

**SEM** - błąd standardowy średniej, ang. *standard error of the mean*

**siRNA** - małe interferujące RNA, ang. *small interfering RNA*

**SPPAR $\gamma$ M** - selektywny modulator receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów typu gamma, ang. *selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator*

**TNF** - czynnik martwicy nowotworów, ang. *tumor necrosis factor*

**TZD** - tiazolidinediony, ang. *thiazolidinediones*



## WSTEP

### **Udar niedokrwienny mózgu – patofizjologia i leczenie**

Udar mózgu jest drugą najczęstszą przyczyną zgonów oraz istotnym powodem niepełnosprawności, co czyni z niego poważny problem cywilizacyjny i rodzi potrzebę opracowania skutecznych metod terapeutycznych. Z raportu Światowej Organizacji Udaru Mózgu (2022) wynika, że każdego roku ponad 12,2 miliona osób cierpi na udar mózgu, spośród których aż 6,5 miliona osób umiera (Feigin i wsp., 2022). Wyróżnia się udar niedokrwienny, który odpowiada za ponad 62% przypadków oraz udar krwotoczny (śródmózgowy lub podpajęczynówkowy), który dotyczy pozostałych 38% przypadków udaru mózgu (Feigin i wsp., 2022; Tadi i Lui, 2023). Zgodnie z raportem NFZ (2023) w Polsce w 2022 roku zarejestrowano 74,7 tys. przypadków udaru niedokrwiennego mózgu, a w stosunku do wcześniejszych lat odnotowano istotny wzrost zapadalności na tę chorobę w młodszych grupach wiekowych (do 54 roku życia). Przyczyną udaru niedokrwiennego mózgu jest zablokowanie tętnic skrzepami powstającymi lokalnie w tętnicach lub docierającymi wraz z krwioobiegami z serca, a w następstwie prowadzącymi do deficytów tlenu i glukozy w odizolowanym od prawidłowej perfuzji obszarze mózgu. Zaburzenia dostarczania tlenu i glukozy (które referuje się słowem „ischemia”) prowadzą do kaskady patofizjologicznych odpowiedzi, które powodują śmierć komórek mózgowych. Obszar bezpośrednio pozbawiony dopływu krwi nazywa się rdzeniem uszkodzenia mózgu, a komórki położone w jego obrębie umierają głównie na drodze martwicy, inaczej nekrozy. Ograniczony przepływ krwi powoduje, że komórki w obszarze sąsiednim rdzenia zwanym strefą półcienia, inaczej penumbra, narażone są na proces ekscytotoksyczności (Zhao, Zhang i wsp., 2022). Wynika ona z nadmiernego uwalniania kwasu glutaminowego, a przyczyną tego zjawiska jest hamowanie zależnych od ATP pomp sodowo-potasowych odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowej polaryzacji błony komórkowej, powodując zaburzone funkcjonowanie transporterów glutaminianu usuwających nadmiar neuroprzekaźnika z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Aktywacja receptorów glutaminergicznych (jonotropowych NMDA i AMPA oraz metabotropowych mGluR) i ich wpływ na masowy napływ jonów wapnia do komórki wyzwała liczne procesy prowadzące do jej śmierci (Guo i Ma, 2021). Czynniki ryzyka związane z wystąpieniem udaru niedokrwiennego obejmują m.in. cukrzycę, nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemię, jak również palenie papierosów (Hurford i wsp., 2020). Ponadto stwierdzono, że u pacjentów u których udar niedokrwienny wystąpił w nocy, początkowe objawy kliniczne są bardziej

nasilone, istnieje większe prawdopodobieństwo wczesnego pogorszenia stanu pacjenta w ciągu 72 godzin oraz większe zagrożenie wystąpienia niepełnosprawności (Ryu i wsp., 2022). Obecnie wykorzystywaną terapią udaru niedokrwiennego jest dożylna tromboliza z użyciem rekombinowanego aktywatora plazminogenu (rtPA; stosowana do około 4,5 godzin od wystąpienia pierwszych objawów) lub mechaniczne usunięcie skrzepu na drodze trombektomii (stosowana do 6 godzin od wystąpienia objawów). Mechaniczna trombektomia może przywrócić przepływ krwi z efektywnością do 90% tej uzyskiwanej przy użyciu rtPA, mając jednocześnie szersze okno terapeutyczne niż rtPA (Samaniego i wsp., 2018). Należy jednak pamiętać, że ze względu na liczne kryteria wykluczenia tj. wąskie okno terapeutyczne, ryzyko wystąpienia poważnych skutków ubocznych (m.in. krwotoków śródmózgowy), czy występowania u pacjenta współistniejących chorób przewlekłych, terapie te stosowane są u jedynie 13-15% pacjentów (Luchowski i Rejdak, 2020). Kolejną istotną wadą, zarówno trombolizy, jak i trombektomii, jest brak ograniczania dodatkowych uszkodzeń mózgu spowodowanych przez stres oksydacyjny i zapalenie w trakcie reperfuzji, a także brak udziału tych terapii w późniejszej neurogenезie i neuroregeneracji uszkodzonych obszarów mózgu. Sprawia to, że tylko około połowa pacjentów leczonych z wykorzystaniem dostępnych terapii odzyskuje funkcjonalny poziom sprawności po udarze niedokrwiennym mózgu (Samaniego i wsp., 2018; Hurd i wsp., 2021).

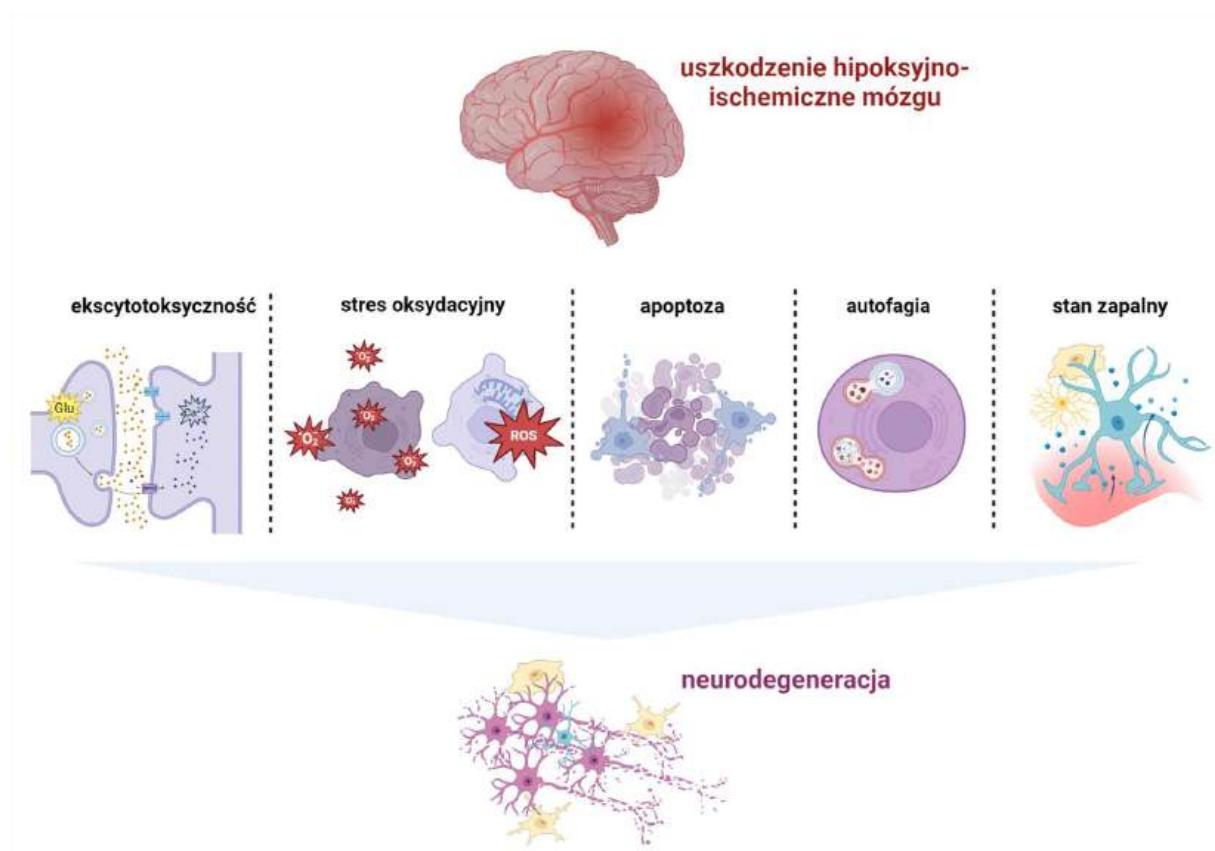
### **Asfiksja okołoporodowa – patofizjologia i leczenie**

Równie istotnym problemem dla współczesnej medycyny jest niedotlenienie okołoporodowe, inaczej asfiksja okołoporodowa, prowadząca do trwałego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Według WHO jest to trzecia najczęstsza przyczyna śmierci noworodków, skutkująca rocznie śmiercią miliona spośród czterech milionów dotkniętych tym schorzeniem dzieci (Fattuoni i wsp., 2015; Walas i wsp., 2020). Badania wskazują, że około 50% przypadków niedotlenienia okołoporodowego występuje przed porodem, 40% w trakcie porodu, a pozostałe 10% tuż po porodzie (Dilenge i wsp., 2001; Mota-Rojas i wsp., 2022). Do przyczyn wystąpienia asfiksji okołoporodowej możemy zaliczyć przewlekłe niedotlenienie matki, przedwczesną lub przedłużającą się akcję porodową, nieprawidłowe ułożenie płodu oraz dużą masę urodzeniową dziecka. W wyniku epizodu niedotlenienia okołoporodowego dochodzi do pogorszenia funkcjonowania różnych organów i układów. Niewydolność wielonarządowa charakteryzująca się m.in. uszkodzeniem nerek, serca oraz mózgu zwiększa ryzyko wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych. Wskazuje

to na potrzebę wszechstronnej oceny stanu zdrowia dziecka narażonego na deficyty tlenu (Bhatti i Kumar 2014). W centralnym układzie nerwowym brak tlenu, inaczej hipoksja, wywołuje niewydolność energetyczną, która wiąże się z obniżeniem aktywności ATP, zaburzoną homeostazą jonową i stresem oksydacyjnym. W początkowym stadium komórki nerwowe ulegają nekrozie, natomiast w kolejnych etapach deficytu tlenu może dojść do akumulacji mleczanów i wystąpienia kwasicy metabolicznej związanej ze zbyt dużym stężeniem dwutlenku węgla we krwi noworodka. Efektem niedotlenienia i wystąpienia kwasicy metabolicznej jest z kolei upośledzenie pracy serca, a następnie niedociśnienie i niedokrwienie wielonarządowe. To tym samym powoduje obumieranie neuronów na drodze apoptozy (Greco i wsp., 2020; Mota-Rojas i wsp., 2022). Niedotlenienie okołoporodowe często prowadzi do encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej, która w umiarkowanym lub ciężkim przebiegu wywołuje szereg zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych takich jak upośledzenie ruchowe, opóźnienie rozwoju poznawczego, utrata wzroku i słuchu, schizofrenia, czy padaczka, które mogą ujawnić się nawet na zaawansowanym etapie rozwoju dziecka (Martinez i wsp., 2014; Denihan i wsp., 2015; Fattuoni i wsp., 2015). Główną metodą leczenia asfiksji okołoporodowej jest hipotermia prowadząca do obniżenia temperatury ciała (33,5–34,5°C przez 72 godziny) oraz zmniejszenia zapotrzebowania komórek na tlen i glukozę (Zewdie i wsp., 2021). Każde obniżenie temperatury ciała o 1°C skutkuje obniżeniem metabolizmu tkanki nerwowej o 6-10% (Darwazeh i Yan, 2013). Terapia hipotermią nie zapewnia jednak pełnej neuroprotekcji, ponieważ około 50% poddanych tej terapii noworodków cierpi na poważne powikłania neurologiczne bądź umiera (Edwards i wsp., 2010). Z uwagi na ryzyko wystąpienia poważnych skutków ubocznych hipotermii, w tym zaostrzenia stanu zapalnego, zaburzeń krzepnięcia krwi oraz krótki czas wdrożenia terapii (do 6 godzin od wystąpienia epizodu), skuteczne leczenie asfiksji okołoporodowej wymaga nowych rozwiązań i postępowań terapeutycznych (Cornette, 2012; Datta, 2017). W badaniach przedklinicznych obiecujące efekty przyniosło stosowanie m.in. erytropoetyny działającej przeciwzapalnie, antyoksydacyjnie i neurotroficznie, czy ksenonu, który hamuje aktywność receptorów NMDA. Jednak w badaniach klinicznych z udziałem noworodków z niewydolnością wielonarządową stosowanie erytropoetyny i ksenonu nie wywołało oczekiwanych oraz długoterminowych efektów leczniczych (Ranjan i Gulati, 2023).

## Mechanizmy odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie mózgu wywołane przez deficyty tlenu i substancji odżywczych

Zakłócenie dopływu krwi do mózgu powoduje kaskadę patofizjologicznych reakcji skutkujących śmiercią komórek nerwowych. Mechanizmy odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie tkanki mózgowej (Rys. 1) obejmują m.in. ekscytotoksyczność, zaburzenia integralności mitochondriów, apoptozę neuronów, autofagię, wytwarzanie reaktywnych form tlenu i stres oksydacyjny oraz aktywację układu immunologicznego i przewlekłą odpowiedź zapalną (Campbell i wsp., 2019). Skuteczna terapia skierowana na uszkodzenia hipoksyjno-ischemiczne powinna koncentrować się na hamowaniu procesów przyczyniających się do śmierci komórek mózgowych w trakcie wczesnej fazy odpowiedzi komórkowej, jak i na stymulowaniu regeneracji tkanki i naczyń krwionośnych w późniejszej fazie (Kajta i wsp., 2016). Ponadto, w celu osiągnięcia bardziej optymalnych wyników terapeutycznych, nowoczesny lek powinien wykazywać plejotropowe działanie zmierzające do osiągnięcia synergicznego efektu neuroprotekcijnego.



**Rys. 1 - Główne mechanizmy odpowiedzi komórkowej na hipoksyjno-ischemiczne uszkodzenie mózgu.** Schemat wykonano przy użyciu oprogramowania BioRender.com.

## ***Apoptoza***

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki prowadzi do fragmentacji DNA, kondensacji cytoplazmy, formowania skupisk heterochromatyny i ciałek apoptotycznych, a następnie eliminacji pozostałości komórkowych przez fagocyty. Wyróżniamy 2 podstawowe ścieżki apoptotyczne: **i.** ścieżkę indukowaną przez specyficzne uszkodzenia, czyli ścieżkę zewnętrzną, w której pośredniczą aktywowane receptory (szlak receptorów śmierci) oraz **ii.** ścieżkę zainicjowaną przez szereg szkodliwych bodźców wewnątrzkomórkowych, czyli ścieżkę wewnętrzną (szlak mitochondrialny apoptozy). Ścieżka zewnętrzna opiera się na związaniu liganda (np. TNF- $\alpha$ , FASL) z receptorem należącym do nadrodziny receptorów śmierci TNF (np. TNFR1, FAS), przekazaniu sygnału z powierzchni komórki do jej wnętrza, a następnie rekrutacji kaspazy-8 oraz aktywacji wykonawczej kaspazy-3 odpowiedzialnej za proteolityczną degradację komponentów komórki. Uszkodzenia wywołane przez czynniki takie jak reaktywne formy tlenu powodują natomiast aktywację ścieżki wewnętrznej, co prowadzi do zmniejszenia integralności błony mitochondrialnej, uwolnienia do cytoplazmy białek apoptotycznych (np. cytochromu c), formowania apoptosomu i aktywacji odpowiednio kaspazy-9 oraz wykonawczej kaspazy-3. Kluczowymi regulatorami tych procesów są białka z rodziny BCL2: proapoptotyczne BID, BAD czy BAX oraz antyapoptotyczne BCL2, BCLXL czy BCLw (Xu i wsp., 2019; D'Arcy, 2019; Lossi, 2022). O ile śmierć komórek w rdzeniu uszkodzenia wywołanego udarem następuje już po kilku minutach głównie na drodze nekrozy, w strefie półcienia, czyli penumbry, procesy apoptotyczne trwają od kilku godzin do dni, a nawet tygodni (Radak i wsp., 2017). Dowodem na udział apoptozy w śmierci komórek inicjowanej przez asfiksję okołoporodową jest zwiększona aktywność kaspazy-3 w mózgach dzieci, które zmarły w wyniku epizodu hipoksyjno-ischemicznego (Rossiter i wsp., 2002). Ze względu na fakt, że apoptoza aktywnie uczestniczy w rozwoju mózgu, układ nerwowy noworodka może być bardziej podatny na śmierć komórek w wyniku apoptozy niż mózg dorosłej osoby (Ferriero i Miller, 2010).

## ***Autofagia***

W odróżnieniu od apoptozy, autofagia („samozjadanie”) może stanowić zarówno mechanizm śmierci komórkowej na drodze nadmiernej degradacji organelli, jak i mechanizm ochronny, sprzyjający przeżyciu komórek dzięki eliminacji nieprawidłowych i dysfunkcyjnych białek i uszkodzonych elementów komórki. Możemy wyróżnić 3 podstawowe rodzaje

autofagii: mikroautofagię, autofagię związaną z chaperonami oraz makroautofagię. Makroautofagia będąca powszechną formą autofagii opiera się na formowaniu autofagosomów, które łącząc się z lizosomami, tworzą autofagolizosomy odpowiedzialne za degradację zawartych w niej składników (Yan i wsp., 2022). W procesie tym bierze udział szereg czynników, w tym białka BECN1, ULK1/2, rodzina białek ATG biorące udział w inicjacji tworzenia autofagosomów oraz MAP1LC3 (konkretnie przetworzona forma LC3-II) regulujące formowanie się autofagosomów i ich fuzję z lizosomami (Wnuk i Kajta, 2017). W wyniku zwiększenia stosunku ilości AMP/ATP podczas niedotlenienia lub niedokrwienia dochodzi do aktywacji kinazy AMPK, będącej czynnikiem inicjującym proces autofagii. Jednakże, wciąż istnieje szereg kontrowersji na temat tego, czy autofagia jest korzystnym, czy szkodliwym procesem w kontekście przeżycia komórek nerwowych, pozycjonując ją jako miecz obosieczny w procesach neurodegeneracyjnych (Shi i wsp., 2021). Część badań sugeruje, że autofagia może utrzymywać homeostazę komórek i zmniejszać uszkodzenia mózgu, jednak istnieje też wiele dowodów na zaangażowanie autofagii w procesy prowadzące do śmierci komórek nerwowych w wyniku epizodów hipoksyjno-ischemicznych (Wu i wsp., 2014; Sekerdag i wsp., 2018). Niezbędne są dalsze badania, aby lepiej zrozumieć mechanizmy autofagii, a poznanie złożoności i dualistycznej natury tego procesu stworzy perspektywę powstania nowych leków, które będą modulować autofagię i wywoływać w ten sposób efekt neuroprotekcyny (Ajooolabady i wsp., 2021).

### ***Reakcja zapalna***

Wczesna reakcja zapalna podczas niedotlenienia okołoporodowego czy udaru niedokrwienego mózgu stanowi naturalną reakcję obronną organizmu, jednakże przewlekłe zapalenie układu nerwowego prowadzi do zaostrzenia pierwotnego uszkodzenia z powodu śmierci komórek na drodze zapalnej (Anthony i wsp., 2022). Funkcja procesów zapalnych może być powiązana ze wzmocnieniem indukowanego przez NMDA napływu jonów  $Ca^{2+}$  i ekscytotoksycznością wobec neuronów (Huang i wsp., 2011; Dresselhaus i Mefferta 2019). Podczas zaburzeń integralności komórek nerwowych uwalnianie są cząsteczki takie jak kwas glutaminowy, białka szoku cieplnego (HSP), czy cytokiny, co prowadzi do proliferacji komórek układu odpornościowego i ich migracji do miejsca uszkodzenia (Yenari i wsp., 2010). Stanowiący 10% populacji komórek dorosłego mózgu mikroglej działa jako pierwsza linia obrony podczas procesów neurodegeneracyjnych poprzez wydzielanie szerokiego spektrum cytokin i chemokin (Li i wsp., 2020; Ochocka i Kaminska 2021; Muzio i wsp., 2021).

Złożoność mechanizmów immunologicznych mikrogleju opiera się na przyjmowaniu przez niego odmiennych fenotypów w zależności od etapu uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego. Prozapalny fenotyp „M1” związany jest z ameboidalną morfologią komórek i wydzielaniem czynników prozapalnych (m.in. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6), zaś przeciwzapalny fenotyp „M2” związany jest z rozgałęzioną morfologią komórek i wydzielaniem czynników przeciwzapalnych (m.in. IL-10, IL-4 i TGF- $\beta$ ) (Taylor i Sansing 2013; Li et al. 2019; Xu et al. 2020). Obecnie przedstawia się dynamiczną koncepcję funkcjonalnych stanów mikrogleju, która zakłada że komórki mikrogleju mogą zmieniać swoje właściwości i funkcje w zależności od odpowiedzi na natężenie uszkodzenia tkanki, plastyczności oraz interakcji z innymi komórkami. Odpowiedź mikrogleju na udar niedokrwienny mózgu możemy podzielić na 3 fazy: **i.** faza ostra (pierwsze godziny uszkodzenia), **ii.** faza podostra (dni i tygodnie po udarze) oraz **iii.** faza przewlekła (miesiące po udarze). Według danych literaturowych w trakcie fazy ostrej dochodzi do ekspresji markerów mikrogleju „M2” i reakcji ochronnej, która ma na celu usunięcie uszkodzonych komórek oraz wspomaganie regeneracji tkanki. Przyjmuje się, że szczyt aktywacji i proliferacji mikrogleju następuje 1-4 dni po udarze mózgu, a odpowiedź na uszkodzenie obejmuje już chroniczny stan zapalny przyczyniając się do dalszej degeneracji tkanki nerwowej (Yenari i wsp., 2010; DeLong i wsp., 2022; Fan i wsp., 2023). Dochodzi wówczas do przekształcenia lokalnie aktywowanego mikrogleju z przeciwzapalnego fenotypu „M2” na prozapalny fenotyp „M1” (Mo, Xu i wsp., 2022). Należy jednak wspomnieć, że najnowsze badania sugerują istnienie dużo bardziej skomplikowanych i złożonych fenotypów mikrogleju (Paolicelli i wsp., 2022). Stosowane we współczesnej literaturze naukowej, jak i w obecnej rozprawie doktorskiej pojęcie binarnej koncepcji („M1”/„M2”) stanowi uproszczoną klasyfikację, która ułatwia porównywanie wyników prac naukowych z ostatnich lat (Paolicelli i wsp., 2022). Na podstawie badań histologicznych wykonanych na tkance mózgu pobranej *post-mortem* od osób dotkniętych udarem niedokrwiennym mózgu, Clausen i wsp. (2020) wykazali, że aktywacja mikrogleju współwystępuje z nasilonym stanem zapalnym i zwiększeniem poziomu prozapalnych mediatorów (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Zmiany te obserwowano w różnych przedziałach czasowych od wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu, co sugeruje, że skuteczna terapia powinna skupiać się nie tylko na neuroprotekcji, ale także na modulacji odpowiedzi immunologicznej mikrogleju wykorzystując dostępne okno terapeutyczne.

## ***Stres oksydacyjny***

Powszechnie wiadomo, że istnieje silny związek pomiędzy stanem zapalnym, a stresem oksydacyjnym, tworzącymi spiralę wzajemnych interakcji (Ciancarelli i wsp., 2023). Stres oksydacyjny ma miejsce w sytuacji gdy równowaga między tworzeniem wolnych rodników, a efektywnością systemu antyoksydacyjnego zostaje utracona. Sprzyja to wówczas uszkodzeniom mitochondriów i DNA, peroksydacji lipidów, oksydacji białek oraz aktywacji wielu szlaków sygnałowych prowadzących do uszkodzenia bariery krew-mózg (Chamorro i wsp., 2016). Stres oksydacyjny jest obecny już od pierwszych minut udaru, a w połączeniu z procesami zapalnymi może przyczyniać się do nasilenia uszkodzeń mózgu podczas reperfuzji (przywrócenia prawidłowego krążenia), utrzymując się nawet przez kilka dni po epizodzie hipoksyjno-ischemicznym (Mollet i wsp., 2022). Stres oksydacyjny odgrywa również istotną rolę w przebiegu niedotlenienia okołoporodowego, gdzie ze względu na dużą zawartość lipidów i żelaza w mózгах noworodków oraz niską aktywność bariery antyoksydacyjnej, układ nerwowy noworodków jest szczególnie narażony na neurotoksyczność wywołaną reaktywnymi formami tlenu (Okazaki i wsp., 2023).

## ***Zmiany epigenetyczne***

Zmiany epigenetyczne to modyfikacje struktury chromatyny, które nie wynikają ze zmian w sekwencji DNA, lecz z biochemicznych modyfikacji DNA i białek histonowych. Odpowiadają one za regulację ekspresji genów decydując, które geny ulegają transkrypcji w danym momencie (Peixoto i wsp., 2020; Lossi i wsp., 2024). Mechanizmy epigenetyczne obejmują metylację DNA, modyfikacje histonów i aktywność niekodujących RNA. Odgrywają one kluczową rolę w różnicowaniu i plastyczności komórek mózgu, a także w formowaniu połączeń synaptycznych, co jest niezwykle istotne dla utrzymania funkcji poznawczych w dorosłym wieku (Hwang i wsp., 2017). Z uwagi na to, że zmiany epigenetyczne wpływają na wiele aspektów funkcjonowania mózgu, zaburzenie mechanizmów epigenetycznych może mieć zasadniczy wpływ na etiologię i progresję chorób neurodegeneracyjnych takich jak udar mózgu, choroba Alzheimerera czy choroba Parkinsona (Ghosh i Saadat i wsp., 2023). Metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej (-CH<sub>3</sub>) do zasad azotowych nukleotydów przy udziale metylotransferaz DNA (DNMT) prowadząc zazwyczaj do wyciszenia transkrypcji genów. Ostatnie badania wykazały, że udarowi niedokrwinnemu towarzyszy zwiększona aktywność DNMT i wzrost poziomu globalnej metylacji DNA (Stanzione i wsp., 2020),



a hamowanie DNMT znacząco redukuje uszkodzenie mózgu wywołane udarem (Choi i wsp., 2018). Odmienne wyniki dotyczą z kolei badań przeprowadzonych na mózgach płodów szczura, u których na skutek niedotlenienia matki doszło do obniżenia poziomu globalnej metylacji DNA (Ducsay i wsp., 2018). Innym typem zmian epigenetycznych, które w istotny sposób wpływają na transkrypcję genów są modyfikacje histonów. Enzymy takie jak acetylotransferazy histonowe (HAT) lub deacetylazy histonowe (HDAC) dodają lub usuwają grupy acetylowe najczęściej w obrębie histonów, co prowadzi odpowiednio do rozluźnienia struktury chromatyny i zwiększonej transkrypcji lub do kondensacji chromatyny i zmniejszonej transkrypcji (Kouzarides, 2007). Równowaga pomiędzy aktywnością HAT oraz HDAC jest istotna dla utrzymania prawidłowej ekspresji genów, a zakłócenie tej aktywności jest częste podczas udaru mózgu (Saha i Pahan, 2005). Choć poszczególne podtypy wspomnianych enzymów mogą być zaangażowane w regulację przeciwstawnych procesów, obecnie naukowcy skupiają się na poszukiwaniu neuroprotektynnej strategii opierającej się na aktywacji HAT i inhibicji HDAC (Uzdensky i Demyanenko, 2021). Zależnymi od  $NAD^+$  enzymami z grupy HDAC są sirtuiny, które regulują szereg procesów biologicznych zarówno poprzez zmiany epigenetyczne, jak i deacetylację niehistonowych białek związanych z metabolizmem i stresem oksydacyjnym (Khoury i wsp., 2018). W warunkach hipoksyjno-ischemicznych sirtuiny posiadają złożoną rolę, ponieważ niektóre, jak SIRT1, promują neuroprotekcję, podczas gdy inne, takie jak SIRT2 przyczyniają się do pogłębienia uszkodzenia mózgu (Wu i wsp., 2022). Obiecujący potencjał w rozwoju nowych terapii skierowanych na leczenie udaru niedokrwienego mózgu oraz niedotlenienia okołoporodowego mają również mikroRNA (miRNA), czyli niekodujące cząsteczki RNA, które posttranskrypcyjnie regulują (najczęściej hamują) ekspresję genów poprzez degradację docelowych mRNA, co w konsekwencji uniemożliwia ich translację (Bartel, 2004; Li i wsp., 2023). Dane literaturowe donoszą, że zmiany ekspresji *miR-9-5p*, *miR-21-5p*, *miR-29*, *miR-132-3p*, *miR-124-3p*, *miR-146a-5p*, *miR-155-5p* i *miR-223-3p* są obserwowane w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (Juźwik i wsp., 2019). Obiecującym biomarkerem udaru niedokrwienego mózgu, o dużym potencjale do wykorzystania w diagnostyce tej choroby, jest *miR-124-3p*, którego poziom rośnie w surowicy pacjentów z udarem niedokrwienym, co koreluje ze stopniem uszkodzenia mózgu (Ji, Ji i wsp., 2016; Liu, Feng i wsp., 2019). Z kolei, dzięki wykorzystaniu mysiego modelu fototrombozy udowodniono, że podawanie do tkanki mózgowej zmodyfikowanych egzosomów zawierających *miR-124* zmniejsza uszkodzenie mózgu poprzez promowanie neurogenety (Yang i wsp., 2017). Biorąc pod uwagę wszystkie wspomniane dane literaturowe, terapie

epigenetyczne oparte na kontrolowaniu poziomu metylacji DNA i aktywności miRNA, a także modyfikacji histonów, oferują możliwość regulacji ekspresji genów, co może stanowić podstawę przyszłych zastosowań klinicznych w leczeniu uszkodzeń mózgu wywołanych niedotlenieniem i niedokrwieniem.

### **Badania kliniczne z użyciem nowych metod leczenia niedotlenienia i niedokrwienia mózgu**

Zrozumienie wzajemnych interakcji i złożoności procesów zachodzących w komórkach z deficytem tlenu i/lub glukozy jest kluczowe dla opracowania skutecznych terapii dla pacjentów cierpiących na udar niedokrwienno-mózgowy czy niedotlenienie okołoporodowe. Obecne wysiłki naukowców i klinicystów skupiają się na poszukiwaniu wielozadaniowych leków przeciwko udarowi mózgu. Wśród nich jest *3K3A-APC* (USA, III faza badań klinicznych), który hamuje apoptozę i stan zapalny; *neu2000* (Korea, III faza badań klinicznych) hamujący ekscytotoksyczność i stres oksydacyjny; *edarawon* i *dexborneol* (Chiny, III faza badań klinicznych; *edarawon* zatwierdzony do leczenia udaru w Japonii) hamujący stres oksydacyjny i stan zapalny; *cerebrolysin* (Polska, II faza badań klinicznych) hamujący ekscytotoksyczność, apoptozę, stres oksydacyjny i stan zapalny, a ponadto wykazujący właściwości neurotroficzne (Muresanu i wsp., 2019; Haupt i wsp., 2023). W najnowszych badaniach klinicznych nad leczeniem perinatalnej asfiksji stosuje się wielokierunkowe podejście terapeutyczne, które obejmuje: *allopuryinol* (redukuje stres oksydacyjny i apoptozę), *melatoninę* (hamuje ekscytotoksyczność, apoptozę, stres oksydacyjny i zapalenie) oraz *sovatelyd* (hamuje uszkodzenia oksydacyjne i stymuluje neurogenezę) (Ranjan i Gulati, 2023; Pluta i wsp., 2023; Engel i wsp., 2024). Biorąc pod uwagę niezwykle skomplikowaną patofizjologię udaru mózgu i niedotlenienia okołoporodowego, przyszła terapia powinna nie tylko być bezpieczna, łatwa w stosowaniu i dobrze tolerowana przez pacjentów, ale także powinna posiadać unikalne cechy stwarzające możliwość wszechstronnego oddziaływania na poszczególne etapy choroby oraz mechanizmy jej powstawania.

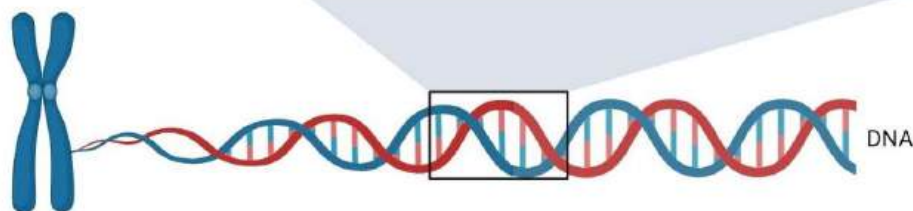
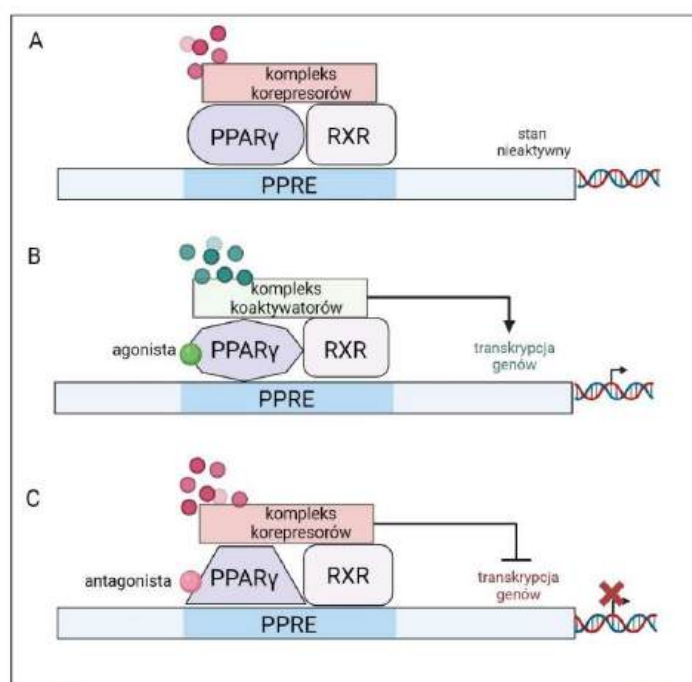
### **Charakterystyka oraz neuroprotekcyny potencjał receptora aktywowanego przez proliferatory peroksydomów typu gamma (PPAR $\gamma$ )**

PPAR $\gamma$  jest czynnikiem transkrypcyjnym, który podobnie jak PPAR $\alpha$  i PPAR $\beta/\delta$ , należy do nadrodziny receptorów jądrowych. Główną funkcją receptora PPAR $\gamma$  jest regulacja transportu i przemiany kwasów tłuszczowych oraz kontrolowanie metabolizmu glukozy

i wrażliwości na insulinę. Inną rolą receptora PPAR $\gamma$  jest utrzymanie homeostazy wielu procesów komórkowych, takich jak proliferacja i różnicowanie komórek, produkcja czynników troficznych oraz równowaga oksydacyjno-redukcyjna (Marion-Letellier i wsp., 2016; Cai i wsp., 2018). PPAR $\gamma$  wykazuje wysoką ekspresję w tkance tłuszczowej, wątrobie, jelicie grubym, sercu, komórkach nabłonkowych i mięśniach szkieletowych. Świadczy to o fundamentalnej roli receptora PPAR $\gamma$  w procesach fizjologicznych. Dodatkowo PPAR $\gamma$  jest istotny dla funkcjonowania komórek układu immunologicznego w tym monocytów, makrofagów, komórek dendrytycznych oraz limfocytów T, pełniąc ważną rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej (Hernandez-Quiles i wsp., 2021). W mózgu, PPAR $\gamma$  występuje głównie w korze przedczołowej, jądrze półleżącym, ciele migdałowatym czy brzusznyemu polu nakrywki, przy czym ulega ekspresji przede wszystkim w neuronach, a w zdecydowanie mniejszym stopniu w astrocytach i mikrogleju. Ponadto udowodniono, że lokalizacja komórkowa PPAR $\gamma$  w mózgu jest ściśle regulowana i zależna od stanu funkcjonalnego mikrogleju. Wykazano, że w stanie spoczynku mikrogleju PPAR $\gamma$  kolokalizuje z neuronami i astrocytami, natomiast po dootrzewnowym podaniu lipopolisacharydu (LPS), który wywołuje stan zapalny, receptor ten kolokalizuje również z komórkami mikrogleju (Warden i wsp., 2016).

Ligandami receptora PPAR $\gamma$  są endogenne związki powstające w wyniku procesów metabolicznych kwasów tłuszczowych lub egzogenne substancje syntetyczne, których selektywność zależy od stężenia liganda, typu komórki oraz poziomu ekspresji receptora. Do endogennych ligandów PPAR $\gamma$  możemy zaliczyć nienasycone kwasy tłuszczowe, a także produkty przemian tych kwasów tj. metabolity kwasu linolowego (13-HODE i 9-HODE), metabolit kwasu arachidonowego (15-HETE) oraz metabolit prostaglandyn (15d-PGJ2). Najlepiej poznanymi agonistami receptora PPAR $\gamma$  są egzogenne substancje syntetyczne m.in. tiazolidinediony (TZD), a przedstawicielami tej grupy są troglitazon, rozyglitazon oraz pioglitazon, znane ze swoich właściwości farmakologicznych w leczeniu chorób metabolicznych (Grygiel-Górniak 2014). Partnerem PPAR $\gamma$  w regulacji ekspresji genów jest najczęściej receptor retinoidowy X (RXR), który łatwo asocjuje z PPAR $\gamma$ , tworząc heterodimery nawet przy braku ligandu (Rys. 2; Feige i wsp., 2005). Mimo iż heterodimer PPAR $\gamma$ /RXR może być obecny w jądrze komórkowym i związany z sekwencją DNA, przy braku ligandów faworyzowana jest jego stabilna interakcja z korepresorami takimi jak np. NCoR lub SMRT, które dodatkowo wiążą deacetylazy histonowe kondensujące chromatynę i hamujące w ten sposób ekspresję genów. Po związaniu ligandu, konformacja kompleksu PPAR $\gamma$ /RXR ulega zmianie, następuje uwolnienie korepresorów oraz przyłączenie koaktywatorów takich jak np. SRC1, CBP lub PGC1 $\alpha$ . Wówczas najczęściej dochodzi

do acetylacji histonów oraz dekondensacji struktury chromatyny, co skutkuje aktywacją transkrypcji i ekspresją genów (Hernandez-Quiles i wsp., 2021). Heterodimer PPAR $\gamma$ /RXR przyłącza się do elementów odpowiedzi (PPRE) znajdujących się w regionie promotorów genów docelowych PPAR $\gamma$ . Jednakże analiza profili wiązania genomowego PPAR $\gamma$  sugeruje, że receptor ten może także wiązać się z wieloma miejscami znajdującymi się w dużej odległości od rejonu promotora, co jest silnie zależne od typu komórki, a nawet jej anatomicznego położenia (Lefterova i wsp., 2010; Madsen i wsp., 2014). Ponadto, oprócz konwencjonalnego mechanizmu regulującego ekspresję genów, PPAR $\gamma$  może niezależnie od RXR i bez konieczności wiązania się z DNA hamować prozapalne szlaki zależne m.in. od NF- $\kappa$ B i AP-1 w komórkach układu odpornościowego. Mechanizm ten polega na hamowaniu degradacji proteasomalnej korepresora przez monomeryczny PPAR $\gamma$  związany z ligandem, w wyniku czego dochodzi do wyciszenia ekspresji czynników takich jak IL-8, MMP12 i iNOS (Pascual i wsp., 2005; Ricote i Glass, 2007).



**Rys. 2 - Rola PPAR $\gamma$  w regulacji ekspresji genów związanych z metabolizmem, proliferacją, plastycznością neuronalną i przebiegiem stanów zapalnych. Schemat wykonano przy użyciu oprogramowania BioRender.com.**

PPAR $\gamma$ , jako główny regulator równowagi metabolicznej bezpośrednio wpływa na geny zaangażowane w homeostazę glukozy, zwiększając między innymi ekspresję transportera glukozy GLUT4 oraz odpowiadając za poziom czynników wydzielanych z tkanki tłuszczowej takich jak adiponektyna, leptyna, czy czynnik martwicy nowotworów TNF- $\alpha$  (Ahmadian i wsp., 2013). Oprócz znaczącego zaangażowania PPAR $\gamma$  w regulację metabolizmu energetycznego, w układzie nerwowym receptor ten odpowiada za kontrolowanie szlaków transkrypcyjnych związanych z plastycznością neuronalną (Wnt/ $\beta$ -katenina), odpowiedzią na stres oksydacyjny (NRF2) i stan zapalny (NF- $\kappa$ B, JAK-STAT) (Kvandová i Dovinova, 2017; Khera i wsp., 2022). W związku z szerokim zakresem oddziaływania receptora PPAR $\gamma$  na mózg, obecnie prowadzone są liczne badania przedkliniczne i kliniczne, mające na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa agonistów PPAR $\gamma$  w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona. Mimo iż pełny agonista PPAR $\gamma$  - pioglitazon - chroni układ nerwowy szczura przed indukowaną przez 6-OHDA neurodegeneracją dopaminergiczną zmniejszając aktywację mikrogleju i hamując szlak transkrypcyjny NF- $\kappa$ B (Machado i wsp., 2019), to jednak w badaniach klinicznych pioglitazon nie hamuje postępu wczesnej choroby Parkinsona. Rozyglitazon znacząco zmniejszał poziom markerów neuropatologicznych w mysim transgenicznym modelu choroby Alzheimera tj. agregację i oligomeryzację A $\beta$ , aktywację astrocytów i mikrogleju poprzez aktywację szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina oraz polepszał pamięć przestrzenną (Toledo i Intestrosa, 2010), ale w badaniach klinicznych nad chorobą Alzheimera nie odniósł sukcesu, głównie poprzez słabą penetrację mózgu i niskie bezpieczeństwo stosowania (Gold i wsp., 2010). Badania kliniczne z użyciem agonistów PPAR $\gamma$  wciąż są kontynuowane, jednak z powodu niepowodzeń i ryzyka poważnych skutków ubocznych badacze kierują swoją uwagę na nowe generacje ligandów receptora PPAR $\gamma$  tj. niekanoniczne ligandy receptora PPAR $\gamma$  oraz selektywne modulatory PPAR $\gamma$  (SPPAR $\gamma$ M).

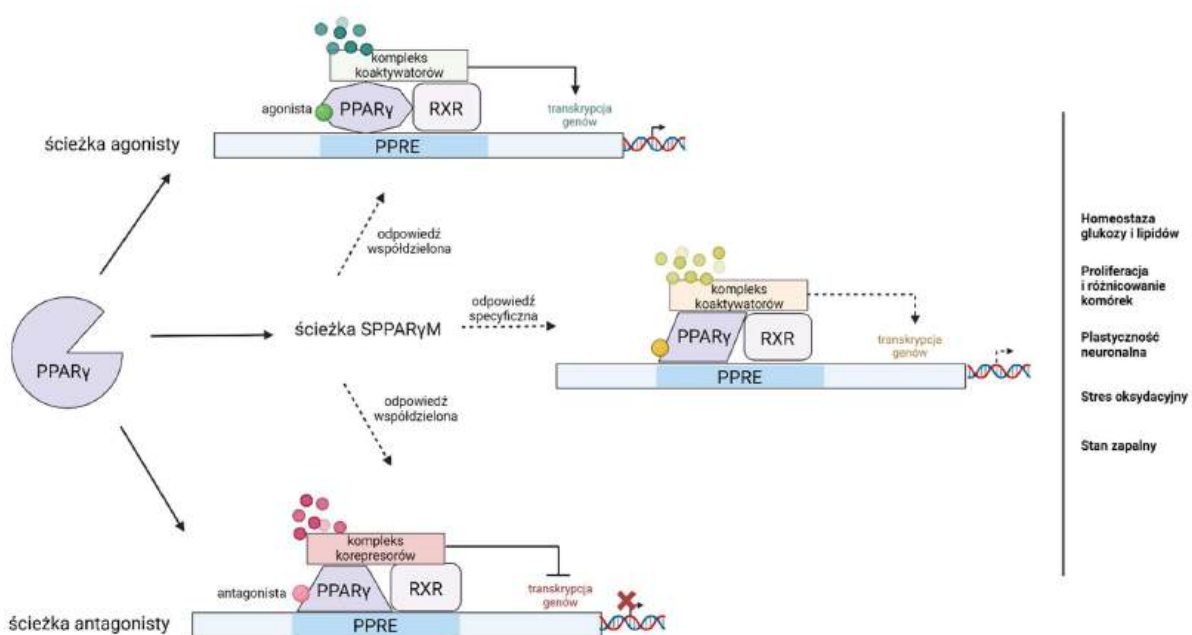
### **Selektywna modulacja PPAR $\gamma$ przez amorfrutynę B jako nowa propozycja terapeutyczna wobec uszkodzeń hipoksyjno-ischemicznych**

Liczne badania dowodzą, że istnieje silna zależność między obecnością zaburzeń metabolicznych, a ryzykiem wystąpienia udaru niedokrwienego mózgu (Air i wsp., 2007; Maida i wsp., 2022; Wang i Chen, 2023). Udowodniono, że cukrzyca znacząco zwiększa ryzyko wystąpienia udaru niedokrwienego mózgu i jest częstym współistniejącym schorzeniem u pacjentów z udarem. Dodatkowo, hiperglikemia wykazuje wyraźne powiązanie

ze zwiększeniem ryzyka powikłań po przebytych udarze mózgu (Sarwar i wsp., 2010; Lau i wsp., 2019). Odnosząc się do informacji dotyczących funkcji receptora PPAR $\gamma$ , elementem towarzyszącym cukrzycy typu 2 oraz zaburzeniom gospodarki lipidowej jest zmniejszenie ekspresji PPAR $\gamma$  w tkance tłuszczowej, mięśniowej lub wątrobie (Choi i wsp., 2014). Co więcej, udowodniono że myszy z nokautem *Pparg* specyficznym dla neuronów doświadczają większych uszkodzeń mózgu w modelu zamknięcia środkowej tętnicy mózgowej, MCAO (Zhao i wsp., 2009). Badania te podkreślają istotne znaczenie modulacji PPAR $\gamma$  jako potencjalnego punktu uchwytu nowych leków, które mogą być stosowane nie tylko w leczeniu cukrzycy typu 2, ale także w terapii zaburzeń wynikających z niedotlenienia lub niedokrwienia mózgu. Terapie oparte na tej zależności mogą zatem oferować kompleksowe korzyści zdrowotne, jednocześnie redukując hiperglikemię, chroniąc przed hiperlipidemią i miażdżycą (wysokie czynniki ryzyka wystąpienia niedotlenienia i niedokrwienia mózgu), a jednocześnie działając neuroprotekcyjnie (Liu i Wang., 2019). Metaanaliza badań eksperymentalnych wykazała, że podawanie rozyglitazonu lub pioglitazonu gryzoniom poddanym niedokrwieniu mózgu łagodzi skutki uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego poprzez zmniejszanie obszaru objętego niedokrwieniem i poprawę funkcji neurologicznych (White i Murphy 2010). W badaniach klinicznych stosowanie pioglitazonu u pacjentów z cukrzycą typu 2 zmniejsza ryzyko wystąpienia udaru niedokrwinnego mózgu. Jednak stosowanie tego leku przeciwcukrzycowego stanowiło ryzyko wystąpienia poważnych skutków ubocznych tj. zaburzeń struktury kości, obrzęku kończyn oraz duszności (Kernan i wsp., 2016; Hung i wsp., 2020). Z biegiem czasu zaczęto kwestionować bezpieczeństwo wykorzystywania TZD; troglitazon został wycofany z rynku farmaceutycznego z powodu wywoływania hepatotoksyczności (Yokoi 2009), stosowanie rozyglitazonu wiązało się ze zwiększonym ryzykiem niewydolności serca (Cheng i wsp., 2018), zaś stosowanie pioglitazonu zwiększało ryzyko wystąpienia raka pęcherza moczowego (Tang i wsp., 2018). Z tego względu, część ze wspomnianych leków została wycofana z rynku farmaceutycznego, a obecne wysiłki naukowców skupiają się na poszukiwaniu innowacyjnych i niekonwencjonalnych alternatyw dla TZD.

Poszukiwanie nieznanymi wcześniej substancji selektywnie modulujących receptor PPAR $\gamma$  ma na celu opracowanie nowej klasy wysoce ukierunkowanych leków, które zachowają przeciwcukrzycową skuteczność TZD, ale jednocześnie nie będą wywoływać typowych dla nich działań niepożądanych (Ahmadian i wsp., 2013). SPPAR $\gamma$ M aktywują receptor poprzez modulację interakcji PPAR $\gamma$  z czynnikami aktywującymi (koaktywatorami) lub hamującymi (korepresorami) transkrypcję genów, w wyniku czego dochodzi

do specyficznych efektów w określonych tkankach. W zależności od struktury chemicznej ligandu, dana substancja przyłącza się do kieszeni wiążącej receptora i w specyficzny sposób indukuje zmianę konformacyjną PPAR $\gamma$ , wywołując w ten sposób selektywne wiązanie kofaktorów i jedynie częściową odpowiedź transkrypcyjną w postaci ekspresji docelowych genów (Balint i Nagy 2006). SPPAR $\gamma$ M mogą współdzielić kofaktory wraz z agonistami lub antagonistami, co skutkuje zbieżnymi odpowiedziami biologicznymi w danej tkance. Substancje z tej grupy mogą także wykazywać unikalny profil wiązania receptor-kofaktor, co prowadzi do specyficznej i charakterystycznej dla danej substancji odpowiedzi biologicznej (Rys. 3). Częściowa odpowiedź transkrypcyjna może przyczyniać się do uniknięcia charakterystycznych dla pełnej aktywacji receptora działań niepożądanych, podczas gdy pełna aktywacja receptora wiąże się z poważnymi skutkami ubocznymi agonistów. Zatem profil działania ligandu zależy od rodzaju zmian w konformacji receptora jakie wywołuje, a także dostępności koaktywatorów i korepresorów w danej tkance (Yew i wsp., 2012).

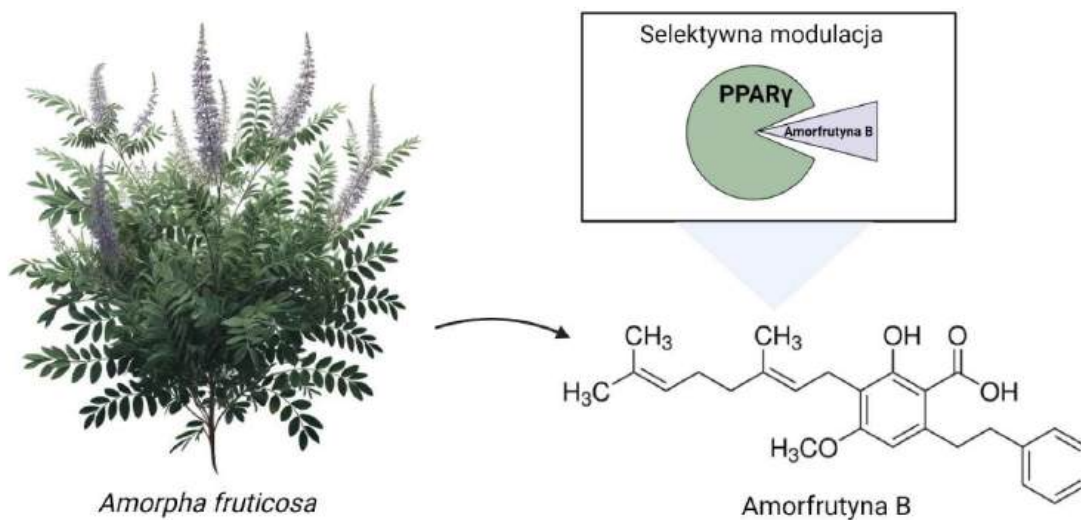


**Rys. 3 - Porównanie zakresu odpowiedzi komórkowej wywołanej przez podanie selektywnego modulatora receptora PPAR $\gamma$ .** Schemat wykonano przy użyciu oprogramowania BioRender.com.

Ciekawym kandydatem do badań eksperymentalnych jest amorfrutyna B (kwas 3-(3,7-dimetylooktylo)-2-hydroksy-4-metoksy-6-(2-feniloetylo)benzoowy) będąca SPPAR $\gamma$ M wyizolowanym z *Amorpha fruticosa* (amorfa krzewiasta), rośliny pochodzącej z Ameryki

Północnej, a w Europie odnotowanej jako gatunek inwazyjny (Rys. 4). Wyekstrahowana z jej owoców amorfutyna B należy do grupy związków polifenoli, a coraz więcej danych literaturowych wskazuje na przeciwcukrzycowy i przeciwzapalny potencjał działania tej substancji (Chen i wsp., 2015; Kozuharova i wsp., 2017). Badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że amorfutyna B selektywnie aktywuje receptor PPAR $\gamma$  i ekspresję podzbioru genów związanych z metabolizmem glukozy/lipidów oraz stanem zapalnym, unikając przy tym skutków ubocznych typowych dla TZD (Chen i wsp., 2018). Na podstawie charakterystyki parametru EC50, czyli wskaźnika określającego stężenie substancji potrzebne do osiągnięcia 50% maksymalnej odpowiedzi biologicznej, udowodniono że spośród wszystkich podtypów receptora PPAR, PPAR $\gamma$  jest najłatwiej aktywowany przez amorfutynę B, nawet przy niskich stężeniach substancji ( $K_i = 0,02 \mu\text{M}$ ) (Lavecchia i Di Giovanni, 2015). Ponadto, porównując amorfutynę B z innymi substancjami z tej grupy, jest to najbardziej efektywna cząsteczka wiążąca się z PPAR $\gamma$ , ze względu na obecność w swojej budowie grupy karboksylowej oraz hydrofobowego łańcucha bocznego (de Groot i wsp., 2013). W mysich modelach otyłości i cukrzycy podawanie amorfutyny B w dawce 100 mg/kg przeciwdziałołło stłuszczeniu wątroby oraz zwiększało wrażliwość na insulinę poprzez selektywną aktywację PPAR $\gamma$ , nie powodując jednocześnie skutków ubocznych typowych dla TZD, takich jak retencja płynów, przyrost masy ciała czy problemy kostne (Weidner i wsp., 2012; Weidner i wsp., 2013). Co więcej, amorfutyna B wykazuje szeroki zakres innych efektów biologicznych, w tym właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne (Fuhr i wsp., 2015; Liu S. i wsp., 2018; Xu i wsp., 2018). Mimo obiecujących danych związanych z potencjalnym wykorzystaniem amorfutyny B w leczeniu chorób metabolicznych, amorfutyna B nie była dotychczas badana w kontekście efektów neuroprotektoryjnych w modelach neurodegeneracji, w tym w modelach udaru niedokrwienego mózgu czy niedotlenienia okołoporodowego. Unikalne właściwości oraz korzystny profil farmakologiczny SPPAR $\gamma$ M otwierają nowe perspektywy dla zastosowania tych ligandów w leczeniu uszkodzeń hipoksyjno-ischemicznych mózgu, a także dla projektowania innowacyjnych leków skierowanych na szlak sygnałowy związany z receptorem PPAR $\gamma$ .





*Rys. 4 - Wzór strukturalny amorfrutyny B. Schemat wykonano przy użyciu oprogramowań BioRender.com i DALL-E.*

## **HIPOTEZA BADAWCZA**

Podstawowa hipoteza badawcza zakłada, że:

- Amorfrutyna B chroni komórki nerwowe myszy przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją oraz ischemią poprzez zahamowanie stresu oksydacyjnego i zmianę statusu epigenetycznego neuronów, przy udziale ścieżki sygnałowej angażującej receptor PPAR $\gamma$ .
- Mechanizm neuroprotekcynego działania amorfrutyny B obejmuje hamowanie apoptozy i autofagii oraz regulację profilu ekspresji szeregu miRNA.
- Amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją oraz ischemią aktywację komórek ludzkiego mikrogleju, głównie poprzez wyciszenie procesów zapalnych, hamowanie potencjału proliferacyjnego i ustabilizowanie aktywności metabolicznej komórek.

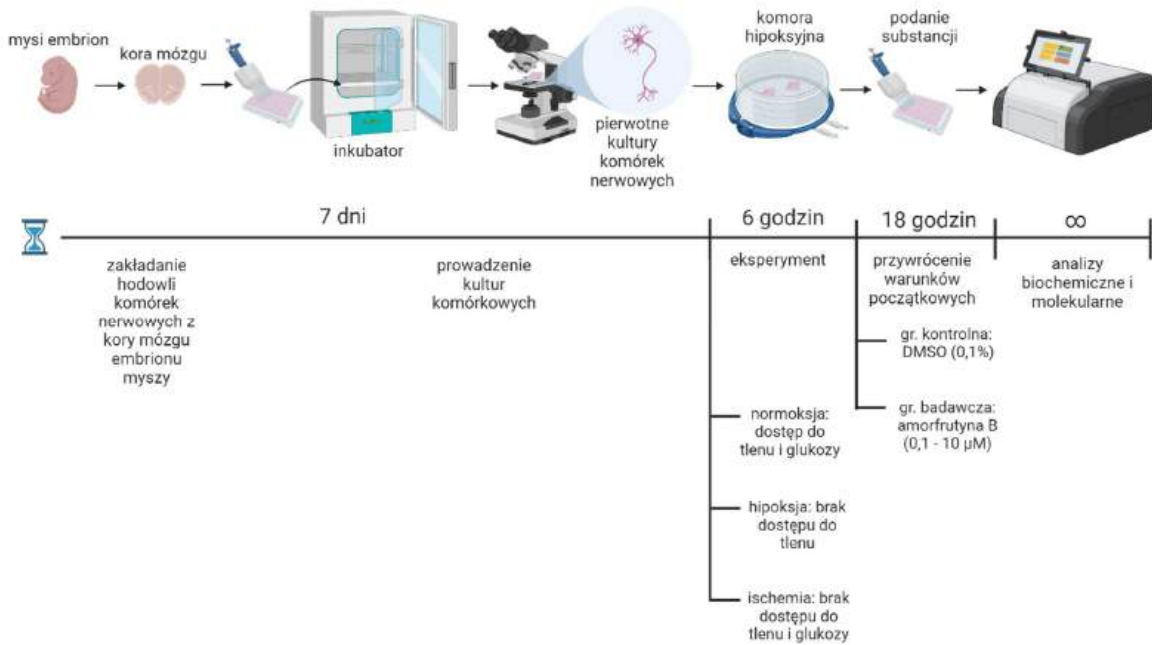
## CEL BADAŃ

Udar niedokrwienny mózgu oraz niedotlenienie okołoporodowe są jednymi z głównych czynników prowadzących do zgonów na świecie, stanowiąc poważne wyzwanie dla medycyny i nauk pokrewnych. Dostępne terapie, w tym farmakoterapie udaru niedokrwiennego mózgu i niedotlenienia okołoporodowego mają szereg ograniczeń związanych zwłaszcza z wąskim oknem terapeutycznym i występowaniem poważnych skutków ubocznych. Konieczne jest zatem znalezienie leku o szerokim oknie terapeutycznym oraz zminimalizowanych skutkach ubocznych. Dysfunkcje metaboliczne, w tym cukrzyca, zwiększają ryzyko wystąpienia epizodów hipoksyjno-ischemicznych. Z tego względu można przypuszczać, że oddziaływanie na szlak sygnałowy receptora PPAR $\gamma$ , o którym wiadomo, że reguluje szlaki metaboliczne m.in. w tkance tłuszczowej, wątrobie i mięśniach szkieletowych, a równocześnie pośredniczy w neuroprotekcji, może być punktem wyjścia do opracowania nowych narzędzi farmakologicznych służących leczeniu udaru mózgu i asfiksji okołoporodowej. Szczególną uwagę zwracają substancje z grupy SPPAR $\gamma$ M, które w odróżnieniu od klasycznych agonistów receptora, oddziałują na szlak sygnałowy PPAR $\gamma$  wywołując częściową odpowiedź transkrypcyjną, tym samym minimalizując działania niepożądane obecne przy pełnej aktywacji receptora. Poprzez unikalne połączenie właściwości SPPAR $\gamma$ M, wysokiego powinowactwa do receptora oraz profilu farmakologicznego pozbawionego skutków ubocznych, amorfutyna B może być obiecującą substancją do opracowania przyszłych terapii chorób neurodegeneracyjnych. Badanie molekularnych mechanizmów za pośrednictwem których amorfutyna B reguluje procesy związane z uszkodzeniem hipoksyjnym i ischemicznym oraz kształtuje fenotyp mikrogleju, może przyczynić się do opracowania nowej terapii udaru niedokrwiennego mózgu i niedotlenienia okołoporodowego. Z tego względu badania przedstawione w obecnej rozprawie doktorskiej miały na celu:

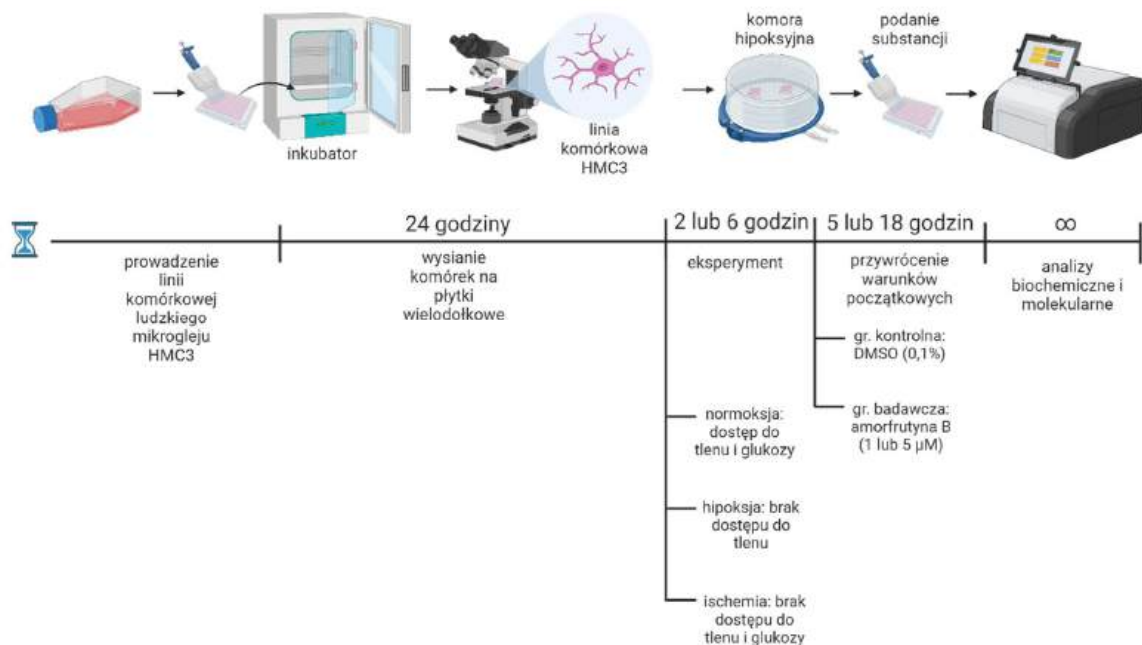
- I. Opracowanie komórkowych modeli niedotlenienia i niedokrwienia mózgu.
- II. Określenie neuroprotekcyjnych właściwości amorfutyny B oraz zaangażowania szlaku sygnałowego PPAR $\gamma$  w jej działanie w neuronach poddanych hipoksji oraz ischemii.
- III. Identyfikację molekularnych mechanizmów działania amorfutyny B w kontekście stresu oksydacyjnego, procesów apoptozy i autofagii oraz statusu epigenetycznego mysich neuronów.
- IV. Określenie wpływu amorfutyny B na wywołaną hipoksją/ischemią aktywację komórek ludzkiego mikrogleju.

## PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

### a) embrionalne kultury mysich komórek nerwowych



### b) linia komórkowa ludzkiego mikrogleju HMC3



*Schematy wykonano przy użyciu oprogramowania BioRender.com.*

## **BADANIA STANOWIĄCE OPISOWĄ CZĘŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

W opisowej sekcji mojej rozprawy doktorskiej przedstawiam tylko część wyników z publikacji, w której pełnię rolę jednego z dwóch pierwszych autorów o takim samym wkładzie w powstanie publikacji:

Wnuk A\*, Przepiórska K\*, Pietrzak BA, Kajta M. *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia*. *Biomedicines*. 2021 Jul 21;9(8):854. doi: 10.3390/biomedicines9080854.

### **\*Pierwsi autorzy o równorzędnym wkładzie w powstanie publikacji**

Część wyników z powyższej publikacji (Fig. 1, 2, 4 i 9) została wykorzystana w dziele habilitacyjnym dr hab. Agnieszki Wnuk.

Pozostałe wyniki wymienionej publikacji (Fig. 3, 5, 6, 7, 8 i 10) zostały włączone do niniejszej rozprawy doktorskiej.

# METODYKA ZASTOSOWANA W BADANIACH WŁĄCZONYCH DO OPISOWEJ CZĘŚCI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

## 1. Pierwotne hodowle komórek nerwowych

Pierwotna hodowla neuronów została uzyskana z kory mózgowej pobranej z 15-dniowych płodów myszy szczepu Swiss Albino CD-1 (*Charles River, Niemcy*). Wyizolowana tkanka została mechanicznie rozdrobniona oraz enzymatycznie zdysocjowana przy użyciu 0,1% roztworu trypsyny. Zawiesina komórek była inkubowana przez 15 minut w 37°C aż do momentu zneutralizowania działania trypsyny poprzez dodanie 10% roztworu płodowej surowicy bydlęcej (*Sigma-Aldrich, USA*). Po wirowaniu w warunkach 1500 × g przez 5 minut, uzyskany pelet został zawieszony w pożywce hodowlanej, a komórki zostały policzone przy użyciu automatycznego licznika EVE™ Plus (*NanoEnTek, Korea Południowa*). Komórki zostały wysiane w standardowej pożywce hodowlanej (*Gibco, USA*) suplementowanej antybiotykiem (penicylina i streptomycyna), L-glutaminą (*Sigma-Aldrich, USA*) oraz B27 (*Gibco, USA*) w gęstości  $\sim 2.0 \times 10^5$  na płytkach wielodołkowych pokrytych roztworem poli-L-ornityny (0,01 mg/ml; *Sigma-Aldrich, USA*). Kultury komórkowe były hodowane w inkubatorze (*New Brunswick Scientific, USA*) przez 7 dni w 37°C, przy dużej wilgotności (95 – 97% RH) oraz 5% zawartości CO<sub>2</sub>.

## 2. Komórkowe modele niedotlenienia i niedokrwienia mózgu

### I. Eksperymentalny model niedotlenienia mózgu (hipoksja)

W 7 dniu prowadzenia kultur komórkowych pożywka hodowlana została wymieniona na standardowe medium (*Gibco, USA*), a komórki nerwowe poddane hipoksji poprzez ich umieszczenie w komorze hipoksyjnej (*Billups-Rothenberg, Inc., USA*) znajdującej się w inkubatorze (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) na 6 godzin. Poziom O<sub>2</sub> w komorze hipoksyjnej zmierzony z wykorzystaniem analizatora tlenu (*Greisinger, Niemcy*) osiągnął wartość bliską zeru. Po 6 godzinach pożywka hodowlana została ponownie wymieniona na standardowe medium, a na czas 18-godzinnej reoksygenacji polegającej na przywróceniu dostępu do tlenu, komórki znajdowały się w inkubatorze przy zachowaniu 37°C otoczenia oraz 5% zawartości CO<sub>2</sub>.

## **II. Eksperymentalny model niedokrwienia mózgu (ischemia)**

W 7 dniu prowadzenia kultur komórkowych, komórki nerwowe zostały poddane ischemii polegającej na pozbawieniu komórek dostępu do glukozy i tlenu, poprzez zmianę pożywki hodowlanej na medium bez glukozy (*Gibco, USA*) oraz umieszczeniu kultur komórkowych w komorze hipoksyjnej znajdującej się w inkubatorze (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) na 6 godzin. Poziom O<sub>2</sub> bliski zeru został potwierdzony przy użyciu analizatora tlenu. Po 6 godzinach pożywka hodowlana została wymieniona na standardowe medium zawierające glukozę, a podczas 18-godzinnej reoksygenacji komórki znajdowały się w inkubatorze przy zachowaniu 37°C i 5% zawartości CO<sub>2</sub>.

### **3. Podanie amorfrutyny B komórkom nerwowym**

W trakcie eksperymentu grupę kontrolną stanowiły komórki poddane działaniu rozpuszczalnika testowanej substancji tj. dimetylosulfotlenku (DMSO; *Sigma-Aldrich, USA*) o końcowym stężeniu 0,1%, natomiast grupę badawczą stanowiły komórki traktowane amorfrutyną B (*Sigma-Aldrich, USA*). Badane substancje były podawane po 6 godzinach hipoksji lub ischemii (tzw. paradygmat pourazowy; *post-treatment*), na początku procesu reoksygenacji/przywrócenia dostępu do glukozy. Wyniki przedstawione w opisowej części rozprawy doktorskiej odnoszą się do efektów działania amorfrutyny B użytej w stężeniu 5 µM (z wyjątkiem eksperymentu z wykorzystaniem siRNA, gdzie amorfrutyna B była również użyta w stężeniu 1 µM). Podane stężenie wywoływało najsilniejszy efekt neuroprotekcyny oraz zostało wybrane na podstawie porównania efektów działania różnych stężeń amorfrutyny B opisanego w publikacji **Wnuk, Przepiórska i wsp., 2021**. Dla wszystkich eksperymentów został zastosowany paradygmat *post-treatment*, ponieważ odzwierciedla on lepiej aspekty kliniczne z uwzględnieniem przyjętego obecnie okna terapeutycznego.

### **4. Ocena poziomu dehydrogenazy mleczanowej (LDH)**

Dehydrogenaza mleczanowa jest enzymem zaangażowanym w produkcję energii w organizmie i jednocześnie wskaźnikiem uszkodzenia komórek. Wykorzystana w obecnym badaniu metoda kolorymetryczna z użyciem LDH Cytotoxicity Detection Kit (*Roche, Szwajcaria*) polegała na konwersji mleczanu do pirogronianu pod wpływem LDH, a następnie redukcji soli tetrazolowych do soli formazanowych. Po 30-minutowej inkubacji nadsącza komórkowego

z reagentem, intensywność czerwonego koloru wywołanego obecnością soli formazanowych została zmierzona przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplacytek Infinite M200pro (*Tecan, Szwajcaria*). W stosowanym teście, poziom absorbancji jest proporcjonalny do stopnia uszkodzenia komórek. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli  $\pm$  SEM.

## 5. Pomiar ilości reaktywnych form tlenu (ROS)

Poziom nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) w komórkach nerwowych narażonych na hipoksję/ischemię oraz działanie amorfrutyny B został zmierzony metodą luminescencyjną z użyciem ROS-Glo™  $H_2O_2$  Assay (*Promega, USA*). Dodanie substratu do materiału badawczego zawierającego  $H_2O_2$  spowodowało powstanie prekursora lucyferyny, który następnie został przekształcony przez reagent detekcyjny ROS-Glo™ do lucyferyny. Na skutek utlenienia lucyferyny doszło do luminescencji i emisji sygnału świetlnego, proporcjonalnego do ilości  $H_2O_2$  w próbce. Bioluminescencję zmierzono po 20 minutach przy pomocy luminometru GloMax Navigator (*Promega, USA*), a uzyskane wyniki zostały przedstawione jako procent kontroli  $\pm$  SEM.

## 6. Określenie stopnia uszkodzenia oksydacyjnego DNA/RNA

Oznaczenie poziomu 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG) przy pomocy zestawu ELISA DNA/RNA Oxidative Damage Kit (*Cayman Chemical, USA*) pozwoliło wykryć oksydacyjne uszkodzenia DNA/RNA w komórkach poddanych hipoksji/ischemii oraz traktowanych amorfrutyną B. Wykonany test immunologiczny polegał na powstaniu kompleksu 8-OHdG-przeciwciała-znacznik, a następnie dodaniu reagentu Ellmana. W wyniku reakcji enzymatycznej otrzymano produkt o żółtej barwie, którego absorbancję określono po 2 godzinach inkubacji, przy długości fali 412 nm z użyciem czytnika mikroplacytek Infinite M200pro. Intensywność zabarwienia była odwrotnie proporcjonalna do poziomu wolnego 8-OHdG, a wyniki zostały przedstawione jako ilość 8-OHdG  $\pm$  SEM.

## 7. Wyciszenie genu kodującego *Pparg* przy pomocy specyficznego siRNA

W celu wyciszenia genu *Pparg* zastosowano specyficzne siRNA blokujące ekspresję genu na poziomie mRNA. Dzień przed eksperymentem reagent zawierający pożywkę bez antybiotyku, 50 nM siRNA (*Santa Cruz Biotechnology Inc., USA*) oraz INTERFERin (nośnik siRNA; *PolyPlus Transfection, Francja*) został podany komórkom nerwowym



na 7 godzin. Po transfekcji pożywka została zastąpiona standardowym medium, a kultury komórek inkubowano do następnego dnia doświadczenia. Jako kontrolę negatywną zastosowano siRNA (tzw. negative siRNA; *Qiagen, Niemcy*) niekomplementarne do żadnej znanej sekwencji mRNA w komórce, a więc niewywołujące degradacji mRNA. Ze względu na możliwość niespecyficznego wpływu siRNA na przeżycie komórek, wykorzystano zarówno 1 oraz 5  $\mu$ M amorfutynę B w celu dodatkowego potwierdzenia swoistego działania wyciszenia genu.

## **8. Analiza qPCR mRNA specyficznych dla genów kodujących *Hif1a*, *Pparg*, *Pgc1a* oraz *Adipoq***

Całkowite RNA zostało wyizolowane i oczyszczone metodą kolumnkową przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (*Qiagen, Niemcy*). Spektrofotometryczny pomiar ilości i czystości RNA przeprowadzono na podstawie pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 260 nm i określenia stosunku gęstości optycznej przy długościach fal 260/280 nm. Pierwszy etap reakcji qPCR obejmował odwrotną transkrypcję RNA z użyciem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Thermo Fisher Scientific, USA*), a powstała matryca cDNA wykorzystana została w drugim etapie do amplifikacji na drodze reakcji PCR. Mieszanina reakcyjna do PCR zawierała odpowiednio 1  $\mu$ l cDNA, 10  $\mu$ l FastStart Universal Probe Master (*Roche, Szwajcaria*), 8  $\mu$ l wody wolnej od RNaz oraz 1  $\mu$ l fluorescencyjnej sondy typu TaqMan (swoistej dla *Hif1a*, *Pparg*, *Pgc1a* oraz *Adipoq*; *Thermo Fisher Scientific, USA*). Warunki reakcji PCR obejmowały standardowe parametry termiczne przewidziane przez producenta: 2 minuty w 50°C i 10 minut w 95°C, następnie 40 cykli po 15 sekund w 95°C i 1 minucie w 60°C. Cały proces przeprowadzono przy użyciu systemu CFX96 Touch Real-Time PCR Detection (*Bio-Rad, USA*), a względna analiza ekspresji genów została wykonana metodą delta-delta Ct. Algorytmy geNorm, NormFinder oraz BestKeeper umożliwiły właściwy wybór najstabilniejszego genu referencyjnego, jakim był *Hprt* z wykluczeniem *Actb* i *Gapdh*.

## **9. Badanie poziomu PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ i ADIPOQ testem ELISA**

Proces izolacji białka opierał się na sonikacji oraz lizie komórek nerwowych w buforze RIPA (*Sigma-Aldrich, USA*) z dodatkiem inhibitora proteaz (*Sigma-Aldrich, USA*). Po odwirowaniu pobrano supernatant oraz oznaczono stężenie białka metodą Bradforda z wykorzystaniem albuminy surowicy bydlęcej (*Thermo Fisher Scientific, USA*) jako standardu. Poziom PPAR $\gamma$ ,

PGC1 $\alpha$  i ADIPOQ oceniano przy pomocy komercyjnie dostępnych testów ELISA (*Shanghai Sunred Biological Technology Co., Chiny*) zgodnie z instrukcjami producenta. Obecne w próbie białka wiązały się z przeciwciałami obecnymi w studzienkach, a kolejne etapy reakcji obejmowały dodanie biotynylowanego przeciwciała skierowanego na dane białko, koniugatu streptawidyna-HRP oraz roztworu substratu. Po przekształceniu substratu w barwny produkt nastąpiło zatrzymanie reakcji i pomiar absorbancji przy użyciu czytnika mikropłytek Infinite M200pro i długości fali 450 nm.

## **10. Analiza poziomu PPAR $\gamma$ i HIF1 $\alpha$ z użyciem metody western blot**

Próbki przygotowane w buforze obciążającym (*Bio-Rad, USA*) zostały poddane denaturacji w temperaturze 95°C przez 5 minut. W wyniku elektroforezy białka uległy rozdzielaniu na podstawie masy cząsteczkowej, a następnie zostały przeniesione z żelu na membranę PVDF (*Merck Millipore, USA*) przy pomocy aparatu Bio-Rad Mini-Protean II (*Bio-Rad, USA*). Aby zapobiec nieswoistemu wiązaniu przeciwciał do powierzchni, membrany blokowano w roztworze 5% mleka i 0,2% Tween-20 (*Sigma-Aldrich, USA*) w 0,02 M TBS (*Bio-Rad, USA*) przez 2 godziny. Kolejnym etapem była nocna inkubacja membran z przeciwciałami I-rzędowymi skierowanymi odpowiednio na PPAR $\gamma$  (rozcieńczenie 1:100; *Santa Cruz Biotechnology, USA*), HIF1 $\alpha$  (rozcieńczenie 1:100; *Cell Signaling Technology, USA*) i  $\beta$ -aktynę (białko referencyjne; rozcieńczenie 1:3500; *Santa Cruz Biotechnology, USA*) w 4°C. Następnego dnia membrany były płukane w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych przeciwciał, a potem inkubowane przez 1 godzinę z koniugatami (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) przeciwciała II-rzędowego i HRP (peroksydaza chrzanowa) pozwalającymi na wykrycie wiązania przeciwciała I-rzędowego z badanym białkiem. Sygnał świecenia został zwizualizowany z wykorzystaniem chemiluminescencji przy użyciu substratu dla HRP (*Roche, Szwajcaria*) i aparatu Luminescent Image Analyzer Fuji-Las 4000 (*Fuji, Japonia*), a intensywność sygnału zanalizowano w programie MultiGauge V3.0.

## **11. Barwienie immunofluorescencyjne PPAR $\gamma$ i MAP2**

Komórki nerwowe zostały utrwalone 4% roztworem paraformaldehydu w PBS (*Thermo Fisher Scientific, USA*), a następnie blokowane w buforze zawierającym surowicę zwierzęcą (*Sigma-Aldrich, USA*) i Triton X-100 (*Sigma-Aldrich, USA*). Później komórki były inkubowane całą noc w 4°C z przeciwciałami I-rzędowymi (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) skierowanymi

na PPAR $\gamma$  i MAP2. Kolejnego dnia zastosowano kilkukrotne płukanie w PBS (*Biomed Lublin, Polska*) oraz 4-godzinną inkubację z przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi z fluorochromami (Alexa Fluor Plus 488 i 647; *Thermo Fisher Scientific, USA*). Wykonanie preparatów opierało się na przepłukaniu komórek, a następnie przeniesieniu znajdujących się na dnie dołków hodowlanych szkiełek z komórkami na szkiełka podstawowe i zamknięciu preparatu przy pomocy glicerożelatyny (*Sigma-Aldrich, USA*). Po barwieniu immunofluorescencyjnym zwizualizowano PPAR $\gamma$  i MAP2 przy pomocy mikroskopii konfokalnej (Leica TCS SP8 WLL; *Leica Microsystems, Niemcy*). Aby określić ilościowo sygnał immunofluorescencyjny odpowiadający poziomowi ekspresji PPAR $\gamma$ , zmierzono intensywność pikseli z użyciem programu ImageJ wersja 1.52a.

## **12. Pomiar poziomu enzymów odpowiedzialnych za modyfikacje epigenetyczne**

### ***Poziom deacetylaz histonowych (HDAC)***

Komercyjnie dostępny zestaw do oznaczania poziomu HDAC (Histone Deacetylase Assay Kit; *Sigma-Aldrich, USA*) opierał się na dwuetapowej reakcji enzymatycznej, która polegała na:  
**i.** deacetylacji bocznego łańcucha acetylowanej lizyny przez próbkę zawierającą HDAC,  
**ii.** rozszczepieniu zdeacetylowanego substratu i uwolnieniu grupy fluorescencyjnej, która emituje sygnał proporcjonalny do poziomu HDAC. Poziom fluorescencji został zmierzony przy długościach fal  $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$  przy pomocy czytnika mikropłytek Infinite M200pro, Tecan. Zestaw zawierał kontrolę pozytywną, czyli lizat z komórek HeLa oraz kontrolę negatywną - trichostatyna A.

### ***Poziom sirtuin***

Zestaw Sirtuin Activity Assay Kit (*Sigma-Aldrich, USA*) został wykorzystany do oznaczenia poziomu sirtuin, które poprzez swoją obecność w próbce, mają zdolność do deacetylacji dodanego substratu zawierającego acetylowany p53-AFC. Dodanie w końcowym etapie roztworu wywoływacza spowodowało rozszczepienie zdeacetylowanego p53-AFC i uwolnienie grupy fluorescencyjnej. Poziom sygnału fluorescencyjnego został zmierzony fluorymetrycznie przy długościach fal  $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 505 \text{ nm}$  za pomocą czytnika mikropłytek Infinite M200pro. Ze względu na fakt, że substrat p53-AFC mógł zostać

zdeacetylowany przez inne grupy HDAC, grupę kontrolną stanowiły próbki potraktowane trichostatyną A, która hamowała aktywność deacetylaz innych, niż sirtuiny.

### ***Poziom acetylaz histonowych (HAT)***

Poziom HAT zmierzono dzięki wykorzystaniu HAT Activity Fluorometric Assay Kit (*Sigma-Aldrich, USA*) zgodnie z protokołem producenta. Użyty do reakcji reagent zawierał acetylokoenzym A oraz peptyd histonowy H3, a w wyniku obecności HAT w próbce doszło do powstania dwóch produktów - acetylowanego peptydu oraz CoA-SH. Dodanie w końcowym etapie reagentu niezbędnego do wywołania określonej odpowiedzi, skutkowało przekształceniem CoA-SH w produkt fluorescencyjny, którego poziom został zmierzony przy długościach fal  $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$ . W zestawie uwzględniono ekstrakt z białek jądrowych komórek HeLa.

## **PODSUMOWANIE WYKORZYSTANYCH METOD BADAWCZYCH ORAZ BADANYCH PARAMETRÓW I PROCESÓW**

<i>Metoda badawcza</i>	<i>Badane parametry i procesy</i>
Ocena poziomu LDH	Śmierć komórek, procesy nekrotyczne, cytotoksyczność
Pomiar komórkowego poziomu ROS	Stres oksydacyjny
Ocena poziomu 8-OHdG	Oksydacyjne uszkodzenia DNA/RNA
Degradacja mRNA przy użyciu specyficznego siRNA	Wyciszenie ekspresji genu <i>Pparg</i>
qPCR	Ekspresja genów: <i>Hif1a</i> , <i>Pparg</i> , <i>Pgc1a</i> , <i>Adipoq</i>
ELISA	Poziom białek: PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ i ADIPOQ
Western blot	Poziom białek: HIF1 $\alpha$ i PPAR $\gamma$
Barwienia immunofluorescencyjne i mikroskopia konfokalna	Lokalizacja/rozmieszczenie białek w komórce: PPAR $\gamma$ i MAP2
Analizy epigenetyczne	Poziom HDAC, sirtuin i HAT

## UZASADNIENIE BADAŃ

Mimo że ekspresja PPAR $\gamma$  w mózgu w warunkach fizjologicznych jest niska, w niektórych warunkach patologicznych, takich jak niedotlenienie czy niedokrwienie mózgu, zauważono dysregulację poziomu ekspresji tego receptora. Badania potwierdziły, że myszy ze specyficznym dla neuronów nokautem genu *Pparg* doświadczyły znacznie większych uszkodzeń mózgu i stresu oksydacyjnego w odpowiedzi na udar niedokrwienno wywołany MCAO niż myszy kontrolne, a neuroprotektoryjne działanie agonistów PPAR $\gamma$  zostało wówczas utracone. Zmiany te sugerują, że dysfunkcja PPAR $\gamma$  w neuronach może zwiększać ryzyko wystąpienia epizodów hipoksyjno-ischemicznych mózgu i nasilać ich przebieg. Postulujemy, że modulacja aktywności PPAR $\gamma$  poprzez zastosowanie substancji z grupy SPPAR $\gamma$ M może stanowić oryginalne i bezpieczne podejście terapeutyczne w leczeniu niedotlenienia okołoporodowego oraz udaru niedokrwienno mózgu. Pomimo przesłanek wskazujących na skuteczność amorfrutyny B w leczeniu chorób metabolicznych poprzez selektywną aktywację ekspresji genów kontrolowanych przez PPAR $\gamma$ , jeszcze do niedawna nie było wiadomo, czy amorfrutyna B posiada właściwości neuroprotektoryjne i antyoksydacyjne, zwłaszcza w odniesieniu do modeli udarów mózgu. Obecnie brakuje danych na temat roli szlaku sygnałowego zależnego od receptora PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$ /ADIPOQ) w oddziaływaniu amorfrutyny B na komórki nerwowe narażone na hipoksję/ischemię. W ostatnich latach badania kliniczne skupiają się na farmaceutykach, które wpływają na procesy epigenetyczne i umożliwiają regulację ekspresji genów zaangażowanych w patogenezę chorób neurodegeneracyjnych. Z tego względu w obecnej rozprawie podjęto próbę ustalenia, czy amorfrutyna B posiada właściwości, które umożliwiają normalizację statusu epigenetycznego neuronów poddanych hipoksji oraz ischemii. Ustalenie wpływu amorfrutyny B na profil epigenetyczny komórek nerwowych stwarza szansę na pełniejsze zrozumienie mechanizmów działania tej substancji i wykorzystania jej w przyszłości do projektowania bardziej spersonalizowanej terapii.

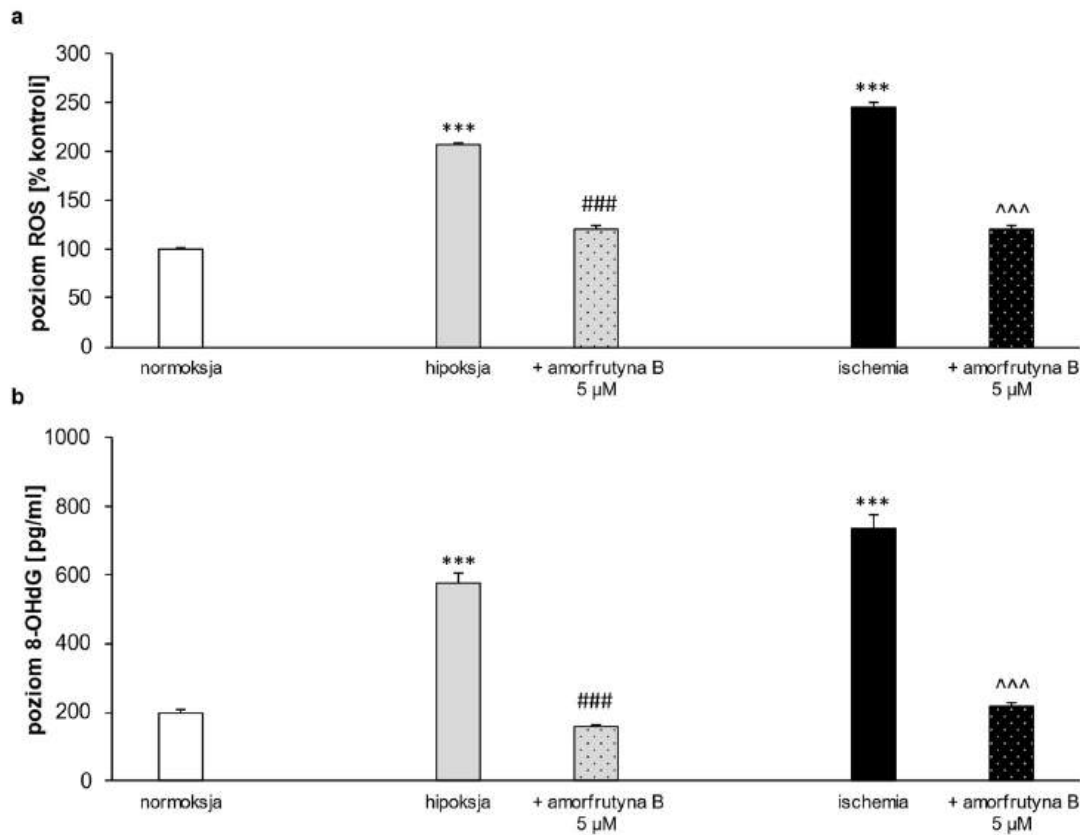
## WYNIKI BADAŃ WŁĄCZONYCH DO OPISOWEJ CZĘŚCI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Do moich badań posłużyły modele, w których 6-godzinne niedotlenienie (model hipoksji) lub niedotlenienie z deficytami glukozy (model ischemii) oraz 18-godzinna reoksygenacja/przywrócenie dostępu do glukozy nasilały śmierć i degenerację neuronów. Przejawiało się to neurotoksyczością (podwyższenie poziomu LDH), zwiększonym poziomem degenerujących neuronów (podwyższenie poziomu parametru Fluoro-Jade C) oraz zmniejszeniem żywotności i aktywności metabolicznej komórek (obniżenie poziomu parametru MTT). Amorfrutyna B w stężeniu 1 i 5  $\mu\text{M}$  została podana po 6 godzinach od rozpoczęcia hipoksji oraz ischemii i wywołała ochronny wpływ na neurony, częściowo odwracając wszystkie opisane wyżej następstwa uszkodzenia komórek nerwowych. Warto zaznaczyć, że najlepsze efekty neuroprotektoryjne wywołała amorfrutyna B w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  i to właśnie to stężenie zostało wykorzystane w większości późniejszych badań na pierwotnych kulturach komórek nerwowych. Ponadto, badanie stężeniezależności wykazało, że amorfrutyna B (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , i 5  $\mu\text{M}$ ) nie wywoływała neurotoksycznych efektów w warunkach kontrolnych z wyjątkiem stężenia 10  $\mu\text{M}$  (Wnuk, Przepiórska i wsp., 2021).

### 1. Ocena wpływu amorfrutyny B na wywołany hipoksją oraz ischemią stres oksydacyjny w neuronach

W moich badaniach dowiodłam, że uszkodzenia komórek w odpowiedzi na hipoksję oraz ischemię wynikały z nasilonego stresu oksydacyjnego, co zostało potwierdzone podwyższonym poziomem ROS (Ryc. 1a) oraz nasileniem oksydacyjnego uszkodzenia DNA/RNA mierzonego wzrostem poziomu 8-OHdG (Ryc. 1b). Zarówno hipoksja, jak i ischemia stymulowały wzrost poziomu ROS, odpowiednio, do 207 oraz 245% w stosunku do warunków kontrolnych, a podanie amorfrutyny B spowodowało obniżenie badanego parametru do 122% w obydwu modelach. Pod wpływem hipoksji oraz ischemii doszło również do wzrostu ilości 8-OHdG z 200 pg/ml w warunkach kontrolnych do, odpowiednio, 577 pg/ml i 736 pg/ml w badanych modelach. Amorfutyna B normalizowała te zmiany, ponieważ obniżała ilość 8-OHdG do 159 pg/ml w hipoksji oraz 219 pg/ml w ischemii. Zatem, zastosowanie amorfrutyny B w paradygmacie pourazowym *post-treatment* tj. 6 godzin po wywołaniu uszkodzenia komórek, skutkowało hamowaniem stresu oksydacyjnego i

częściowym przywróceniu poziomów badanych parametrów do stanu obserwowanego w warunkach normoksyjnych.



**Ryc. 1** Amorfrutyna B hamowała stres oksydacyjny w komórkach nerwowych narażonych na hipoksję oraz ischemię. Zarówno w modelu hipoksyjnym, jak i ischemicznym zaobserwowano wzrost poziomu ROS (a) oraz 8-OHdG (b), a amorfrutyna B w obydwu przypadkach zredukowała poziom badanych markerów. Dane przedstawiono jako procent kontroli  $\pm$  SEM (dla parametru ROS) i średnią  $\pm$  SEM (dla parametru 8-OHdG). Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty, składające się z 10-12 powtórzeń biologicznych. Różnice istotne statystycznie przedstawiono jako: \*\*\*  $p < 0,001$  w porównaniu z grupą kontrolną, ###  $p < 0,001$  w porównaniu z grupą narażoną na hipoksję, ^^  $p < 0,001$  w porównaniu z komórkami poddanymi ischemii.

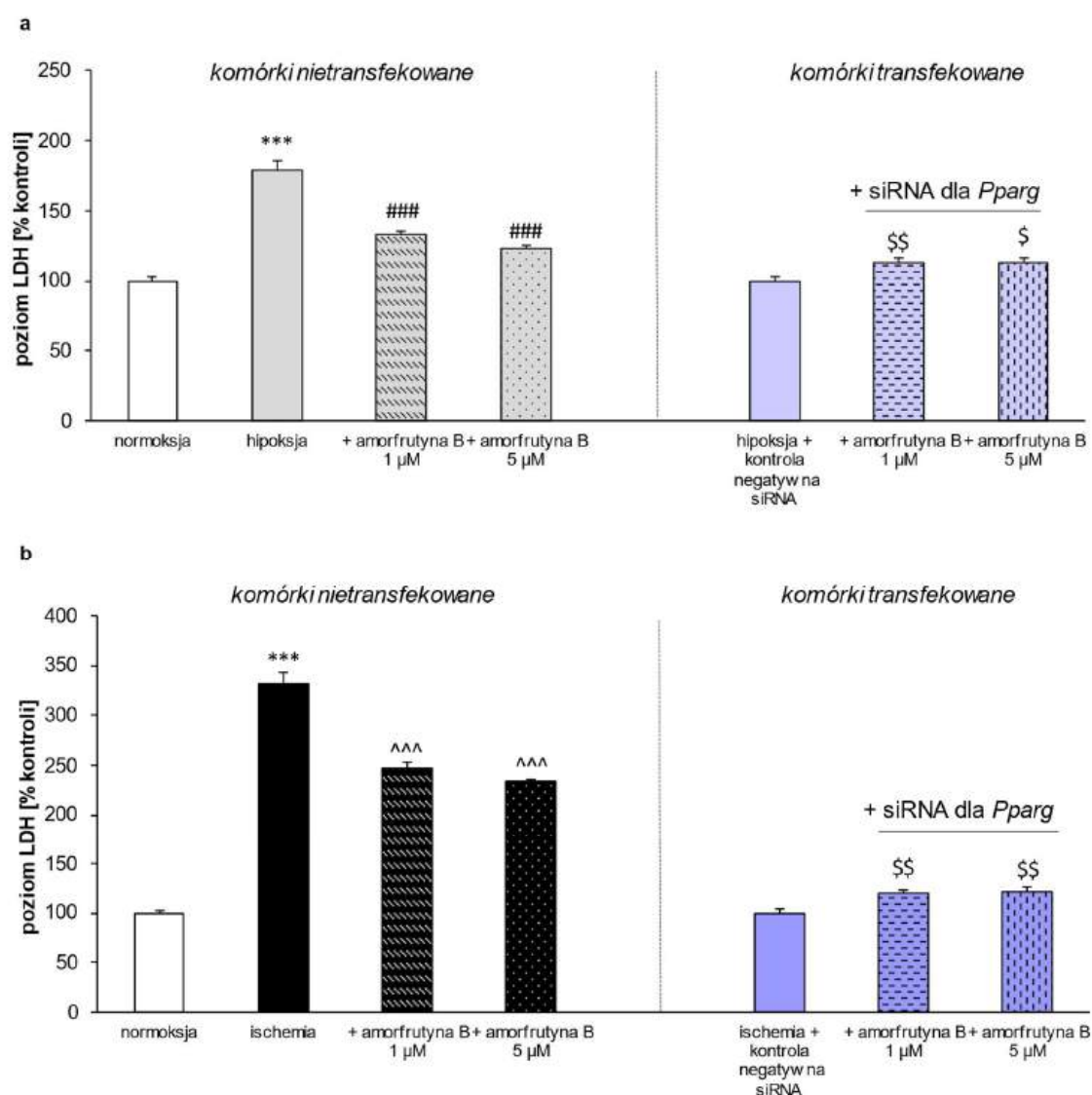
## 2. Weryfikacja zaangażowania receptora PPAR $\gamma$ w neuroprotektoryjne efekty działania amorfrutyny B w komórkach nerwowych poddanych hipoksji oraz ischemii

W celu weryfikacji zaangażowania receptora PPAR $\gamma$  w mechanizm działania amorfrutyny B w hipoksji i ischemii, zastosowano transfekcję komórek nerwowych przy użyciu specyficznego siRNA wyciszającego ekspresję genu *Pparg* przez degradację docelowego dla niego mRNA.

Skuteczność wyciszenia mRNA zweryfikowano z użyciem qPCR we wcześniej przeprowadzonych analizach naszego zespołu badawczego (m.in. Wnuk i wsp., 2018). Wykazano, że zastosowanie siRNA zmniejszyło poziom ekspresji *Pparg* o 69%, co potwierdziło efektywność degradacji docelowego mRNA. Rycina 2 przedstawia efekt działania amorfrutyny B na komórki poddane hipoksji i ischemii oraz na komórki transfekowane siRNA specyficznym dla *Pparg*, które również były poddane hipoksji i ischemii. W komórkach transfekowanych układem kontrolnym była kontrola negatywna, czyli siRNA, które nie degraduje żadnego znanego mRNA. Stosowanie kontroli negatywnej pozwalało upewnić się, że zaobserwowane efekty wynikają ze specyficznego działania siRNA na docelowy gen, a nie z niespecyficznego efektu wynikającego z samego procesu transfekcji. W moich badaniach amorfrutyna B (1 i 5  $\mu$ M) zmniejszała poziom LDH w warunkach hipoksyjnych z 179% do, odpowiednio, 133 i 123% (Ryc. 2a). Z kolei w warunkach ischemicznych amorfrutyna B obniżała poziom LDH z 333% do, odpowiednio, 246 i 234% (Ryc. 2b), dowodząc swojego neuroprotekcijnego potencjału. Następnie wykazałam, że wyciszenie *Pparg* skutkowało osłabieniem działania amorfrutyny B (1 i 5  $\mu$ M) w neuronach kory mózgowej, ponieważ zarówno w warunkach hipoksyjnych, jak i ischemicznych doszło do zwiększenia poziomu LDH w granicach 113 – 121% w porównaniu do kontroli negatywnej. Potwierdziło to zniesienie neuroprotekcijnego działania substancji, a tym samym udowodniło fundamentalną rolę receptora PPAR $\gamma$  w mechanizmie działania amorfrutyny B służącym ochronie komórek nerwowych przed uszkodzeniem hipoksyjno-ischemicznym.

Ryciny 2a i 2b powstały w oparciu o dodatkowe wyniki, które nie zostały zawarte w publikacji **Wnuk, Przepiórska i wsp. 2021**. Dodatkowe wyniki dotyczą nietransfekowanych komórek nerwowych, które stanowią niezbędny układ odniesienia dla komórek poddanych transfekcji siRNA.

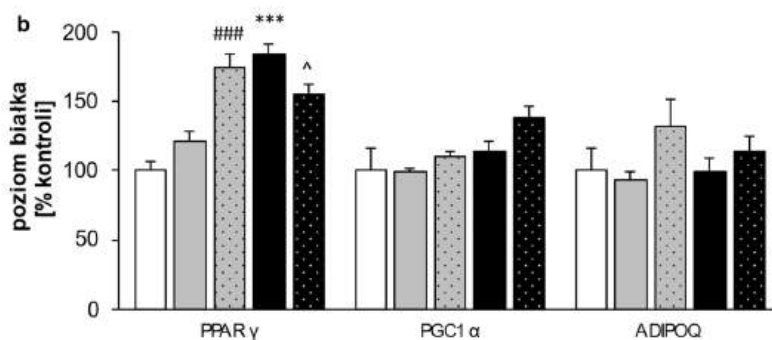
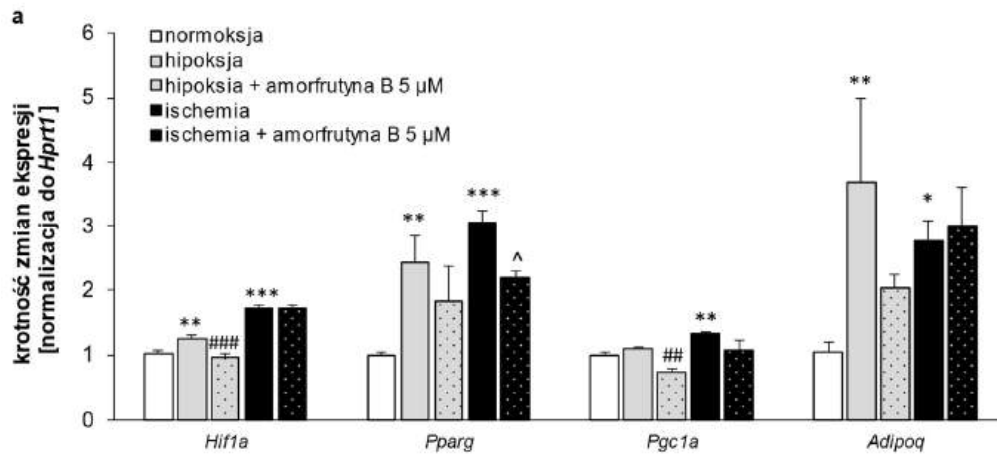




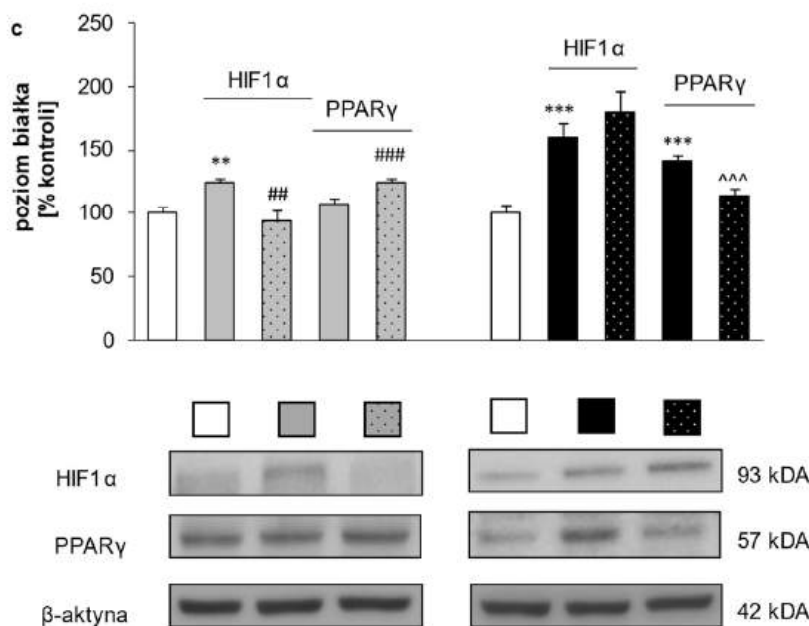
**Ryc. 2** W neuronach transfekowanych siRNA specyficznym dla Pparg, amorfrutyna B (1 i 5 μM) utraciła neuroprotekcynny potencjał, co manifestowało się zwiększonym poziomem uwalniania LDH, zarówno w modelach hipoksji (a), jak i ischemii (b). Komórki transfekowano 50 nM siRNA w pożywce bez antybiotyków zawierającej INTERFERin przez 7 godzin. Kolejnego dnia komórki poddano działaniu hipoksji lub ischemii, a następnie traktowano je amorfrutyną B. Wyniki dotyczące komórek transfekowanych z użyciem siRNA dla Pparg normalizowano do wyników z komórek transfekowanych z użyciem siRNA, które nie degraduje żadnego znanego mRNA, czyli stanowiących kontrolę negatywną. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty, składające się z 5-8 powtórzeń biologicznych. Różnice istotne statystycznie przedstawiono jako: \*\*\* $p < 0,001$  w porównaniu z grupą kontrolną, ### $p < 0,001$  w porównaniu z komórkami narażonymi na hipoksję, ^^ $p < 0,001$  w porównaniu z komórkami narażonymi na ischemię, \$ $p < 0,05$  i \$\$ $p < 0,01$  w porównaniu z komórkami narażonymi na hipoksję lub ischemię z uwzględnieniem kontroli negatywnej.

### **3. Badanie wpływu amorfrutyny B na poziom ekspresji mRNA i białek *Hif1a*/HIF1 $\alpha$ , *Pparg*/PPAR $\gamma$ , *Pgc1a*/PGC1 $\alpha$ i *Adipoq*/ADIPOQ w modelach hipoksji oraz ischemii**

W kolejnej części badań, zaangażowanie HIF1 $\alpha$  oraz szlaku sygnałowego zależnego od PPAR $\gamma$  w działanie amorfrutyny B w neuronach kory mózgowej narażonych na hipoksję/ischemię zostało zweryfikowane na poziomie ekspresji mRNA (Ryc. 3a) i białek (Ryc. 3b i 3c). W przypadku hipoksji oraz ischemii analiza qPCR wykazała odpowiednio 1,26-krotny oraz 1,72-krotny wzrost ekspresji *Hif1a*. Natomiast analiza western blot ujawniła wzrost poziomu HIF1 $\alpha$  w odpowiedzi na hipoksję oraz ischemię do, odpowiednio, 124% oraz 160% w porównaniu do warunków kontrolnych. Oznacza to, że wykazano wzrost *Hif1a*/HIF1 $\alpha$  w odpowiedzi na hipoksję oraz ischemię, co świadczy o niedoborze tlenu w komórkach nerwowych i uruchomieniu odpowiedzi komórkowej na niedotlenienie. Podanie amorfrutyny B po 6 godzinach od zainicjowania uszkodzenia wywołało 0,97-krotne obniżenie ekspresji *Hif1a* oraz obniżenie poziomu HIF1 $\alpha$  do 94% w modelu hipoksyjnym, bez istotnych statystycznie zmian w modelu ischemicznym. Ponadto, hipoksja oraz ischemia wywołały odpowiednio 2,43-krotny i 3,06-krotny wzrost ekspresji *Pparg*, co było skorelowane z poziomem białka PPAR $\gamma$  w ischemii, ale nie w hipoksji. W przypadku testu ELISA zaobserwowano w ischemii wzrost poziomu PPAR $\gamma$  do 184%, a w przypadku analizy western blot wzrost ten wynosił 142% w porównaniu do warunków kontrolnych. Zmianom wywołanym pod wpływem amorfrutyny B towarzyszyła 2,20-krotnie obniżona ekspresja genu *Pparg* w ischemii. Ponadto, amorfrutyna B podwyższała poziom białka PPAR $\gamma$  w modelu hipoksji (wzrost do 175% w teście ELISA i 124% w analizie western blot), zaś obniżała go w modelu ischemii (spadek do 155% w teście ELISA i 114% w analizie western blot). Badanie ekspresji koaktywatora PPAR $\gamma$ , jakim jest PGC1 $\alpha$ , oraz czynników aktywowanych przez PPAR $\gamma$ , takich jak ADIPOQ wykazało zmiany na poziomie ekspresji genów, podczas gdy poziom białek nie ulegał zmianie. Hipoksja wywołała 3,68-krotny wzrost ekspresji *Adipoq*, natomiast ischemia powodowała 1,32-krotny wzrost ekspresji *Pgc1a* oraz 2,76-krotny wzrost ekspresji *Adipoq*. Działanie amorfrutyny B było zauważalne jedynie dzięki 0,72-krotnemu obniżeniu ekspresji *Pgc1a* w hipoksji. Wyniki te wskazują na zaangażowanie HIF1 $\alpha$  oraz szlaku sygnałowego PPAR $\gamma$  w wywołane hipoksją/ischemią uszkodzenie neuronów, przy czym ochronne działanie amorfrutyny B może wiązać się przede wszystkim z obniżeniem poziomu HIF1 $\alpha$  w hipoksji oraz regulacją poziomu PPAR $\gamma$  w zależności od modelu uszkodzenia.



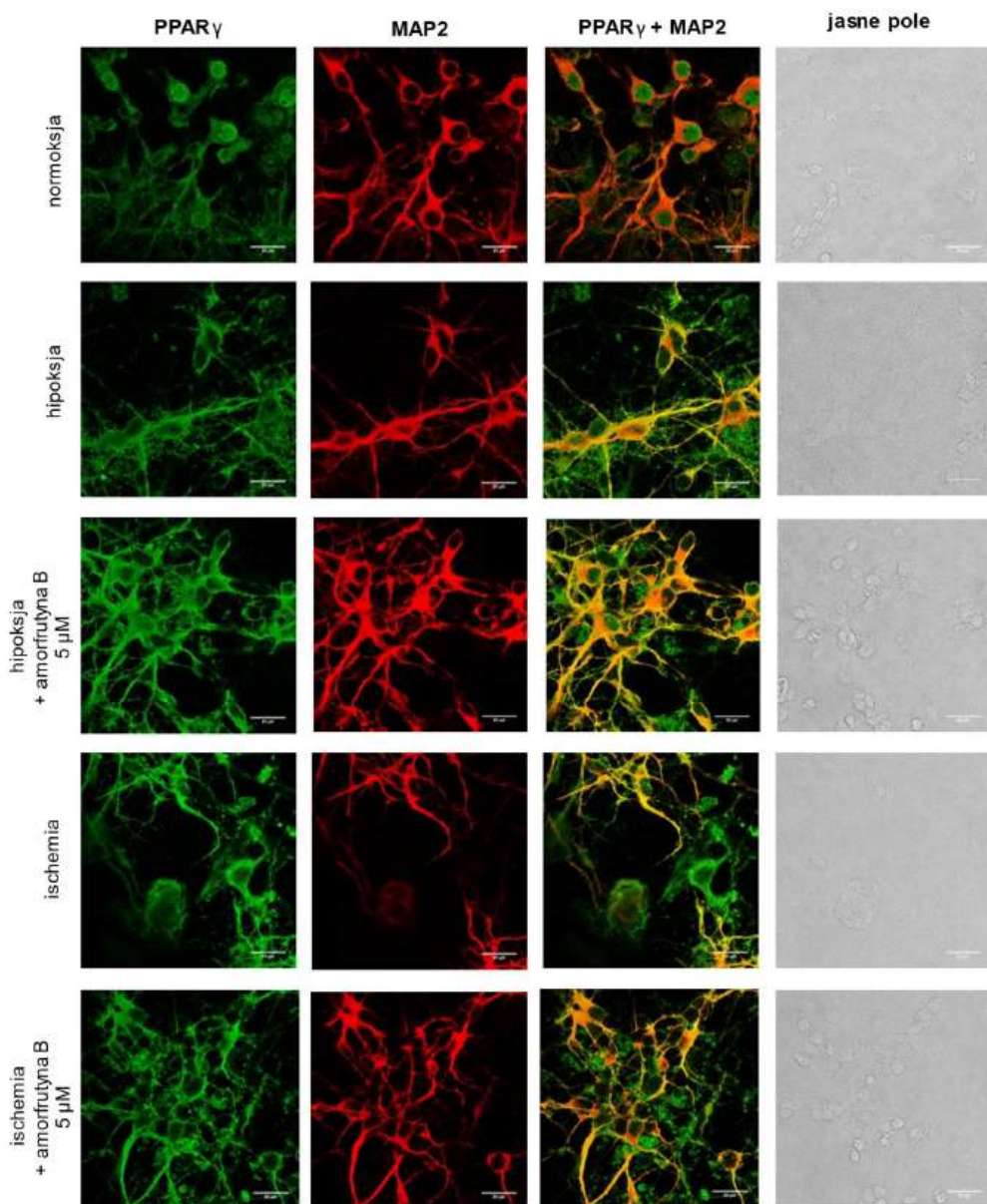
pg/ $\mu$ g białka	PPAR $\gamma$	PGC1 $\alpha$	ADIPOQ
normoksja	0,0095 $\pm$ 0,0015	0,0020 $\pm$ 0,0007	2,29 $\pm$ 0,81
hipoksja	0,0115 $\pm$ 0,0016	0,0025 $\pm$ 0,012	2,14 $\pm$ 0,29
hipoksja + amorfrutyna B 5 $\mu$ M	0,0166 $\pm$ 0,0020	0,0022 $\pm$ 0,0002	3,91 $\pm$ 2,09
ischemia	0,0175 $\pm$ 0,0016	0,0022 $\pm$ 0,0003	2,27 $\pm$ 0,49
ischemia + amorfrutyna B 5 $\mu$ M	0,0147 $\pm$ 0,0015	0,0027 $\pm$ 0,0004	2,61 $\pm$ 0,64



**Ryc. 3** Zmiany w poziomach ekspresji mRNA i białek Hif1a/HIF1 $\alpha$ , Pparg/PPAR $\gamma$ , Pgc1a/PGC1 $\alpha$  i Adipoq/ADIPOQ w odpowiedzi na hipoksję lub ischemię i leczenie amorfrutyną B w hodowlach komórek nerwowych, zbadane z zastosowaniem metody qPCR (a) oraz testów ELISA (b) i western blot (c). Wyniki przedstawiono jako krotność zmian ekspresji (qPCR) i procent kontroli (ELISA i western blot)  $\pm$  SEM. Wykonano 6 powtórzeń biologicznych, składających się z 3 powtórzeń technicznych. Różnice istotne statystycznie przedstawiono jako: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  i \*\*\* $p < 0,001$  w porównaniu z grupą kontrolną, ### $p < 0,01$ , #### $p < 0,001$  w porównaniu z kulturami narażonymi na hipoksję, ^ $p < 0,05$ , ^^ $p < 0,001$  w porównaniu z kulturami narażonymi na ischemię.

#### **4. Barwienie immunofluorescencyjne i ocena stopnia uszkodzenia komórek nerwowych oraz poziomu i rozmieszczenia receptora PPAR $\gamma$ w komórkach w odpowiedzi na hipoksję/ischemię oraz amorfrutynę B**

Barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciała MAP2 oraz mikroskopia konfokalna zostały wykorzystane w celu wizualizacji neuronów (Ryc. 4). W porównaniu z grupą normoksyjną, zaobserwowano indukowane hipoksją czy ischemią uszkodzenie i zahamowanie wzrostu neurytów, podczas gdy morfologia komórek nerwowych poddanych działaniu amorfrutyny B była zbliżona do morfologii neuronów z grupy kontrolnej. Analiza immunofluorescencyjna potwierdziła neuronalną lokalizację receptora PPAR $\gamma$ , a kwantyfikacja intensywności fluorescencji z użyciem programu ImageJ wykazała zmiany w poziomie PPAR $\gamma$  w komórkach, w zależności od modelu eksperymentalnego. Z moich badań wynika, że hipoksja nie wpłynęła na intensywność fluorescencji PPAR $\gamma$ , natomiast podanie amorfrutyny B po 6 godzinach od zainicjowania uszkodzenia skutkowało wzrostem poziomu tego receptora w komórkach, ponieważ intensywność fluorescencji PPAR $\gamma$  wzrosła do poziomu 126%. Z kolei w warunkach ischemicznych poziom PPAR $\gamma$  wzrósł do poziomu 153%, a amorfrutyna B przywróciła go do wartości zbliżonej do poziomu kontrolnego, wynosząc odpowiednio 91%. Co interesujące, w warunkach normoksyjnych PPAR $\gamma$  był przede wszystkim zlokalizowany w jądrze komórkowym. Natomiast pod wpływem hipoksji oraz ischemii przeważało położenie receptora PPAR $\gamma$  poza jądrem komórkowym, co może mieć związek ze zmianami stężenia jonów wapnia w obrębie neuronów.

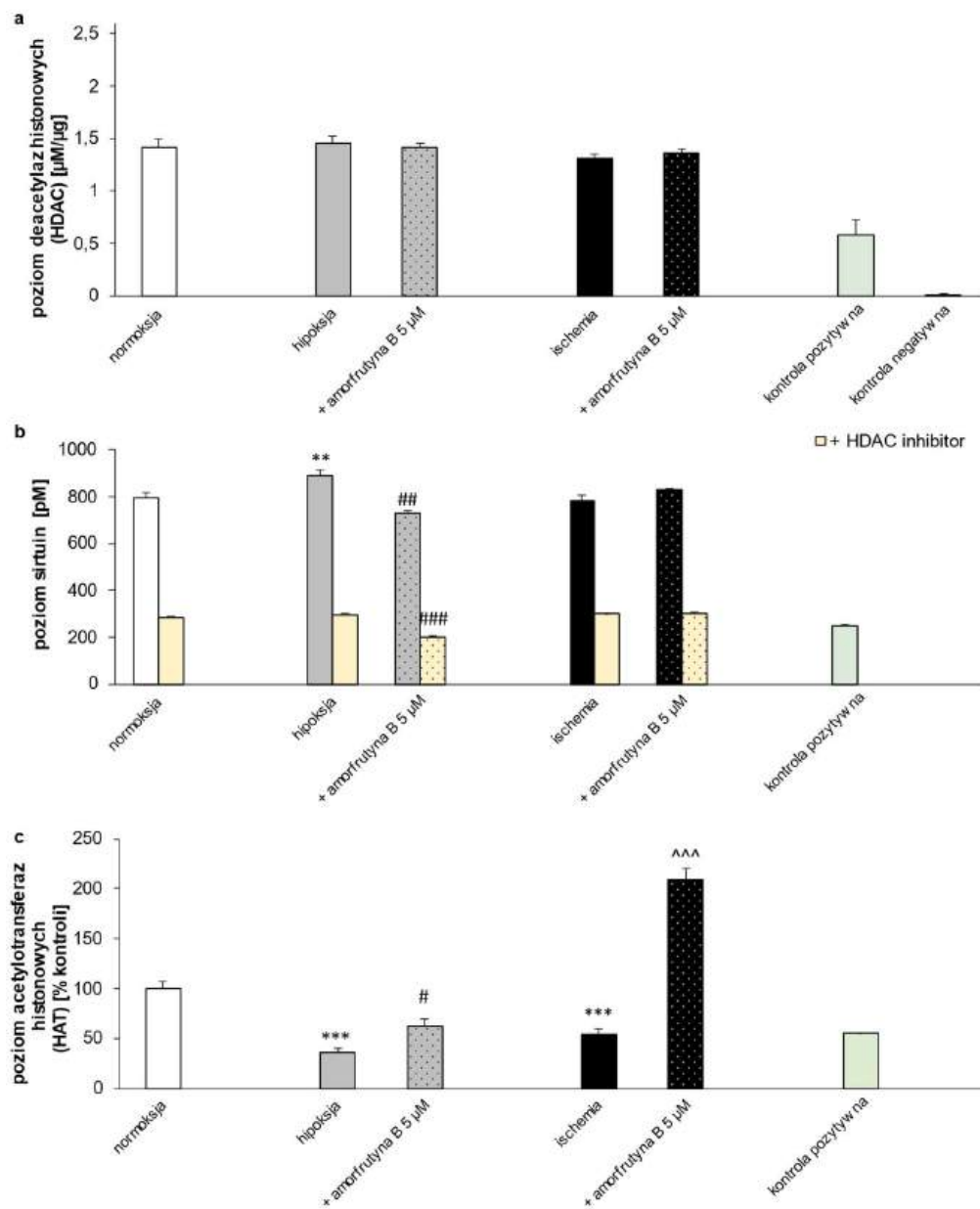


% kontroli ± SEM	normoksja	hipoksja	hipoksja + amorfrutyna B	ischemia	ischemia + amorfrutyna B
PPAR $\gamma$	100 ± 7,372	97,008 ± 5,388	125,517 ± 3,973 <sup>#</sup>	152,702 ± 9,341 <sup>***</sup>	91,158 ± 3,204 <sup>***</sup>

**Ryc. 4** Wpływ hipoksji lub ischemii oraz amorfrutyny B na poziom ekspresji weryfikowany barwieniem immunofluorescencyjnym specyficznym dla PPAR $\gamma$  (kolor zielony) w neuronach znakowanych MAP2 (kolor czerwony). Tabela przedstawia średnią intensywność pikseli dla obszaru zainteresowania (ROI). Wyniki przedstawiono jako procent kontroli ± SEM. Liczba powtórzeń w każdej grupie wynosiła 5. Różnice istotne statystycznie przedstawiono jako: <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$  w porównaniu z grupą kontrolną, <sup>#</sup> $p < 0,05$  w porównaniu z kulturami narażonymi na hipoksję, <sup>^^</sup> $p < 0,001$  w porównaniu z kulturami narażonymi na ischemię. Skala wynosi 20  $\mu\text{m}$ .

## **5. Badanie wpływu amorfrutyny B na status epigenetyczny komórek nerwowych poddanych hipoksji oraz ischemii: analiza poziomu HDAC, sirtuin oraz HAT**

W prezentowanych wynikach wpływ amorfrutyny B na komórki nerwowe poddane hipoksji oraz ischemii został oceniony w kontekście zmian epigenetycznych odpowiedzialnych za regulację ekspresji poszczególnych genów bez modyfikacji sekwencji DNA. Poddanie komórek nerwowych hipoksji i ischemii oraz ekspozycja komórek na działanie amorfrutyny B nie przyczyniło się do zmian w poziomie HDAC (Ryc. 5a), natomiast wpłynęło na poziom sirtuin (Ryc. 5b) oraz HAT (Ryc. 5c) w badanych warunkach eksperymentalnych. Moje badania udowodniły, że hipoksja zwiększała poziom sirtuin z 796 pM w warunkach kontrolnych do 893 pM. Amorfrutyna B z kolei odwracała te zmiany, obniżając poziom sirtuin do 727 pM. Poziom sirtuin nie ulegał zmianie pod wpływem hipoksji i dodatku trichostatyny A, która hamuje aktywność deacetylaz innych niż sirtuiny. Podanie amorfrutyny B we wspomnianej grupie eksperymentalnej spowodowało obniżenie poziomu sirtuin z wartości 293 pM do wartości 203 pM osiąganey po podaniu substancji. W ischemii nie obserwowano zmian w poziomie sirtuin, niezależnie od podania amorfrutyny B. Dalsze analizy wykazały, że poziom HAT był zredukowany w warunkach hipoksji do poziomu 35%, a w warunkach ischemii do poziomu 54% w stosunku do warunków kontrolnych. Zmianom tym przeciwdziałała amorfrutyna B, zwiększając poziom tego enzymu do 62% w hipoksji oraz 209% w ischemii. Badania te potwierdzają, że utrata homeostazy między procesami acetylacji i deacetylacji histonów w neuronach jest cechą charakterystyczną dla chorób neurodegeneracyjnych i uszkodzeń neuronów wywołanych hipoksją oraz ischemią. Normalizacja poziomu enzymów epigenetycznych przez amorfrutynę B może być kluczowym mechanizmem w zatrzymaniu lub spowolnieniu procesów neurodegeneracyjnych.



**Ryc. 5** Poddanie neuronów hipoksji i ischemii oraz ekspozycja komórek na działanie amorfrutyny B nie przyczyniło się do zmian w poziomie HDAC (a), ale miało znaczący wpływ na poziom sirtuin (b) oraz HAT (c). Kontrola pozytywna dla HDAC zawierała lizat komórek HeLa i ekstrakt jądrowy HeLa dla HAT. Kontrola negatywna dla HDAC zawierała trichostatynę A, która hamowała aktywność deacetylaz innych niż sirtuiny. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SEM (poziom HDAC i sirtuin) lub jako procent kontroli ± SEM (poziom HAT). Przeprowadzono 6 powtórzeń biologicznych, składających się z 3 powtórzeń technicznych. Różnice istotne statystycznie przedstawiono jako: \*\* $p < 0,01$  oraz \*\*\* $p < 0,001$  w porównaniu z grupą kontrolną, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  w porównaniu z komórkami poddanymi hipoksji, ^^^ $p < 0,001$  w porównaniu z komórkami poddanymi ischemii.

## 6. Podsumowanie uzyskanych wyników

Podsumowując, przedstawione powyżej wyniki wykazały, że amorfrutyna B podana po 6 godzinach od zainicjowania uszkodzenia (tzw. paradygmat *post-treatment*) chroni komórki nerwowe przed hipoksją i ischemią poprzez hamowanie stresu oksydacyjnego i zależnych od wolnych rodników uszkodzeń DNA/RNA. Za kulisami neuroprotekcyjnych efektów działania amorfrutyny B stoi receptor PPAR $\gamma$ , ponieważ po wyciszeniu jego ekspresji (z użyciem specyficznego siRNA), amorfrutyna B traci swoje ochronne właściwości. Wykonane przeze mnie analizy wykazały zmianę ekspresji *Pparg*/PPAR $\gamma$  pod wpływem amorfrutyny B, a barwienie neuronów na obecność białka MAP2 potwierdziło, zarówno degenerację komórek nerwowych w następstwie hipoksji i ischemii, jak i zmniejszony stopień ich uszkodzenia w wyniku podania amorfrutyny B. Obecnie duży nacisk kładzie się na czynniki epigenetyczne w konstruowaniu przyszłych strategii terapeutycznych służących zmniejszaniu obszaru niedotlenienia i niedokrwienia. Moje badania potwierdzają, że podanie amorfrutyny B komórkom narażonym na hipoksję lub ischemię normalizuje status epigenetyczny neuronów.



## **PUBLIKACJA 1**

Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M. *Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation*. Mol Neurobiol. 2023 Feb;60(2):576-595. doi: 10.1007/s12035-022-03087-9.

**PODSUMOWANIE WYKORZYSTANYCH METOD BADAWCZYCH  
ORAZ BADANYCH PARAMETRÓW I PROCESÓW**

<i>Metoda badawcza</i>	<i>Badane parametry i procesy</i>
Ocena poziomu LDH	Śmierć komórek, procesy nekrotyczne, cytotoksyczność
Oznaczenie JC-10	Błonowy potencjał mitochondrialny
Barwienie fluorescencyjne z użyciem CYTO-ID i Hoechst 33342	Wizualizacja autofagolizosomów oraz skupisk heterochromatyny; autofagia i apoptoza
qPCR	Ekspresja genów związanych z apoptozą oraz autofagią: <i>Fas, Fasl, Bax, Bcl2, Gsk3b</i> oraz <i>Becn1, Atg5, Atg7, Map1lc3a, Map1lc3b, Nup62, Ambra1</i>
ELISA	Poziom białek związanych z apoptozą oraz autofagią: FAS, FASL, BAX, BCL2, GSK3 $\beta$ oraz ATG7, BECN1, MAP1LC3B, AMBRA1
Degradacja mRNA przy użyciu specyficznego siRNA	Wyciszenie ekspresji genów <i>Becn1</i> i <i>Atg7</i>
Analiza qPCR - MethyLight	Poziom metylacji genów związanych z apoptozą oraz autofagią: <i>Bax, Bcl2</i> oraz <i>Ambra1, Map1lc3b, Atg7, Becn1</i>
Analiza qPCR z użyciem mikromacierzy RT2 Profiler PCR Array	Ekspresja miRNA związanych z apoptozą

## UZASADNIENIE BADAŃ

Zaburzenie dopływu krwi do mózgu może prowadzić do śmierci komórek na drodze apoptozy, której towarzyszą dysfunkcja mitochondriów oraz tworzenie skupisk heterochromatyny i ciałek apoptotycznych. Innym mechanizmem zaangażowanym w patofizjologię chorób neurodegeneracyjnych jest autofagia, która w zależności od rodzaju uszkodzenia eliminuje komórki lub utrzymuje je przy życiu, nawet przy braku czynników troficznych. Podstawowa funkcja autofagii polega na usuwaniu i degradacji resztek materiału komórkowego tj. organelli komórkowych i źle połaďdowanych białek. Zbędny materiał komórkowy jest najpierw zamykany w autofagosomie, który następnie łączy się z lizosomem i tworzy autofagolizosom. Oprócz degradacji, autofagia sprzyja recyklingowi składników komórkowych. Wpływ procesu autofagii na komórki nerwowe podczas udaru niedokrwienego mózgu budzi szereg kontrowersji. Wprawdzie niektóre badania sugerują, że autofagia pełni funkcję ochronną wobec komórek nerwowych poddanych niedokrwieniu, to jednak inne doniesienia wskazują na autofagię jako proces potęgujący neurodegenerację związaną z uszkodzeniem niedokrwienym mózgu. Zatem, zbadanie molekularnych mechanizmów, za pomocą których amorfrutyna B reguluje procesy apoptozy i autofagii w trakcie uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego, może prowadzić do opracowania nowej terapii skoncentrowanej na wielu składowych patofizjologii niedotlenienia i niedokrwienia mózgu. Ścieżki sygnałowe apoptozy i autofagii mogą być regulowane za pośrednictwem miRNA poprzez potranskrypcyjną kontrolę ekspresji genów, a ostatnie badania wykazały, że wiele z tych cząsteczek jest jednocześnie biomarkerami udaru mózgu. Potencjalne zastosowanie substancji modulujących aktywność miRNA i enzymów może być obiecującym kierunkiem w projektowaniu farmakoterapii chorób neurodegeneracyjnych, co skłoniło mnie do zbadania wpływu amorfrutyny B na poziom miRNA w neuronach poddanych hipoksji oraz ischemii.

## WYNIKI BADAŃ

### 1. Walidacja modelu hipoksji i ischemii do badania procesów apoptozy i autofagii oraz działania amorfrutyny B w komórkach nerwowych

W pierwszym etapie badań scharakteryzowałam modele hipoksji oraz ischemii, które polegały, odpowiednio na deprivacji tlenu lub jednoczesnej deprivacji tlenu i glukozy w hodowlach komórek nerwowych kory mózgowej myszy *in vitro*. Adekwatność zastosowanych modeli została sprawdzona poprzez wykorzystanie specyficznych inhibitorów skierowanych na ścieżki sygnałowe apoptozy (kaspaza-8, -9, -3/6, GSK3 $\beta$ , JNK, p38 MAPK) oraz autofagii (mTOR, ULK1, ULK2, USP10, USP13). Substancje te częściowo zmniejszyły neurotoksyczność wywołaną hipoksją oraz zredukowały śmierć komórek wywołaną ischemią, co wskazuje na zaangażowanie procesów apoptozy i autofagii w uszkodzenia neuronów w badanych modelach eksperymentalnych. Ponadto wykazano, że zarówno hipoksja, jak i ischemia wywołują apoptozę poprzez obniżenie błonowego potencjału mitochondrialnego, formowanie skupisk heterochromatyny, wzrost ekspresji proapoptotycznych genów i białek, a także poprzez regulację poziomu metylacji obszarów promotorowych genów związanych z apoptozą. O zaangażowaniu autofagii w procesy hipoksji oraz ischemii świadczyło nasilone formowanie autofagolizosomów, zwiększona ekspresja genów oraz regulacja poziomu metylacji obszarów promotorowych genów związanych z autofagią. Ponadto, w obydwu modelach uszkodzeń doszło do dysregulacji ekspresji miRNA, uznawanych jednocześnie za czynniki regulujące proces apoptozy oraz biomarkery udaru niedokrwiennego mózgu. Fakty te sugerują, że w trakcie epizodu hipoksyjno-ischemicznego zmienia się status epigenetyczny neuronów, co może zostać wykorzystane jako mechanizm działania nowych leków.

### 2. Wykazanie antyapoptotycznego wpływu amorfrutyny B na pierwotne komórki nerwowe myszy poddane hipoksji oraz ischemii

Kolejnym etapem badań była ocena neuroprotekcyjnych mechanizmów działania amorfrutyny B w kontekście wywołanych przez hipoksję oraz ischemię procesów apoptotycznych. W tym celu amorfrutyna B została podana komórkom nerwowym po 6 godzinach od wywołania hipoksji/ischemii na kolejne 18 godzin z jednoczesnym przywróceniem neuronom dostępu do tlenu (model hipoksji) lub tlenu i glukozy (model ischemii). Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że pourazowa terapia amorfrutyną B zwiększa błonowy potencjał

mitochondrialny, co wskazuje na poprawę funkcji mitochondriów, hamowanie procesu apoptozy i ochronę komórek nerwowych przed uszkodzeniem wywołanym zarówno hipoksją, jak i ischemią. Wizualizacja zmian w strukturze chromatyny przy pomocy barwnika Hoechst 33342 wykazała, że podanie amorfrutyny B ogranicza formowanie skupisk heterochromatyny, co sugeruje hamowanie kondensacji chromosomów i początkowego stadium procesu apoptozy wywołanego hipoksją oraz ischemią. Analizy molekularne potwierdziły ochronne właściwości amorfrutyny B, która częściowo obniżała poziom ekspresji proapoptotycznych genów oraz znacząco redukowała poziom wszystkich propapoptotycznych białek (FAS, FASL, BAX, GSK3 $\beta$ ) w modelach hipoksji i ischemii. Wyjątkiem była ekspresja antyapoptotycznego białka BCL2, która wzrosła w odpowiedzi na leczenie. Amorfrutyna B wpływała na regulację poziomu metylacji obszarów promotorowych genów związanych z apoptozą poprzez hipermetylację *Bax* w ischemii oraz hipometylację *Bcl2* w hipoksji, co tłumaczy obniżenie propapoptotycznego wskaźnika jakim jest stosunek BAX/BCL2. Sugeruje to zdolność amorfrutyny B do hamowania procesu apoptozy poprzez regulację poziomu metylacji DNA, a tym samym statusu epigenetycznego komórek nerwowych narażonych na hipoksję oraz ischemię. Uzyskane wyniki wskazują na antyapoptotyczne właściwości amorfrutyny B, co może stanowić istotny element nowej strategii terapeutycznej polegającej na wykorzystaniu tej substancji do leczenia uszkodzeń mózgu wywołanych niedotlenieniem lub niedokrwieniem.

### **3. Ocena wpływu amorfrutyny B na proces autofagii towarzyszący komórkom nerwowym narażonym na hipoksję oraz ischemię**

Badanie fluorescencyjne z wykorzystaniem CYTO-ID sugeruje, że mechanizmy ochronnego działania amorfrutyny B w hipoksji oraz ischemii obejmują również hamowanie autofagii. Amorfrutyna B obniżała poziom autofagolizosomów, czyli struktur zawierających materiał do strawienia powstałych z połączenia autofagosomów z lizosomami. Ponadto, podanie komórkom amorfrutyny B skutkowało obniżeniem ekspresji genów *Becn1*, *Nup62* oraz *Ambra1* w hipoksji, a także wzrostem ekspresji genu *Atg5* i poziomu białek MAP1LC3B, AMBRA1 w ischemii. Wskaźniki metylacji obszarów promotorowych genów związanych z autofagią wskazały, że amorfrutyna B powodowała hipermetylację *Map1lc3b*, *Atg7* oraz *Becn1*, co w konsekwencji może przyczyniać się w późniejszych etapach do obniżenia ekspresji genów i hamowania autofagii przez badaną substancję. Ostatnim etapem badań było wyciszenie ekspresji genów *Becn1* i *Atg7* poprzez zastosowanie specyficznych siRNA, a następnie ocena skuteczności amorfrutyny B w ochronie komórek i weryfikacja jej oddziaływania na określoną

ścieżkę sygnałową. Wykazano, że neuroprotekcyjne efekty działania amorfrutyny B zanikły w komórkach transfekowanych siRNA, co dowodzi zaangażowania badanych ścieżek sygnałowych w ochronną aktywność amorfrutyny B wobec hipoksji (*Becn1* i *Atg7*) i ischemii (*Becn1*). Podsumowując, przeważająca część uzyskanych wyników sugeruje, że amorfrutyna B hamuje proces autofagii wywołanej w komórkach nerwowych hipoksją lub ischemią.

#### **4. Ocena wpływu amorfrutyny B na profile ekspresji miRNA w komórkach nerwowych poddanych hipoksji oraz ischemii**

Przedmiotem wykonanej analizy mikromacierzy były profile ekspresji 84 miRNA związanych z apoptozą, które scharakteryzowano w komórkach nerwowych narażonych na hipoksję oraz ischemię, a także w odpowiedzi na leczenie przy użyciu amorfrutyny B. Niektóre z analizowanych miRNA były związane nie tylko z apoptozą, lecz również z autofagią np. *miR-133a* i *miR-17-5p*. Z przeprowadzonej analizy wynika, że amorfrutyna B regulowała ekspresję wielu miRNA przeciwnie do zmian wywołanych przez hipoksję i ischemię. Efekty działania amorfrutyny B obejmowały m.in. zmniejszenie ekspresji *miR-106b-5p* i *miR-145-5p* w modelu hipoksyjnym oraz zwiększenie ekspresji *miR-34c-5p* i *miR-98-5p* w modelu ischemicznym. Powyższe modyfikacje ekspresji miRNA można powiązać z hamowaniem apoptozy oraz łagodzeniem deficytów neurologicznych i zmniejszeniem obszaru uszkodzenia w zwierzęcych modelach udaru niedokrwiennego mózgu. Otrzymane wyniki sugerują, że wywołane przez amorfrutynę B zmiany profili miRNA stanowią epigenetyczny mechanizm neuroprotekcji w neuronach narażonych na hipoksję oraz ischemię.

#### **5. Podsumowanie uzyskanych wyników badań**

Podsumowując, w omawianej pracy wykazano, że indukowana przez hipoksję oraz ischemię apoptoza komórek nerwowych jest hamowana przez amorfrutynę B, co manifestuje się m.in. poprzez poprawę funkcji mitochondriów, ograniczenie formowania skupisk heterochromatyny oraz obniżenie ekspresji czynników proapoptotycznych. Ponadto dowiedziono, że amorfrutyna B hamuje związany z hipoksją i ischemią proces autofagii, czego przejawem jest ograniczenie formowania autofagolizosomów. U podłoża wywołanych przez amorfrutynę B zmian leży epigenetyczna regulacja poziomu ekspresji genów, która polega na zmianie poziomu metylacji obszarów promotorowych genów związanych z apoptozą i autofagią, a także normalizacja ekspresji miRNA zaklasyfikowanych jako markery udaru mózgu.

## **PUBLIKACJA 2**

Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

**PODSUMOWANIE WYKORZYSTANYCH METOD BADAWCZYCH  
ORAZ BADANYCH PARAMETRÓW I PROCESÓW**

<i>Metoda badawcza</i>	<i>Badane parametry i procesy</i>
Barwienie immunofluorescencyjne i mikroskopia konfokalna	Wizualizacja komórek mikrogleju oraz poziom IBA1
Oznaczenie poziomu kaspazy-1	Aktywność odpowiedzi zapalnej
Oznaczenie JC-1	Błonowy potencjał mitochondrialny
Oznaczenie MTT	Aktywność metaboliczna, żywotność komórek
Ocena poziomu LDH	Śmierć komórek, procesy nekrotyczne, cytotoksyczność
Test BrdU	Potencjał proliferacyjny
Oznaczenie AlamarBlue	Żywotność komórek, aktywność enzymatyczna
Test Fluoro-Jade C	Poziom neurodegeneracji
Barwienie fluorescencyjne z użyciem kalceiny AM i Hoechst 33342	Wizualizacja żywych komórek i jąder komórkowych; morfologia komórek
qPCR	Ekspresja genów związanych z zapaleniem ( <i>IL1B</i> , <i>IL10</i> , <i>TNFA</i> ), szlakiem sygnałowym PPAR $\gamma$ ( <i>PPARG</i> , <i>PGC1A</i> ) oraz funkcją mitochondriów ( <i>BCL2</i> )
ELISA	Poziom białek związanych z zapaleniem (IL-1 $\beta$ , IL-10), szlakiem sygnałowym PPAR $\gamma$ (PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ ) oraz funkcją mitochondriów ( <i>BCL2</i> )



## UZASADNIENIE BADAŃ

Mikroglej odgrywa fundamentalną rolę w odpowiedzi zapalnej tkanki mózgowej, a regulacja jego aktywności poprzez interwencje farmakologiczne może być kluczowa dla zmniejszenia uszkodzeń i promowania procesów regeneracyjnych u pacjentów z niedotlenieniem lub niedokrwieniem mózgu. Ostatnie prace dowodzą, że aktywacja PPAR $\gamma$  jest kluczowym czynnikiem promującym przeciwzapalny profil mikrogleju. Wykazanie przeciwzapalnych właściwości amorfrutyny B, która jest selektywnym modulatorem PPAR $\gamma$ , może zasadniczo poprawić perspektywy stosowania amorfrutyny B w farmakoterapii udarów mózgu. Przepuszczalnie ochronny wpływ amorfrutyny B na komórki nerwowe poddane uszkodzeniem hipoksyjno-ischemicznym może polegać nie tylko na bezpośrednim oddziaływaniu na neurony, lecz także na zaktywowywany mikroglej. W odpowiedzi na brak tlenu i substancji odżywczych w mózgu, komórki mikrogleju aktywnie proliferują i ulegają zmianom metabolicznym świadczącym o ich aktywacji. Jest więc uzasadnione, by zbadać w jaki sposób amorfrutyna B wpływa na aktywność metaboliczną, funkcje mitochondriów i potencjał proliferacyjny mikrogleju w warunkach hipoksyjno-ischemicznych. Do czasu opublikowania omawianej pracy nie było danych na temat roli amorfrutyny B w modulacji funkcji ludzkiego mikrogleju. Dostarczenie takich informacji może mieć istotne znaczenie dla rozwoju terapii chorób o podłożu neurozapalnym, w tym niedotlenienia okołoporodowego i udaru niedokrwienego mózgu.

## WYNIKI BADAŃ

### 1. Walidacja modelu hipoksji i ischemii do badania skuteczności amorfrutyny B w modulowaniu procesów związanych z aktywacją mikrogleju oraz procesów zaangażowanych w ochronę komórek nerwowych

W hodowlach komórek mikrogleju eksperymentalny model hipoksji oraz ischemii składał się z następujących etapów: **i.** 6 godzin hipoksji (DMEM z glukozą i obniżoną zawartością płodowej surowicy bydlęcej (FBS) do 1%) lub 6 godzin ischemii (DMEM bez glukozy z obniżoną zawartością FBS do 1%), **ii.** 18 godzin reoksygenacji w DMEM z glukozą i podwyższoną zawartością FBS do 5% (paradygmat 6+18). Aby uchwycić trudne do zaobserwowania efekty związane z aktywnością kaspazy-1, opisany wyżej paradygmat został skrócony do 2 godzin hipoksji/ischemii oraz 5 godzin reoksygenacji/przywrócenia dostępu do glukozy (paradygmat 2+5). Wyniki uzyskane na tym etapie badań dowodzą, że w wyniku hipoksji oraz ischemii dochodzi do aktywacji mikrogleju, a zwiększona odpowiedź zapalna komórek przejawia się podwyższeniem poziomu IBA1, wzrostem aktywności kaspazy-1 oraz ekspresji prozapalnych markerów *IL1B* i *TNFA*, a także brakiem detekcji lub obniżeniem ekspresji przeciwzapalnego markera *IL10/IL-10*. Analiza morfologiczna mikrogleju wykazała, że hipoksja oraz ischemia wywołują zmianę fenotypu mikrogleju na prozapalny „M1”, co manifestuje się poprzez zmniejszenie stopnia rozgałęzienia oraz zwiększenie ogólnej powierzchni komórek i najkrótszej odległości pomiędzy dwoma punktami, które leżą na przeciwległych stronach otoczki wypukłej komórki. Zmianom tym towarzyszył spadek ekspresji receptora *PPARG/PPAR $\gamma$*  oraz *PGC1 $\alpha$* . Wykonane analizy udowodniły również, że w trakcie hipoksji oraz ischemii obserwuje się zwiększenie błonowego potencjału mitochondrialnego, wzrost aktywności metabolicznej i potencjału proliferacyjnego mikrogleju oraz zwiększenie ekspresji *BCL2/BCL2*, przy jednoczesnym spadku poziomu wydzielanego LDH. Co ciekawe, stymulujący wpływ hipoksji oraz ischemii na potencjał proliferacyjny i aktywność metaboliczną mikrogleju jest przeciwny do hamującego wpływu hipoksji i ischemii na przeżycie neuronów. W komórkach nerwowych poddanych 6-godzinnej hipoksji/ischemii wykazano zmniejszenie żywotności komórek oraz zwiększony poziom neurodegeneracji.

## **2. Wykazanie przeciwzapalnych właściwości amorfrutyny B w mikrogleju poddanym hipoksji oraz ischemii**

Podanie amorfrutyny B (1 i 5  $\mu\text{M}$ ) po 6 godzinach od zainicjowania hipoksji oraz ischemii w komórkach mikrogleju skutkowało obniżeniem ekspresji IBA1 oraz zmianami morfologii mikrogleju tj. zwiększonym stopniem rozgałęzienia komórek, zmniejszeniem powierzchni komórek i najkrótszej odległości pomiędzy dwoma punktami, które leżą na przeciwległych stronach otoczki wypukłej komórki. W zależności od stężenia amorfrutyny B, zaobserwowano zmiany w ekspresji markerów związanych z zapaleniem tj. zmniejszenie ekspresji prozapalnych czynników *TNFA* i *IL1B/IL-1 $\beta$*  oraz zwiększenie ekspresji przeciwzapalnej *IL10/IL-10*. W przypadku paradygmatu 6+18, amorfrutyna B obniżyła aktywność kaspazy-1 w modelu ischemii, natomiast w skróconym paradygmacie 2+5 substancja ta wywoływała wspomniany efekt zarówno w modelu hipoksji, jak i ischemii. Wyniki te jednoznacznie wskazują na przeciwzapalne właściwości amorfrutyny B, a jej zdolność do zwiększenia ekspresji *PPARG/PPAR $\gamma$*  oraz *PGC1 $\alpha$*  sugeruje, że to właśnie te szlaki sygnałowe są zaangażowane w wywołaną przez badany lek redukcję stanu zapalnego zainicjowanego przez hipoksję oraz ischemię.

## **3. Ocena wpływu amorfrutyny B na potencjał proliferacyjny komórek oraz aktywność metaboliczną mikrogleju narażonego na hipoksję oraz ischemię**

Na kolejnym etapie badań wykazano, że podanie amorfrutyny B (1 lub 5  $\mu\text{M}$ ) skutkowało zmniejszeniem aktywności metabolicznej, a także zależną od stężenia substancji redukcją błonowego potencjału mitochondrialnego i obniżeniem ekspresji czynnika *BCL2/BCL2* związanego z zachowaniem integralności mitochondrialnej błony zewnętrznej. Ponadto, amorfrutyna B zmniejszała potencjał proliferacyjny komórek mikrogleju, które były narażone na hipoksję oraz ischemię. Należy zaznaczyć, że bardziej wyraźne zmiany w badanych parametrach zostały wywołane przez amorfrutynę B o stężeniu 5  $\mu\text{M}$ , a wpływ na poszczególne czynniki wskazuje na zdolność badanej substancji do normalizacji statusu metabolicznego komórek oraz poprawy funkcji mitochondriów. Odnośnie poziomu wydzielanego przez mikroglej LDH, uważamy, że wywołany amorfrutyną B wzrost poziomu LDH w ischemii jest efektem niespecyficznym. Powodem takiej interpretacji wspomnianego wyniku jest konieczność hodowli komórek mikrogleju w pożywce z FBS, o którym wiadomo, że zawiera LDH (Thomas i wsp., 2015).

#### **4. Ocena ochronnego wpływu amorfrutyny B na komórki nerwowe poddane hipoksji i ischemii**

W celu pogłębienia wiedzy na temat neuroprotekcynego mechanizmu działania amorfrutyny B, w pierwotnych hodowlach mysich neuronów wykonano test żywotności AlamarBlue oraz oznaczenie poziomu neurodegeneracji przy pomocy Fluoro-Jade C. Test AlamarBlue wykazał, że podanie amorfrutyny B (1, 5 i 10  $\mu\text{M}$ ) po 6 godzinach od zainicjowania uszkodzenia hipoksyjnego oraz ischemicznego, wpływa ochronnie na komórki nerwowe zwiększając ich żywotność. Biorąc pod uwagę fakt, że w publikacji Wnuk, Przepiórska i wsp. (2021) wykazano toksyczność amorfrutyny B w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  dla komórek nerwowych w warunkach normoksyjnych, uzyskany w tym przypadku wynik testu AlamarBlue dla stężenia 10  $\mu\text{M}$  może być niespecyficzny. Po wybraniu najniższych efektywnych stężeń substancji (1 i 5  $\mu\text{M}$ ) wykonano oznaczenia z użyciem Fluoro-Jade C dowodząc, że amorfrutyna B obniża poziom neurodegeneracji. Jednoczesne podanie amorfrutyny B oraz GW9662 (antagonista receptora PPAR $\gamma$ ) spowodowało wzrost poziomu neurodegeneracji, co potwierdza zaangażowanie PPAR $\gamma$  w neuroprotekcynne właściwości amorfrutyny B.

#### **5. Podsumowanie uzyskanych wyników badań**

Otrzymane przeze mnie wyniki po raz pierwszy dowiodły, że amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją oraz ischemią aktywację mikrogleju poprzez zmianę fenotypu z prozapalnego „M1” na przeciwzapalny „M2”, a także normalizację potencjału proliferacyjnego i kontrolę statusu metabolicznego komórek. Substancja ta hamuje zależny od szlaku PPAR $\gamma$  stan zapalny, a także zmienia morfologię komórek z ameboidalnego mikrogleju „M1” na bardziej rozgałęziony fenotyp mikrogleju „M2”. Amorfrutyna B normalizuje zwiększoną w wyniku hipoksji i ischemii aktywność metaboliczną mikrogleju, redukuje potencjał proliferacyjny komórek oraz kontroluje funkcje mitochondriów poprzez obniżanie czynnika *BCL2/BCL2* i normalizację błonowego potencjału mitochondrialnego komórek. Zdolność amorfrutyny B do ochrony neuronów oraz modulacji aktywacji mikrogleju sprawia, że substancja ta staje się obiecującym kierunkiem w rozwoju farmakoterapii niedotlenienia i niedokrwienia mózgu.

## DYSKUSJA

Niedotlenienie oraz niedokrwienie mózgu to zaburzenia wynikające z niewystarczającego dopływu natlenowanej krwi i składników odżywczych do tkanki mózgowej, prowadzące do uszkodzenia neuronów i groźnych konsekwencji w obrębie funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Wysoka śmiertelność zarówno osób dorosłych po udarze niedokrwiennym, jak i noworodków w wyniku niedotlenienia okołoporodowego wynika z braku efektywnych, a jednocześnie bezpiecznych leków, które posiadałyby szerokie okno terapeutyczne. Ostatnie dane wskazują na PPAR $\gamma$  jako interesujący punkt uchwytu w leczeniu nie tylko schorzeń metabolicznych, ale także chorób neurodegeneracyjnych w tym udaru mózgu czy choroby Alzheimera. Dotychczasowe niepowodzenia badań klinicznych w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych z użyciem agonistów receptora PPAR $\gamma$  z grupy TZD, wynikały głównie z ryzyka wystąpienia poważnych działań niepożądanych m.in. hepatotoksyczności czy kardiotoxyczności. Co więcej, częściowe wycofanie stosowanych w leczeniu cukrzycy TZD skłoniło naukowców do zmiany podejścia w sposobie aktywacji receptora PPAR $\gamma$  i poszukiwania ligandów nowej generacji. Uwaga badaczy skupiła się na selektywnej modulacji receptora, wywołującej specyficzne efekty w różnych tkankach poprzez unikalne zmiany konformacyjne receptora i selektywne wiązanie kofaktorów. Substancje te zachowują dzięki temu przeciwcukrzycową skuteczność TZD, minimalizując jednocześnie ryzyko wystąpienia skutków ubocznych. Przykładem substancji z grupy SPPAR $\gamma$ M jest amorfrutyna B, która występuje jako produkt naturalnego pochodzenia oraz selektywnie moduluje aktywność receptora PPAR $\gamma$ . Ostatnie badania z wykorzystaniem mysiego modelu insulinooporności wykazały, że substancja ta poprawia wrażliwość na insulinę, zwiększa tolerancję glukozy oraz redukuje stłuszczenie wątroby wywołane dietą wysokotłuszczową. Dotychczas nie podjęto prób wykorzystania amorfrutyny B do ochrony komórek nerwowych przed uszkodzeniem hipoksyjno-ischemicznym. Jednak bezpieczny profil farmakologiczny amorfrutyny B oraz selektywny sposób działania sugerują, że ta substancja może stanowić doskonałe narzędzie do wybiórczej modulacji szlaku sygnałowego receptora PPAR $\gamma$  celem wywoływania neuroprotekcji. Z tego powodu zaprezentowany cykl przeprowadzonych przeze mnie badań dotyczył weryfikacji ochronnego potencjału amorfrutyny B w komórkowych modelach udaru niedokrwiennego mózgu oraz niedotlenienia okołoporodowego, z wykorzystaniem pierwotnych hodowli komórek kory mózgowej myszy *in vitro*. Co więcej, moje badania zostały poszerzone o sprawdzenie potencjału amorfrutyny B w modulacji odpowiedzi immunologicznej z użyciem komórek ludzkiego mikrogleju

(linia HMC3) we wspomnianych modelach. Wykorzystane modele doświadczalne pozwoliły na wieloaspektową analizę mechanizmów działania amorfrutyny B, stanowiąc równocześnie punkt wyjścia do kolejnych badań. W dalszej perspektywie terapeutyczny efekt działania amorfrutyny B powinien zostać potwierdzony na zwierzęcych modelach udaru mózgu i asfiksji okołoporodowej, co może przybliżyć decyzję o podjęciu prób klinicznych z użyciem tej substancji.

## **Dyskusja wyników uzyskanych z wykorzystaniem mysich neuronów kory mózgowej**

### ***Modele***

W publikacjach stanowiących podstawę mojej rozprawy doktorskiej wykorzystano modele hipoksji oraz ischemii *in vitro*, które polegały na poddaniu mysich komórek nerwowych kory mózgowej 6-godzinnemu niedotlenieniu (hipoksja) lub 6-godzinnemu niedotlenieniu z deficytem glukozy (ischemia), a następnie przywróceniu warunków początkowych w procesie reoksygenacji trwającym 18 godzin. Wybór kory mózgowej jako obszaru zainteresowań w naszych eksperymentach wynikał z faktu, że w rdzeniu uszkodzenia mózgu jako pierwsze umierają neurony warstwy korowej, czyli obszaru kluczowego dla koordynacji ruchowej oraz procesów poznawczych (Butler i Chiong, 2019; Kalinichenko i wsp., 2022, 2023). Dodatkowo, to właśnie zaburzenia krążenia mózgowego przedniego, zaopatrującego korę mózgową w tlen i niezbędne substancje odżywcze, są przyczyną 70-80% wszystkich ostrych udarów niedokrwiennych mózgu (Halúsková i wsp., 2021; Javed i Das, 2023). Wykorzystanie zarówno modeli hipoksji, jak i ischemii przy modelowaniu niedotlenienia okołoporodowego i udaru niedokrwiennego mózgu jest zasadne szczególnie że początkowy etap asfiksji okołoporodowej stanowi hipoksja, która następnie może doprowadzić do ischemii, wywołanej upośledzeniem pracy serca. Przeprowadzone przeze mnie analizy dowiodły, że zarówno hipoksja, jak i ischemia wywołują wzrost poziomu LDH i stopnia neurodegeneracji oraz obniżają żywotność komórek nerwowych, co jest zbliżone do obserwacji innych badaczy wykorzystujących te testy biochemiczne w modelach uszkodzeń hipoksyjno-ischemicznych mózgu *in vitro* i *in vivo* (Baudel i wsp., 2017; Gamdzyk i wsp., 2018; Chen i wsp., 2019). Ponadto adekwatność zastosowanych przeze mnie modeli została potwierdzona poprzez wykazanie udziału mechanizmów zaangażowanych w patogenezę niedotlenienia okołoporodowego oraz udaru niedokrwiennego mózgu tj. stresu oksydacyjnego, apoptozy i autofagii (Wu i wsp., 2014; Sekerdag i wsp., 2018; Campbell i wsp., 2019; Mollet i wsp.,

2022; Okazaki i wsp., 2023). W moich badaniach hipoksja i ischemia spowodowały wzrost poziomu ROS oraz uszkodzeń oksydacyjnych DNA/RNA neuronów, co jest zgodne z podwyższonym poziomem 8-OHdG stwierdzonym w surowicy pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu (Lorente i wsp., 2021). Silna korelacja między wysokim poziomem zależnych od ROS uszkodzeń DNA i zwiększonym ryzykiem śmierci pacjentów po udarze mózgu wskazuje na kluczową rolę stresu oksydacyjnego w patomechanizm neurodegeneracji.

Udział zależnych od apoptozy i autofagii szlaków sygnałowych w rozwoju uszkodzeń wywołanych niedotlenieniem/niedokrwieniem mózgu został potwierdzony w wielu badaniach (Hee Han i wsp., 2002; Rzemieniec i wsp., 2015, 2016, 2020; Thornton i wsp. 2017; Shvedova i wsp., 2018; Park i wsp., 2019; Uzdensky 2019; Corti i wsp., 2020; Vahsen i Lingor, 2021). W pracy **Przepiórska i wsp. (2023)** udowodniłam zaangażowanie procesów apoptozy i autofagii w uszkodzenia hipoksyjno-ischemiczne dzięki wykazaniu, że specyficzne inhibitory wymienionych procesów zmniejszają neurotoksyczność. Ponadto w zastosowanych przeze mnie komórkowych modelach uszkodzeń stwierdziłam obniżenie błonowego potencjału mitochondrialnego, formowanie skupisk heterochromatyny oraz wzrost ekspresji czynników proapoptotycznych, co jest zgodne z obserwacjami innych naukowców. Formowanie skupisk heterochromatyny jest markerem początkowego stadium apoptozy, a obniżenie błonowego potencjału mitochondrialnego w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów po udarze krwotocznym wiąże się z gorszymi rokowaniami powrotu do zdrowia (Jiao i wsp., 2005; Liu F. i wsp., 2018). Złożoność mechanizmów autofagii podczas neurodegeneracji sprawia, że rola tego procesu w odpowiedzi na uszkodzenie hipoksyjno-ischemiczne wciąż stanowi obiekt intensywnych badań naukowych (Shi i wsp., 2021). Obserwowane w naszych modelach doświadczalnych nasilone formowanie autofagolizosomów, czyli pęcherzyków powstających na drodze fuzji autofagosomów z lizosomami w końcowym etapie autofagii oraz zwiększona ekspresja czynników związanych z autofagią przemawiają za aktywną rolę tego procesu w patologii niedotlenienia i niedokrwienia mózgu (Yu i wsp., 2018). Kolejnym dowodem potwierdzającym, że zastosowane przeze mnie modele uszkodzeń hipoksyjno-ischemicznych *in vitro* odzwierciedlają w dużym stopniu warunki niedotlenieniowo-niedokrwienne *in vivo* jest wzrost ekspresji *Hif1a/HIF1 $\alpha$* , czyli markera zmian poziomu tlenu w komórkach i tkankach, którego poziom znacznie wzrasta w odpowiedzi na deficyty tlenu lub glukozy (Ramamoorthy i Shi, 2014; Sakai i wsp., 2022).

Patogeneza niedotlenienia i niedokrwienia mózgu obejmuje kilka etapów, takich jak: **i.** faza ostra, podczas której komórki nerwowe umierają w wyniku ekscytotoksyczności, stresu oksydacyjnego i apoptozy, **ii.** reperfuzja, podczas której występuje wtórne uszkodzenie komórek wywołane przez stres oksydacyjny i procesy zapalne, **iii.** faza przebudowy, która polega na reorganizacji tkanki i trwa nawet kilka tygodni po epizodzie hipoksyjno-ischemicznym (Lapchak i Zang, 2017; Kleuskens i wsp., 2021; Pang i wsp., 2021). Opracowanie nowoczesnej terapii niedotlenieniowo-niedokrwiennych uszkodzeń mózgu wymaga kompleksowego podejścia. Z tego powodu w badaniach zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej rozpoznano mechanizmy działania amorfrutyny B z uwzględnieniem różnych aspektów patofizjologii niedotlenienia okołoporodowego i udaru niedokrwienego mózgu, zwłaszcza procesów śmierci komórek nerwowych na drodze apoptozy, autofagii, a także stresu oksydacyjnego i zaangażowania zależnych od mikrogleju procesów zapalnych.

### ***Neuroprotekcja i PPAR $\gamma$***

W przedstawionych w rozprawie doktorskiej badaniach dokonano oceny neuroprotekcyjnych właściwości amorfrutyny B w paradygmacie pourazowym (*post-treatment*), kiedy to substancja była podawana po 6 godzinach od indukowanego hipoksją lub ischemią uszkodzenia komórek nerwowych. Do czasu naszych badań, wiedza na temat działania amorfrutyny B była ograniczona do jej właściwości w kontekście chorób metabolicznych. Nie istniały opublikowane dane wskazujące na neuroprotekcyny potencjał działania tej substancji. Badania *in vitro* oraz *in vivo* wskazały, że amorfrutyna B aktywuje PPAR $\gamma$  w specyficznych miejscach wiązania receptora, co pozwala na selektywną regulację transkrypcji określonego podzbioru genów i indukowanie unikalnych efektów tkankowych, bez wywoływania działań niepożądanych (Chen i wsp., 2018). Dotychczasowe badania wykazały również, że amorfrutyna B znacząco redukuje insulinooporność, stłuszczenie wątroby i dyslipidemię poprzez selektywną modulację receptora PPAR $\gamma$ . Co więcej, wykazano jej właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne (Weidner i wsp., 2013; Lavecchia i Di Giovanni, 2015; Fuhr i wsp., 2015; Liu S. i wsp., 2018; Xu i wsp., 2018). Wyniki stanowiące podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej po raz pierwszy wskazały na ochronne właściwości amorfrutyny B w komórkach nerwowych narażonych na uszkodzenia hipoksyjno-ischemiczne. Amorfrutyna B podana nawet kilka godzin po zainicjowaniu uszkodzeniu obniżała poziom neurodegeneracji i poprawiała żywotność komórek nerwowych, co zostało stwierdzone przy użyciu testów,



odpowiednio, MTT i LDH. Z wyjątkiem wyników uzyskanych w ramach niniejszej rozprawy, nie ma danych na temat efektów działania amorfrutyny B w modelach neurodegeneracji wywołanej hipoksją lub ischemią. Do czasu naszych badań, neuroprotektoryjne właściwości substancji z grupy SPPAR $\gamma$ M potwierdzono na przykładzie syntetycznej substancji INT-131, która ograniczała toksyczne działanie  $\beta$ -amyloidu w szczurzych neuronach w hodowli pierwotnej *in vitro* (Godoy i wsp., 2017; Govindarajulu i wsp., 2018). W moich badaniach, dzięki zastosowaniu selektywnego antagonisty PPAR $\gamma$  oraz wyciszeniu genu kodującego *Pparg* przy użyciu specyficznego siRNA dowiedziałam, że neuroprotektoryjne właściwości amorfrutyny B ujawniają się w wyniku aktywacji receptora PPAR $\gamma$ . Mniej jednoznaczne wyniki dotyczyły ekspresji receptora PPAR $\gamma$  oraz związanych z nim czynników PGC1 $\alpha$  oraz ADIPOQ. Podobnie jak w naszych badaniach, wzrost ekspresji receptora PPAR $\gamma$  pod wpływem hipoksji i ischemii obserwowali Victor i wsp. (2006) oraz Cai i wsp. (2018). Z badań *in vivo* wynika, że najwyższy poziom ekspresji tego receptora stwierdza się po 24 godzinach od zainicjowania niedokrwienia w modelu MCAO, co sugeruje możliwy mechanizm kompensacyjny w odpowiedzi na zmniejszoną aktywność wiązania DNA-PPAR $\gamma$  lub też zwiększoną ekspresję czynnika HIF1 $\alpha$ , który aktywuje transkrypcję PPAR $\gamma$  w warunkach deficytu tlenu (Krishnan i wsp., 2009). Wyniki zaprezentowane w opisowej części rozprawy doktorskiej oraz publikacji **Wnuk, Przepiórska i wsp. (2021)** wykazały, że amorfrutyna B wywołuje dwukierunkowe efekty tj. wzrost ekspresji PPAR $\gamma$  w modelu hipoksji oraz zmniejszenie ekspresji PPAR $\gamma$  w modelu ischemii. Powszechnie uważa się, że agoniści receptora PPAR $\gamma$  tacy jak pioglitazon czy rozyglitazon wywołują neuroprotekcję wskutek wzrostu ekspresji PPAR $\gamma$ . Nasz odmienny wynik w modelu ischemii może być efektem zaburzonej homeostazy energetycznej i zmniejszonej tolerancji neuronów na przywrócenie wyjściowego poziomu glukozy (Lu i wsp., 2012; Ahn i Lim, 2019). Nieoczekiwanym efektem była również cytoplazmatyczna lokalizacja receptora PPAR $\gamma$  w odpowiedzi na uszkodzenie komórek nerwowych i działanie amorfrutyny B, co przypuszczalnie można tłumaczyć dynamicznym transferem jądrowo-cytoplazmatycznym receptora PPAR $\gamma$  w związku ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w wyniku hipoksji i ischemii (Umemoto i Fujiki, 2012). W naszych badaniach amorfrutyna B nie wpływała na poziom ekspresji koaktywatora PPAR $\gamma$  (PGC1 $\alpha$ ) i czynnika aktywowanego przez PPAR $\gamma$  (ADIPOQ), lecz obniżała poziom ekspresji HIF1 $\alpha$  w modelu hipoksji. Ten ostatni wynik sugeruje neuroprotektoryjny mechanizm działania amorfrutyny B oparty na hamowaniu procesu apoptozy i stresu oksydacyjnego (Vetrovoy i wsp., 2020).

### ***Stres oksydacyjny, apoptoza, autofagia***

Na podstawie wyników przedstawionych w opisowej części rozprawy doktorskiej i opublikowanych przez **Wnuk, Przepiórska i wsp. (2021)** wykazano, że zastosowanie amorfrutyny B po 6 godzinach od uszkodzenia komórek nerwowych wiązało się z hamowaniem indukowanego hipoksją oraz ischemią stresu oksydacyjnego, co stwierdzono na podstawie redukcji poziomu ROS oraz markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA/RNA, 8-OHdG. Substancją o właściwościach przeciwutleniających, zbliżonych do właściwości amorfrutyny B, jest edarawon, który w badaniach klinicznych obniżał zawartość 8-OHdG w moczu pacjentów z udarem mózgu. Neuroprotekcynny potencjał edarawonu był podstawą do jego zatwierdzenia w leczeniu ostrego udaru niedokrwienego w Japonii (Nakajima i wsp., 2012). Co więcej, Hwang i wsp. (2021) zaobserwowali, że zmniejszenie poziomu ROS w zwierzęcym modelu fototrombozy przyczyniło się do poprawy funkcji mitochondriów oraz zmniejszenia deficytów neurologicznych. Podobnych obserwacji dokonano w prezentowanych obecnie badaniach (**Przepiórska i wsp., 2023**), gdzie wraz z przywróceniem przez amorfrutynę B podstawowego poziomu ROS nastąpiło zwiększenie błonowego potencjału mitochondrialnego i przypuszczalnie w konsekwencji poprawa funkcji mitochondriów. Omawianym efektem towarzyszyło ograniczenie formowania skupisk heterochromatyny, obniżenie ekspresji czynników proapoptotycznych oraz wzrost poziomu antyapoptotycznego białka BCL2. Podobny mechanizm neuroprotekcji opisano wcześniej na przykładzie telmisartanu, czyli niespecyficznego SPPAR $\gamma$ M, który hamował apoptozę wywołaną niedoborem czynników odżywczych (deficyt suplementu B27) poprzez wzrost poziomu BCL2, co zachodziło z udziałem PPAR $\gamma$  (Pang i wsp., 2014). W moich badaniach amorfrutyna B obniżała ekspresję czynników zewnętrznej ścieżki apoptotycznej (FAS/FASL), co sugeruje dużo szerszy zakres jej efektów biologicznych poprzez m.in. hamowanie długotrwałych procesów zapalnych związanych z niedokrwieniem mózgu (Niu i wsp., 2012). Wobec tego amorfrutyna B wykazuje potencjał neuroprotekcynny poprzez hamowanie wywołanej hipoksją i ischemią apoptozy, co ma istotne znaczenie translacyjne dla badań nad nowymi terapiami chroniącymi układ nerwowy przed uszkodzeniami mózgu. Plejotropowy mechanizm ochronnego działania amorfrutyny B został następnie zbadany w kontekście autofagii, która podobnie jak stres oksydacyjny czy apoptoza może wpływać na dalszy los komórek nerwowych narażonych na niedotlenienie czy niedokrwienie (Wang i wsp., 2018). Wyniki badań przedstawione w publikacji **Przepiórska i wsp. (2023)** dowodzą, że amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją oraz ischemią autofagocytozę, czego przejawem jest spadek poziomu

autofagolizosomów, czyli struktur subkomórkowych odgrywających kluczową rolę na końcowym etapie autofagii (Zhu i wsp., 2024). Rola procesu autofagii w niedotlenieniowo-niedokrwiennych uszkodzeniach mózgu budzi kontrowersje. Szereg danych wskazuje na korzystną rolę autofagii w udarze mózgu, gdzie może ona przypuszczalnie pełnić funkcję adaptacyjną poprzez degradację uszkodzonych organelli (Qi i wsp., 2015; Dai i wsp., 2017). Jednak wiele badań wskazuje na szkodliwe skutki autofagii podczas udaru mózgu, przy czym hamowanie tego procesu może równocześnie hamować apoptozę komórek nerwowych (Koiike i wsp., 2008; Jiang i wsp., 2017). Zidentyfikowany w obecnej rozprawie mechanizm działania amorfrutyny B przypomina mechanizm działania melatoniny, która wywołuje neuroprotekcję w zwierzęcym modelu MCAO poprzez hamowanie autofagii i apoptozy (Zheng i wsp., 2014). Szczególnie ciekawym wynikiem jest utrata ochronnego potencjału amorfrutyny B podczas wyciszenia ekspresji *Becn1* przy pomocy specyficznego siRNA, zarówno w komórkach poddanych hipoksji, jak i ischemii. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być spadek ekspresji PPAR $\gamma$  obserwowany u myszy z nokautem genu *Becn1* w adipocytach (Son i wsp., 2020), co sugeruje istnienie zależności między receptorem PPAR $\gamma$  i BECN1. W kontekście badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy, wyciszenie *Becn1* może się wiązać z upośledzeniem szlaku sygnałowego PPAR $\gamma$  i w dalszej konsekwencji utratą neuroprotektoryjnych właściwości amorfrutyny B. Podsumowując, amorfrutyna B chroni komórki nerwowe przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją oraz ischemią, a jej mechanizmy działania opierają się na ograniczeniu stresu oksydacyjnego oraz hamowaniu procesów apoptozy i autofagii. Silne efekty neuroprotektoryjne amorfrutyny B skłaniają do wykorzystania tej substancji w opracowaniu nowej terapii, która będzie skutecznie hamować patomechanizmy związane z niedotlenieniem i niedokrwieniem mózgu, nawet gdy potencjalny lek zostanie podany wiele godzin od wystąpienia uszkodzenia.

### ***Mechanizmy epigenetyczne***

Oprócz stresu oksydacyjnego oraz procesów apoptozy i autofagii, patofizjologia niedotlenienia i niedokrwienia mózgu obejmuje trwałe zaburzenia ekspresji genów, co ma związek ze zmianami w epigenetycznym profilu komórek nerwowych i metylacją DNA, modyfikacjami histonów i aktywnością miRNA (Bustelo i wsp., 2020; Peng i wsp., 2022). Ostatnie badania ujawniły, że związki naturalnego pochodzenia, takie jak kurkumina, resweratrol czy galusan epigallokatechiny, potrafią regulować epigenetyczny status komórek nerwowych i w ten sposób wywierać korzyści zdrowotne m.in., w leczeniu udaru mózgu, choroby Alzheimera

oraz choroby Parkinsona (Kalani i wsp., 2015; Martinez-Iglesias i wsp., 2023; Wang i wsp., 2023). Do grupy wspomnianych substancji należy amorfrutyna B, która według wyników wchodzących w skład opisowej części niniejszej rozprawy doktorskiej (**Wnuk, Przepiórska i wsp., 2021**) oraz rezultatów przedstawionych w publikacji **Przepiórska i wsp., 2023**, hamuje wywołane hipoksją oraz ischemią uszkodzenia neuronów, przy jednoczesnym indukowaniu zmian epigenetycznych w komórkach. Wykazano, że amorfrutyna B obniża wywołany hipoksją wzrost aktywności sirtuin, a także zwiększa aktywność acetylotransferaz histonowych zarówno w warunkach hipoksyjnych, jak i ischemicznych. Sirtuiny są grupą enzymów, które poprzez wpływ na ekspresję szeregu genów mogą brać udział w przeciwstawnych procesach komórkowych i w ten sposób promować neuroprotekcję lub przyczyniać się do uszkodzenia neuronów (Verma i wsp., 2019; Liu i wsp., 2023). Według Khoury i wsp. (2018) obniżenie aktywności specyficznej podgrupy sirtuin hamuje autofagię (SIRT6) lub też redukuje stres oksydacyjny (SIRT2, SIRT3), co pozwala powiązać hamowanie aktywności sirtuin z neuroprotektoryjnym działaniem amorfrutyny B w warunkach niedotlenienia. Z kolei wzrost aktywności HAT przez amorfrutynę B w hipoksji i ischemii może mieć związek z promowaniem wzrostu neurytów i stymulacją mechanizmu transkrypcyjnego związanego z neurogenezą (Gaub i wsp., 2010). Badacze Lanzilotta i wsp. (2013), poczynili podobne obserwacje do naszych wskazując na wywołane przez deficyt tlenu i glukozy obniżenie acetylacji histonu H3 i brak zmian w aktywności HDAC w pierwotnych komórkach nerwowych myszy. Zmiany te wynikały z zaburzeń energetycznych oraz zmniejszenia poziomu acetylo-CoA, czyli kluczowego substratu dla HAT. Zatem wzrost aktywności HAT w odpowiedzi na amorfrutynę B może mieć związek z poprawą, zarówno funkcji mitochondriów, jak i bilansu energetycznego komórek nerwowych narażonych na hipoksję oraz ischemię. Przedstawione wyniki (**Przepiórska i wsp., 2023**) po raz pierwszy wskazują na zdolność amorfrutyny B do regulacji poziomu metylacji poszczególnych genów związanych z procesami apoptozy i autofagii. Hipermetylacja wysp CpG w obrębie promotora genu zwykle prowadzi do utraty ekspresji genów, a liczne badania potwierdzają znaczenie tych zmian w różnicowaniu komórek nerwowych, a także rozwoju uszkodzeń mózgu wywołanych niedotlenieniem i niedokrwieniem (Cholewa-Waclaw i wsp., 2016; Choi i wsp., 2022; Cullell i wsp., 2022). Możemy przypuszczać, że zmiany w poziomie metylacji tj. hipermetylacja obszaru promotora genu *Bax* w ischemii oraz hipometylacja regionu promotorowego genu *Bcl2* w hipoksji, są odpowiedzialne za spadek ekspresji BAX oraz wzrost ekspresji BCL2 w odpowiedzi na amorfrutynę B. Z kolei hipermetylacja regionów promotorowych genów *Map1lc3b*, *Atg7* oraz *Becn1* nie miały wpływu na poziom ekspresji czynników związanych

z autofagią, co może sugerować inne mechanizmy regulacyjne amorfrutyny B w warunkach hipoksyjnych i ischemicznych. Coraz więcej danych sugeruje związek pomiędzy wzorcami metylacji specyficznych genów a występowaniem chorób neurodegeneracyjnych. Przykładowo niedobór witaminy B powoduje hipometylację *GSK3β* u pacjentów z chorobą Alzheimera, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia ekspresji tego czynnika, fosforylacji tau i tworzenia splątków neurofibrylarnych (Nicolia i wsp., 2010). Zbliżone zmiany do tych obserwowanych w naszych badaniach zostały udokumentowane w wyniku suplementacji witaminą B12, która przywraca wzorce metylacji DNA specyficznych genów i w ten sposób chroni przed neurodegeneracją (Lauer i wsp., 2022). Oprócz wyżej wymienionych mechanizmów modulujących transkrypcję genów, miRNA, znane również jako małe, niekodujące RNA stanowią potencjalne biomarkery umożliwiające wczesne wykrycie udaru mózgu (Mens i wsp., 2021). Badania eksperymentalne wykazały, że inhibitory miRNA, czyli antagomiry, mogą zmniejszać uszkodzenia tkanki mózgowej w warunkach niedokrwienia, blokując miRNA odpowiedzialne za obniżenie ekspresji genów antyapoptotycznych i zapobiegając w ten sposób apoptozie neuronów (Xu, Ouyang i wsp., 2015). W pracy **Przepiórska i wsp. (2023)** po raz pierwszy udowodniono, że jednym z mechanizmów działania amorfrutyny B jest normalizacja poziomów miRNA regulujących proces apoptozy, a jednocześnie będących markerami niedotlenienia lub niedokrwienia mózgu. Analiza mikromacierzy ujawniła, że wywołane hipoksją zmiany w ekspresji 21 miRNA były odwrotnie regulowane w odpowiedzi na amorfrutynę B, a modyfikacje te dotyczyły m.in. hamowania ekspresji *miR-144-3p*, *miR-16-5p*, *miR-106b-5p* czy *miR-145-5p*. Wyniki innych grup badawczych dowiodły, że zastosowanie antagomira wobec *miR-106b-5p* łagodzi uszkodzenie wywołane MCAO poprzez hamowanie apoptozy i stresu oksydacyjnego, a blokowanie *miR-145-5p* zmniejsza uszkodzenia neuronów poprzez hamowanie osi *miR-145-5p/NURR1/TNF-α* w ostrej fazie MCAO u szczurów (Li i wsp., 2017; Xie i wsp., 2017). Z kolei zmiany w ekspresji 9 miRNA wywołane ischemią były odwrotnie regulowane przez amorfrutynę B, a dotyczyły one między innymi *let-7c-5p*, *miR-34c-5p* oraz *miR-98-5p*. Inne grupy badawcze również wykazały nadekspresję wspomnianych miRNA, co było skorelowane ze zmniejszeniem uszkodzeń mózgu poprzez hamowanie apoptozy u myszy poddanych MCAO (Ni i wsp., 2015; Yu i wsp., 2021; Tu i Hu, 2021). Można zatem przypuszczać, że regulacja ekspresji miRNA stanowi ważny mechanizm neuroprotekcijnego działania amorfrutyny B wobec uszkodzeń hipoksyjno-ischemicznych. Uzyskane wyniki sugerują, że poprzez odwracanie zmian epigenetycznych w komórkach nerwowych i precyzyjne celowanie w określone patomechanizmy niedotlenienia oraz niedokrwienia mózgu amorfrutyna B może stanowić

unikalne narzędzie służące poprawie farmakoterapii udaru niedokrwionego mózgu i/lub niedotlenienia okołoporodowego.

## **Dyskusja wyników uzyskanych z wykorzystaniem ludzkiej linii mikrogleju HMC3**

### ***Modele***

Na kolejnym etapie badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej dokonano oceny zdolności amorfityny B do modulacji odpowiedzi immunologicznej z wykorzystaniem ludzkiej linii mikrogleju HMC3 (**Przepiórska-Drońska i wsp., 2024**). Linia HMC3 wykazuje ekspresję specyficznych dla mikrogleju markerów, zachowuje funkcje immunologiczne, a także reaguje na stymulanty takie jak LPS, poprzez uwalnianie czynników zapalnych (Dello Russo i wsp., 2018; Rai i wsp., 2020; Baek i wsp., 2021). Mikroglej to rezydentne komórki odpornościowe, które biorą udział w odpowiedzi zapalnej, stanowiąc pierwszą linię obrony podczas stanów patologicznych takich jak niedotlenienie i niedokrwienie mózgu (Ochocka i Kaminska 2021; Li i wsp., 2020). Obecnie uważa się, że mikroglej może wywierać szkodliwy lub korzystny wpływ na funkcjonowanie centralnego układu nerwowego, prezentując, odpowiednio, prozapalny fenotyp „M1” lub przeciwzapalny fenotyp „M2”. Coraz częściej postulowana jest bardziej złożona, tzw. dynamiczna koncepcja mikrogleju z szerszym spektrum fenotypów. Natomiast stosowana w obecnej rozprawie doktorskiej binarna koncepcja „M1/M2” stanowi uproszczoną terminologię, która mimo wszystko wciąż jest powszechnie używana w literaturze naukowej (Paolicelli i wsp., 2022). Odpowiedź immunologiczna mikrogleju na hipoksję/ischemię wykazuje dynamiczny charakter, trwając od kilku godzin do nawet kilku dni, przy czym parametry związane z aktywacją oraz proliferacją mikrogleju osiągają wartości szczytowe 1-4 dni po udarze mózgu (Yenari i wsp., 2010; DeLong i wsp., 2022; Fan i wsp., 2023). W badaniach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej potwierdzono te obserwacje i wykazano, że zarówno hipoksja, jak i ischemia aktywują mikroglej poprzez zmianę fenotypu komórek na prozapalny „M1” oraz wzrost aktywności metabolicznej i potencjału proliferacyjnego komórek. Analiza immunofluorescencyjna wykazała wywołany hipoksją oraz ischemią wzrost poziomu IBA1, czyli białka biorącego udział w reorganizacji struktury komórek mikrogleju, będącego zarazem markerem aktywacji mikrogleju. Ponadto z moich badań wynika, że hipoksja/ischemia zwiększa aktywność kaspazy-1 i ekspresję czynników prozapalnych (*IL1B* lub *TNFA*), przy jednoczesnym zmniejszeniu poziomu czynnika przeciwzapalnego (*IL10/IL-10*). Podobne efekty były wcześniej obserwowane w mysim

modelu MCAO, gdzie stwierdzono zwiększoną aktywność kaspazy-1, profil uwalniania cytokin prowadzący do stanu zapalnego i prozapalny fenotyp „M1” mikrogleju (Li i wsp., 2019). Kluczowymi wskaźnikami aktywacji komórek mikrogleju są jego parametry morfometryczne, takie jak stopień rozgałęzienia czy powierzchnia ciała komórki. Transformacja z formy rozgałęzionej do ameboidalnej została uznana jako kryterium zmiany fenotypu ze stanu spoczynku do stanu aktywacji mikrogleju (Vidal-Itriago i wsp., 2022). Taylor i Sansing. (2013) oraz Wittekindt i wsp. (2022) przedstawili, że aktywacja mikrogleju jest silnie powiązana ze zmianą morfologii komórek w kierunku mniej rozgałęzionych i przypominających kształt ameboidalny, co skutkuje ich zwiększonym rozmiarem. Z kolei inna grupa badawcza powiązała wspomniane modyfikacje morfologiczne ze zwiększoną liczbą komórek IBA1/BrdU pozytywnych, wskazując jednocześnie na wzrost potencjału proliferacyjnego mikrogleju w wyniku MCAO (Sapkota i wsp., 2017). Analogiczne rezultaty uzyskano w pracy **Przepiórska-Drońska i wsp. (2024)**, co wskazuje na aktywację komórek mikrogleju w zastosowanych modelach hipoksji oraz ischemii. Zmianom morfologicznym i wzrostowi poziomu IBA1 towarzyszył wzrost aktywności metabolicznej i błonowego potencjału mitochondrialnego komórek, a także zwiększona ekspresja mRNA i białka *BCL2/BCL2*. Powyższe efekty są w zgodzie z obserwacjami innych grup badawczych, które wykazały, że stymulacja mikrogleju przez LPS lub w modelu autoimmunologicznego zapalenia mózgu powodowała wzrost błonowego potencjału mitochondrialnego i podwyższenie aktywności metabolicznej komórek, co interpretowano jako warunki sprzyjające wytwarzaniu ROS i reakcji zapalnej (Bauerfeld i wsp., 2012; Peruzzotti-Jametti i wsp., 2024). Podobnie jak w moich badaniach podwyższony poziom czynnika BCL2 stwierdzono wcześniej w komórkach glejowych szczurów poddanych niedokrwieniu mózgu (Chen i wsp., 1997). Badania sugerują nową rolę BCL2, która miałaby polegać na stymulowaniu aktywności metabolicznej i mitochondrialnej (Chen i Pervaiz, 2010), co mogłoby tłumaczyć obserwowany w modelach hipoksji oraz ischemii wzrost ekspresji mRNA i poziomu tego białka w komórkach mikrogleju. Niedobór tlenu oraz tlenu i glukozy wpływa na aktywację i status energetyczny komórek mikrogleju, a także wywołuje zmiany w szlaku sygnałowym receptora PPAR $\gamma$ , czyli czynnika transkrypcyjnego, który jest jednym z głównych regulatorów profilu immunologicznego mikrogleju (Jiang i wsp., 2020). Wykazano, że wywołana LPS aktywacja mikrogleju i niedokrwienie mózgu prowadzą do obniżenia ekspresji PPAR $\gamma$  w komórkach mikrogleju (Bernardo i wsp., 2000; Xia i wsp., 2015). Podobny efekt stwierdzono w obecnej rozprawie, przy czym obniżeniu poziomu białka PPAR $\gamma$  towarzyszyło obniżenie ekspresji jego genu *PPARG*, co przypuszczalnie wiązało się z aktywacją mikrogleju pod wpływem

hipoksji i ischemii. W zastosowanych modelach doświadczalnych nastąpiło również obniżenie poziomu PGC1 $\alpha$ , który jest istotnym kofaktorem transkrypcyjnym receptora PPAR $\gamma$ . Na podstawie powyższych badań można sugerować, że modulacja PPAR $\gamma$  i powiązanych z nim szlaków sygnałowych np. przez amorfrutynę B może regulować odpowiedź mikrogleju i w ten sposób służyć farmakoterapii niedotlenienia i niedokrwienia mózgu.

### ***Aktywacja mikrogleju i procesy zapalne***

Istotnie, wiele badań wskazuje na modulowanie profilu immunologicznego mikrogleju jako kluczowy element ochrony mózgu przed uszkodzeniami niedotlenieniowo-niedokrwieniami (Wang i wsp., 2022; Bourget i wsp., 2022). W pracy **Przepiórska-Drońska i wsp. (2024)** po raz pierwszy udowodniono, że amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją oraz ischemią aktywację mikrogleju poprzez zmianę jego fenotypu z prozapalnego „M1” na przeciwzapalny „M2”. W niniejszej rozprawie wykazano, że amorfrutyna B posiada właściwości przeciwzapalne o czym świadczy m.in. jej zdolność do hamowania aktywności kaspazy-1, obniżania poziomu czynnika IBA1 oraz zmniejszania poziomu prozapalnej *IL1B/IL-1 $\beta$* , przy jednoczesnym zwiększeniu poziomu przeciwzapalnej *IL10/IL-10*. Doniesienia grupy badawczej Li i wsp. (2019) dowiodły, że hamowanie kaspazy-1 w mysim modelu MCAO wywołuje zmianę polaryzacji mikrogleju na przeciwzapalny „M2” i ogranicza odpowiedź immunologiczną poprzez obniżanie ekspresji czynników prozapalnych. Zatem można podejrzewać, że hamowanie stanu zapalnego mikrogleju przez amorfrutynę B, będzie ograniczać obszar uszkodzenia i promować regenerację tkanki mózgowej narażonej na niedotlenienie lub niedokrwienie. Istnieją dowody, że obecność rozgałęzionej formy mikrogleju świadczy o zahamowaniu jego aktywacji, czemu towarzyszą efekty neuroprotekcyjne w warunkach ekscytotoksyczności indukowanej przez substancję NMDA (Vinet i wsp., 2012). Postuluję, że zwiększenie stopnia rozgałęzienia oraz zmniejszenie powierzchni komórek mikrogleju przez amorfrutynę B ma bezpośredni związek z jej zdolnością do hamowania aktywacji mikrogleju w warunkach hipoksji oraz ischemii. Inni badacze wykazali, że substancje takie jak XQ-1H (pochodna ginkgolidu B), czy rhFGF21 (rekombinowany ludzki czynnik wzrostu fibroblastów 21) wpływają na zmianę fenotypu mikrogleju z prozapalnego na przeciwzapalny w sposób zależny od PPAR $\gamma$  i w ten sposób wywołują neuroprotekcję w eksperymentalnych modelach udaru niedokrwiennego mózgu (Liu R. i wsp., 2018; Dongxue i wsp., 2020). Podobne zmiany w szlaku sygnałowym PPAR $\gamma$  zaobserwowano w naszych badaniach, gdzie przeciwzapalnemu działaniu amorfrutyny B towarzyszył wzrost poziomu



receptora *PPARG/PPAR $\gamma$*  oraz czynnika *PGC1 $\alpha$* . Badania grupy Bouhrel i wsp. (2007) udowodniły, że aktywacja *PPAR $\gamma$*  w ludzkich monocytach indukuje przeciwzapalny fenotyp „M2”. W badaniach klinicznych zastosowanie agonistów *PPAR $\gamma$*  takich jak rozyglitazon czy pioglitazon usprawniało powrót do zdrowia pacjentów po udarze mózgu poprzez modulację utrzymującej się przez kolejne dni lub tygodnie odpowiedzi neurozapalnej (Lee i Reding, 2007). Co więcej, myszy z nadekspresją *PGC1 $\alpha$*  w komórkach mikrogleju wykazują zmniejszone deficyty neurologiczne w modelu MCAO (Han i wsp., 2021). Mając na uwadze powyższe fakty można przypuszczać, że w warunkach hipoksji oraz ischemii amorfrutyna B hamuje aktywację ludzkiego mikrogleju i ogranicza stan zapalny w sposób zależny od szlaku sygnałowego *PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$* .

### ***Potencjał proliferacyjny, aktywność metaboliczna i funkcja mitochondriów***

Chroniczny stan zapalny przyczynia się do szybkiej proliferacji oraz wzrostu aktywności metabolicznej mikrogleju, co wiąże się z odpowiedzią immunologiczną, fagocytozą uszkodzonych komórek i wpływem na ostateczną formę regeneracji tkanki mózgowej (Mander i wsp., 2006; Sapkota i wsp., 2017; Schmidt i wsp., 2021). Wyniki zaprezentowane w publikacji **Przepiórska-Drońska i wsp. (2024)**, która wchodzi w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, dostarczyły dowodów na zależne od *PPAR $\gamma$*  właściwości przeciwzapalne amorfrutyny B, a także wskazały na zdolność amorfrutyny B do obniżania potencjału proliferacyjnego mikrogleju w warunkach hipoksji oraz ischemii. Inni naukowcy dowiedli, że agoniści receptora *PPAR $\gamma$*  hamują proliferację mikrogleju i w ten sposób łagodzą stan zapalny mózgu (Lan i wsp., 2015; Cai i wsp., 2018). Ponadto rekombinowana ludzka erytropoetyna (rhEPO), która wykazuje neuroprotektoryjny potencjał w zwierzęcych modelach udaru mózgu, hamuje proliferację i aktywność metaboliczną mikrogleju, a w konsekwencji zmniejsza liczbę jego komórek w obszarze uszkodzenia (Fernandez Garcia-Agudo i wsp., 2021). Mając na uwadze fakt, że w warunkach hipoksji oraz ischemii populacja mikrogleju ulega dynamicznemu przemodelowaniu, w naszych badaniach amorfrutyna B przypuszczalnie ogranicza proliferację, co może służyć uzyskaniu homeostazy mikrogleju obserwowanej w warunkach fizjologicznych. Oprócz opisanych powyżej efektów działania amorfrutyny B, w pracy **Przepiórska-Drońska i wsp. (2024)** po raz pierwszy wykazano, że amorfrutyna B normalizuje aktywność metaboliczną i błonowy potencjał mitochondrialny mikrogleju oraz obniża poziom czynnika *BCL2/BCL2*. Inne badania dowodzą, że aktywacja mikrogleju przez LPS skutkuje wzrostem aktywności metabolicznej i proliferacją komórek (Schmidt

i wsp., 2021). W modelu immunoaktywacji przez IFN $\gamma$  wzrost reaktywności mikrogleju jest skorelowany ze zwiększeniem błonowego potencjału mitochondrialnego oraz nasileniem produkcji ROS (Akyuva i wsp., 2021). Wprawdzie czynnik BCL2 jest znany głównie ze swoich antyapoptotycznych właściwości, jego nowa niekanoniczna funkcja polega na bezpośredniej modulacji aktywności COX (oksydaza cytochromowa) i regulowaniu w ten sposób odpowiedzi mikrogleju na warunki stresowe (Chen i Pervaiz, 2010). Nadekspresja BCL2 w linii mieloidalnej prowadzi do znaczących zmian w ekspresji genów związanych z aktywnością metaboliczną, cyklem komórkowym i odpowiedzią immunologiczną (Askew i wsp., 2017). Z moich badań wynika, że amorfrutyna B obniża poziom białka BCL2 i ekspresję jego genu, a także zmniejsza aktywność metaboliczną/mitochondrialną oraz potencjał proliferacyjny mikrogleju. Na podstawie tych wyników można wnioskować, że amorfrutyna B hamuje reaktywność mikrogleju poprzez utrzymanie homeostazy metabolicznej i energetycznej komórek, zarówno w warunkach hipoksji, jak i ischemii. Na podstawie omówionych wyżej badań własnych sugeruję, że normalizacja funkcji mitochondriów oraz obniżenie aktywności metabolicznej w komórkach mikrogleju stanowi dodatkowy mechanizm działania amorfrutyny B. Reasumując, amorfrutyna B, oprócz opisanych wcześniej właściwości neuroprotektoryjnych, może hamować odpowiedź mikrogleju na hipoksję oraz ischemię. Specyficzne dla typu komórek mechanizmy działania amorfrutyny B mogą zostać wykorzystane w dalszej perspektywie do projektowania leków stosowanych w farmakoterapii chorób niedotlenieniowo-niedokrwiennych mózgu.

## PODSUMOWANIE

Podsumowanie zawiera weryfikację 3 hipotez badawczych przedstawionych na str. 21 rozprawy. Weryfikacja hipotez badawczych została poprzedzona opracowaniem modeli komórkowych hipoksji i ischemii w oparciu o pierwotne hodowle neuronów kory mózgowej myszy, a także komórki ludzkiego mikrogleju linii HMC3.

Neurony kory mózgowej w hodowli *in vitro* były poddawane hipoksji lub ischemii przez 6 godzin. Po tym czasie przywrócono im dostęp do tlenu i glukozy na okres 18 godzin, co miało za zadanie imitować warunki reoksygenacji/reperfuzji *in vivo* (opisowa część rozprawy doktorskiej, publikacja **Przepiórska i wsp., 2023**, publikacja **Przepiórska-Drońska i wsp., 2024**). Amorfrutyna B była podawana w pourazowym paradygmacie *post-treatment* tj. 6 godzin po zainicjowaniu hipoksji lub ischemii.

Komórki mikrogleju w hodowli *in vitro* były poddawane hipoksji lub ischemii przez 2 lub 6 godzin. Po tym czasie komórki miały przywrócony dostęp do tlenu i glukozy na okres odpowiednio 5 lub 18 godzin, co miało symulować warunki reoksygenacji/reperfuzji *in vivo* (publikacja **Przepiórska-Drońska i wsp., 2024**). Amorfrutyna B była podawana w pourazowym paradygmacie *post-treatment* tj. 2 lub 6 godzin po zainicjowaniu hipoksji lub ischemii.

### Opisowa część rozprawy doktorskiej

**Weryfikacja hipotezy: Amorfrutyna B chroni komórki nerwowe myszy przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją oraz ischemią poprzez zahamowanie stresu oksydacyjnego i zmianę statusu epigenetycznego neuronów, przy udziale ścieżki sygnałowej angażującej receptor PPAR $\gamma$ .**

**Wyniki, które potwierdzają, że w zastosowanych modelach *in vitro* hipoksja i ischemia wywołują szereg efektów obserwowanych w warunkach *in vivo*:**

a) Zarówno hipoksja, jak i ischemia wywołują stres oksydacyjny w komórkach nerwowych w pierwotnych hodowlach kory mózgowej myszy *in vitro*, co manifestuje się nasileniem

uwalniania ROS oraz wzrostem poziomu 8-OHdG, czyli markera uszkodzeń oksydacyjnych DNA/RNA.

b) Zarówno hipoksja, jak i ischemia wywołują zmiany w ekspresji mRNA i białka czynnika indukowanego hipoksją *Hif1a/HIF1 $\alpha$* , a także receptora *Pparg/PPAR $\gamma$* , jego koaktywatora (*Pgc1a/PGC1 $\alpha$* ) i aktywowanego przez niego czynnika (*Adipoq/ADIPOQ*) powodując:

- wzrost ekspresji mRNA i białka *Hif1a/HIF1 $\alpha$*  w hipoksji i ischemii
- wzrost ekspresji mRNA receptora *Pparg* w hipoksji i ischemii oraz wzrost poziomu białka PPAR $\gamma$  tylko w ischemii
- wzrost ekspresji mRNA *Pgc1a* w ischemii oraz mRNA *Adipoq* w hipoksji i ischemii.

c) Zarówno hipoksja, jak i ischemia wywołują uszkodzenie neuronów i zahamowanie wzrostu neurytów, co zostało uwidocznione barwieniem immunofluorescencyjnym specyficznym dla MAP2. Barwienie immunofluorescencyjne potwierdziło również występowanie PPAR $\gamma$  w neuronach oraz uwidocznilo cytoplazmatyczne rozmieszczenie tego receptora w warunkach hipoksji oraz ischemii. Ponadto, barwienie immunofluorescencyjne na obecność receptora PPAR $\gamma$  wykazało, że poziom tego białka nie zmienia się w warunkach hipoksji, ale rośnie w warunkach ischemii, co jest analogiczne do wyników uzyskanych metodami western blot i ELISA.

d) Zarówno hipoksja, jak i ischemia wywołują zmianę statusu epigenetycznego neuronów, co manifestuje się obniżeniem poziomu HAT w obydwu badanych modelach oraz zwiększonym poziomem sirtuin w modelu hipoksji.

**Wyniki potwierdzające słuszność hipotezy, w myśl której amorfrutyna B chroni komórki nerwowe myszy przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją oraz ischemią poprzez zahamowanie stresu oksydacyjnego i zmianę statusu epigenetycznego neuronów, przy udziale ścieżki sygnałowej angażującej receptor PPAR $\gamma$ :**

a) Amorfrutyna B hamuje wywołany hipoksją oraz ischemią stres oksydacyjny, czego przejawem jest zmniejszenie uwalniania ROS oraz obniżenie poziomu 8-OHdG.

b) Amorfrutyna B chroni komórki nerwowe przed uszkodzeniem hipoksyjno-ischemicznym za pośrednictwem receptora PPAR $\gamma$ ; wyciszenie ekspresji *Pparg* przy użyciu specyficznego siRNA znosi neuroprotekcyny efekt działania amorfrutyny B w komórkach kory mózgowej poddanych hipoksji i ischemii.

c) Amorfrutyna B wywołuje zmiany w ekspresji mRNA i/lub białka czynnika indukowanego hipoksją *Hif1a*/HIF1 $\alpha$ , a także receptora *Pparg*/PPAR $\gamma$  i jego koaktywatora (*Pgc1a*/PGC1 $\alpha$ ) powodując:

- obniżenie ekspresji czynnika indukowanego hipoksją *Hif1a*/HIF1 $\alpha$  w hipoksji
- wzrost poziomu białka receptora PPAR $\gamma$  w hipoksji oraz obniżenie ekspresji mRNA i białka *Pparg*/PPAR $\gamma$  w ischemii
- obniżenie ekspresji *Pgc1a* w hipoksji.

d) Analiza mikroskopowa barwienia immunofluorescencyjnego MAP2 sugeruje, że morfologia neuronów po podaniu amorfrutyny B jest zbliżona do tej z grupy kontrolnej. Pomiar natężenia sygnału immunofluorescencyjnego specyficznego dla PPAR $\gamma$  wskazał na neuronalną lokalizację receptora oraz potwierdził opisane wyżej zmiany w poziomie białka PPAR $\gamma$  stwierdzone na podstawie analiz western blot i ELISA. Pod wpływem amorfrutyny B poziom PPAR $\gamma$  wzrastał w hipoksji, natomiast malał w ischemii.

e) Amorfrutyna B zmienia status epigenetyczny neuronów narażonych na hipoksję i ischemię, czego dowodem jest wzrost poziomu HAT w obydwu stosowanych modelach oraz obniżenie poziomu sirtuin w modelu hipoksji.

## **Publikacja 1**

Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M. *Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation*. Mol Neurobiol. 2023 Feb;60(2):576-595. doi: 10.1007/s12035-022-03087-9.

**Weryfikacja hipotezy: Mechanizm neuroprotekcynnego działania amorfrutyny B obejmuje hamowanie apoptozy i autofagii oraz regulację profilu ekspresji szeregu miRNA.**

**Wyniki, które potwierdzają, że w zastosowanych modelach *in vitro* hipoksja i ischemia wywołują szereg efektów obserwowanych w warunkach *in vivo*:**

a) Zarówno hipoksja, jak i ischemia uszkadzają komórki nerwowe z udziałem procesów autofagii i apoptozy, ponieważ inhibitory skierowane na ścieżki sygnałowe tych procesów częściowo zredukowały poziom uwalnianego LDH, czyli ograniczyły związaną z hipoksją i ischemią śmierć komórek nerwowych.

b) Zarówno hipoksja, jak i ischemia nasilają formowanie autofagolizosomów, czyli struktur subkomórkowych biorących udział w końcowym etapie autofagii.

c) Hipoksja i ischemia wywołują zmiany w ekspresji mRNA i białka czynników zaangażowanych w proces autofagii powodując odpowiednio:

- wzrost ekspresji mRNA *Becn1*, *Atg5*, *Atg7*, *Map1lc3b*, *Nup62* i *Ambra1* w obydwu badanych modelach oraz zwiększenie poziomu białka BECN1 w ischemii.

d) W wyniku hipoksji i ischemii dochodzi do hipometylacji obszarów promotorowych genów *Becn1*, *Atg7*, *Map1lc3b* i *Ambra1*, co koresponduje ze wzrostem ekspresji tych genów w obydwu badanych modelach.

e) Zarówno hipoksja, jak i ischemia wywołują dysfunkcję mitochondriów i apoptozę poprzez obniżenie błonowego potencjału mitochondrialnego komórek nerwowych oraz tworzenie skupisk heterochromatyny.

f) W wyniku hipoksji i ischemii dochodzi do zmian w ekspresji mRNA i białka czynników zaangażowanych w proces apoptozy powodując odpowiednio:

- w modelu hipoksji: wzrost ekspresji genów i poziomu białek zaangażowanych w procesy proapoptotyczne tj. *Fas/FAS*, *FASL*, *Bax/BAX* i *GSK3β*, a także antyapoptotycznego czynnika *BCL2*
- w modelu ischemii: wzrost ekspresji genów i poziomu białek zaangażowanych w procesy proapoptotyczne tj. *Fas/FAS*, *FASL*, *Bax/BAX* i *Gsk3b/GSK3β*, a także antyapoptotycznego czynnika *Bcl2/BCL2*.

g) W wyniku hipoksji i ischemii dochodzi do hipometylacji obszaru promotorowego genu *Bax*, co koresponduje ze wzrostem ekspresji tego genu w obydwu badanych modelach. Odwrotna korelacja między poziomem metylacji tego genu, a poziomem kodowanego przez nie białka sugeruje mechanizm epigenetyczny, wpływający na jego ekspresję.

h) Zarówno hipoksja, jak i ischemia zaburzają ekspresję miRNA związanych z apoptozą, co dostarcza informacji na temat nowych mechanizmów molekularnych, potencjalnych markerów i celów terapeutycznych stosowanych w nowoczesnej farmakoterapii chorób niedotlenieniowo- niedokrwiennych mózgu.

**Wyniki potwierdzające słuszność hipotezy, w myśl której mechanizm neuroprotekcynego działania amorfrutyny B obejmuje hamowanie apoptozy i autofagii oraz regulację profilu ekspresji szeregu miRNA:**

a) Amorfrutyna B hamuje formowanie autofagolizosomów, co może chronić komórki nerwowe przed uszkodzeniem spowodowanym nadmierną aktywacją autofagii i degradacją neuronów w wyniku hipoksji i ischemii.

b) Wyciszenie ekspresji *Becn1* lub *Atg7* z użyciem specyficznych siRNA znosi neuroprotekcynny efekt działania amorfrutyny B, co dowodzi zaangażowania badanych ścieżek

sygnałowych w ochronną aktywność amorfrutyny B wobec uszkodzeń spowodowanych hipoksją (*Becn1* i *Atg7*) i ischemią (*Becn1*).

c) Amorfrutyna B wywołuje zmiany w ekspresji mRNA i białka czynników zaangażowanych w proces autofagii powodując odpowiednio:

- w modelu hipoksji: obniżenie ekspresji *Becn1*, *Nup62* i *Ambra1*
- w modelu ischemii: wzrost ekspresji genu *Atg5* oraz białek MAP1LC3B i AMBRA1

d) Amorfrutyna B wpływa na status epigenetyczny komórek nerwowych poprzez hipermetylację obszarów promotorowych genów *Becn1*, *Atg7* i *Map1lc3b*, co koresponduje jedynie ze spadkiem ekspresji *Becn1* pod wpływem działania amorfrutyny B w warunkach hipoksyjnych.

e) Amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją i ischemią dysfunkcję mitochondriów oraz apoptozę, czego przejawem jest wzrost błonowego potencjału mitochondrialnego komórek nerwowych oraz ograniczenie formowania skupisk heterochromatyny.

f) Amorfrutyna B wywołuje zmiany w ekspresji mRNA i białka czynników zaangażowanych w proces apoptozy powodując odpowiednio:

- w modelu hipoksji: obniżenie ekspresji genów i poziomu białka czynników proapoptotycznych takich jak *Bax/BAX*, *Gsk3b/GSK3β*, FAS, FASL oraz wzrost poziomu antyapoptotycznego białka BCL2
- w modelu ischemii: obniżenie ekspresji genów i poziomu białka *Bcl2*, *Fas/FAS*, FASL, BAX i GSK3β oraz wzrost poziomu białka BCL2.

g) Amorfrutyna B wywołuje hipometylację obszaru promotorowego genu *Bcl2* w hipoksji oraz hipermetylację obszaru promotorowego genu *Bax* w ischemii. Odwrotna korelacja między poziomem metylacji tych genów, a poziomem kodowanych przez nie białek sugeruje mechanizm epigenetyczny regulujący ich ekspresję.



h) Amorfrutyna B normalizuje ekspresję związanych z apoptozą miRNA (51 miRNA w hipoksji i 22 miRNA w ischemii), które zostały sklasyfikowane jako markery apoptozy lub udaru mózgu. Identyfikacja powyższych miRNA sugeruje potencjał terapeutyczny amorfrutyny B, zwłaszcza w odniesieniu do ścieżek sygnałowych aktywowanych hipoksją i ischemią.

## **Publikacja 2**

Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

**Weryfikacja hipotezy: Amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją oraz ischemią aktywację komórek ludzkiego mikrogleju, głównie poprzez wyciszenie procesów zapalnych, hamowanie potencjału proliferacyjnego i aktywności metabolicznej komórek.**

**Wyniki, które potwierdzają, że w zastosowanych modelach *in vitro* hipoksja i ischemia wywołują szereg efektów obserwowanych w warunkach *in vivo*:**

a) Barwienie immunofluorescencyjne z wykorzystaniem przeciwciała IBA1 i mikroskopia konfokalna potwierdziły ekspresję IBA1 w komórkach ludzkiej linii mikrogleju HMC3. Wzrost poziomu IBA1 wskazuje na aktywację mikrogleju pod wpływem hipoksji i ischemii.

b) W paradygmacie czasowym 6+18 godzin nie zaobserwowano zmian w poziomie kaspazy-1. Spodziewane zmiany zostały jednak uchwycone po 2-godzinnej hipoksji lub ischemii oraz 5-godzinnej reoksygenacji komórek/przywróceniu dostępu do glukozy. W tym paradygmacie zarówno hipoksja, jak i ischemia wywołują wzrost poziomu kaspazy-1, która jest markerem procesu zapalnego.

c) Hipoksja i ischemia wywołują aktywację i stan zapalny mikrogleju, co zostało potwierdzone poprzez:

- wzrost ekspresji prozapalnych markerów *IL1B* w hipoksji oraz *TNFA* w obydwu badanych modelach
- brak ekspresji mRNA przeciwzapalnego markera, jakim jest *IL10*, a także obniżenie poziomu białka IL-10 w hipoksji i ischemii.

d) Nasileniu procesów zapalnych mikrogleju podczas hipoksji i ischemii towarzyszy obniżenie ekspresji genu *PPARG* oraz zmniejszenie poziomu białka PPAR $\gamma$  i jego koaktywatora PGC1 $\alpha$ . Powyższe wyniki sugerują, że szlak sygnałowy PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$  może stanowić potencjalny cel terapeutyczny służący hamowaniu aktywacji mikrogleju.

e) Zarówno hipoksja, jak i ischemia zwiększają aktywność metaboliczną komórek mikrogleju, a także wpływają na funkcjonowanie mitochondriów. Manifestuje się to poprzez zwiększenie błonowego potencjału mitochondrialnego oraz wzrost ekspresji czynnika *BCL2/BCL2*, który kontroluje integralność zewnętrznej błony mitochondrialnej.

f) W wyniku hipoksji i ischemii następuje aktywacja mikrogleju, czego dowodzi wzrost potencjału proliferacyjnego komórek mierzony parametrem BrdU. Brak zmian w liczbie jąder komórkowych, niezależnie od zastosowanego modelu doświadczalnego pozwala przypuszczać, że hipoksja i ischemia nie wpływają jednak na liczebność komórek mikrogleju.

g) Barwienie z wykorzystaniem kalceiny AM i analiza fraktalna wykazały, że hipoksja i ischemia zmieniają morfologię komórek mikrogleju z przeciwzapalnego fenotypu „M2” na prozapalny fenotyp „M1”. Przekształcenie formy rozgałęzionej w ameboidalną manifestuje się zmniejszeniem stopnia rozgałęzienia, a także zwiększeniem ogólnej powierzchni komórek i najkrótszej odległości pomiędzy dwoma punktami, które leżą na przeciwległych stronach otoczki wypukłej komórki.

**Wyniki potwierdzające słuszność hipotezy, w myśl której amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją oraz ischemią aktywację komórek ludzkiego mikrogleju, głównie poprzez wyciszenie procesów zapalnych, hamowanie potencjału proliferacyjnego i aktywności metabolicznej komórek:**

a) Barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciała IBA1 i mikroskopia konfokalna potwierdziły ekspresję IBA1 przez komórki ludzkiej linii mikrogleju. Obniżenie poziomu IBA1

po podaniu amorfrutny B wskazuje na hamowanie wywołanej hipoksją i ischemią aktywacji mikrogleju.

b) W najczęściej stosowanym paradygmacie czasowym, tj. 6+18 godzin, podanie amorfrutyny B obniża poziom prozapalnego markera, jakim jest kaspaza-1, ale tylko w warunkach ischemicznych. Natomiast w skróconym paradygmacie czasowym, tj. 2+5 godzin, amorfrutyna B obniża poziom kaspazy-1, zarówno w warunkach hipoksyjnych, jak i ischemicznych.

c) Amorfrutyna B hamuje stan zapalny mikrogleju, na co wskazuje:

- obniżenie ekspresji prozapalnych markerów *IL1B/IL-1β* w obydwu badanych modelach oraz *TNFA* w modelu hipoksji
- stymulacja ekspresji i/lub wzrost poziomu białka przeciwzapalnego markera *IL10/IL-10* zarówno w hipoksji, jak i ischemii.

d) Przeciwwzapalnym efektem działania amorfrutyny B towarzyszy zwiększenie ekspresji *PPARG* oraz poziomu białka *PGC1α* w obydwu badanych modelach, a także wzrost poziomu białka receptora *PPARγ* w modelu hipoksji.

e) Amorfrutyna B normalizuje aktywność metaboliczną (MTT), a częściowo także błonowy potencjał mitochondrialny (JC-1) w obydwu badanych modelach. Substancja ta wpływa na funkcjonowanie mitochondriów poprzez obniżenie ekspresji genu i poziomu białka *BCL2/BCL2*, czyli kluczowego czynnika w regulacji procesów mitochondrialnych.

f) Amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją i ischemią aktywację mikrogleju poprzez obniżenie potencjału proliferacyjnego komórek (BrdU), nie wpływając przy tym na ich liczebność ocenioną na podstawie liczby jąder komórkowych wyznakowanych barwnikiem Hoechst 33342.

g) Barwienie z wykorzystaniem kalceiny AM i analiza fraktalna wykazały, że podanie amorfrutyny B po 6 godzinach od hipoksji/ischemii zmienia morfologię komórek mikrogleju z prozapalnego fenotypu „M1” na przeciwzapalny fenotyp „M2”. Przejawia się to zmianą

kształtu komórek z formy ameboidalnej do formy bardziej rozgałęzionej, czyli przypominającej komórki z grupy kontrolnej. Dowodem na zmianę morfologii mikrogleju pod wpływem amorfrutyny B jest zwiększenie stopnia rozgałęzienia, a także zmniejszenie ogólnej powierzchni komórek i najkrótszej odległości pomiędzy dwoma punktami, które leżą na przeciwległych stronach otoczki wypukłej komórki.

**Dodatkowe wyniki potwierdzające słuszność hipotezy, w myśl której amorfrutyna B chroni komórki nerwowe myszy przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją oraz ischemią przy udziale ścieżki sygnałowej angażującej receptor PPAR $\gamma$ :**

a) Dodatkowe analizy wykonane na komórkach nerwowych poddanych 6-godzinnej hipoksji lub ischemii potwierdziły, że amorfrutyna B zwiększa przeżywalność komórek nerwowych. Łączne podanie amorfrutyny B i antagonisty receptora PPAR $\gamma$  (GW9662) spowodowało wzrost poziomu neurodegeneracji, co potwierdza zaangażowanie PPAR $\gamma$  w neuroprotekcyjne działanie tej substancji.

Wyniki uzyskane w ramach omawianej w publikacji pozwalają przypuszczać, że właściwości neuroprotekcyjne amorfrutyny B oraz jej zdolność do hamowania aktywacji mikrogleju może być podstawą przyszłej farmakoterapii uszkodzeń niedotleniowo-niedokrwienych mózgu.

## WNIOSKI

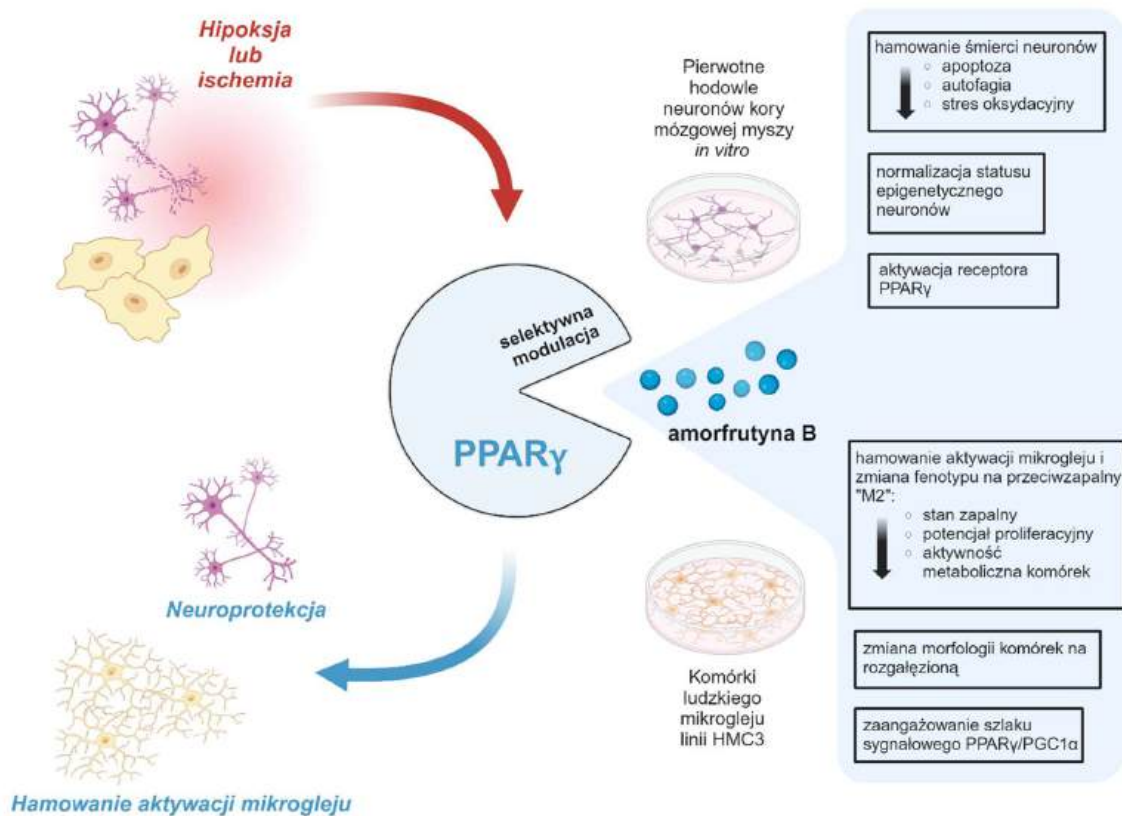
Badania zawarte w opisowej części rozprawy doktorskiej (na podstawie publikacji **Wnuk, Przepiórska i wsp., 2021; *Biomedicines***) i w publikacjach (**Przepiórska i wsp., 2023; *Molecular Neurobiology***; **Przepiórska-Drońska i wsp., 2024; *Journal of Neuroimmune Pharmacology***) dowodzą, że:

- I. Modele hipoksji i ischemii opracowane w oparciu o pierwotne komórki nerwowe myszy w hodowli *in vitro* odzwierciedlają komórkowe i molekularne mechanizmy towarzyszące śmierci neuronów w wyniku niedotlenienia lub niedokrwienia mózgu *in vivo*. Zidentyfikowane mechanizmy obejmują procesy apoptotyczne, autofagię oraz stres oksydacyjny. Ich zrozumienie może mieć kluczowe znaczenie w opracowaniu nowej farmakoterapii i leków neuroprotekcyjnych precyzyjnie oddziałujących na patomechanizmy chorób niedotlenieniowo-niedokrwiennych mózgu.
- II. Amorfrutyna B będąca selektywnym modulatorem receptora PPAR $\gamma$  chroni komórki nerwowe myszy przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją oraz ischemią przy udziale mechanizmu angażującego receptor PPAR $\gamma$ . Neuroprotekcyjne efekty działania tej substancji są obserwowane nawet po 6 godzinach od zainicjowania uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego. Wskazuje to na szerokie okno terapeutyczne amorfrutyny B oraz potencjał selektywnych modulatorów receptora PPAR $\gamma$  do ochrony komórek nerwowych przed neurodegeneracją.
- III. Mechanizm neuroprotekcyjnego działania amorfrutyny B w warunkach hipoksji i ischemii polega na hamowaniu procesów zaangażowanych w patofizjologię niedotlenienia i niedokrwienia mózgu, czyli apoptozy, autofagii oraz stresu oksydacyjnego. Ponadto amorfrutyna B wykazuje cechy modulatora epigenetycznego, ponieważ ma zdolność do podwyższania poziomu acetylotransferaz histonowych, obniżania poziomu sirtuin, regulacji poziomu metylacji genów zaangażowanych w procesy apoptozy i autofagii oraz normalizacji ekspresji miRNA będących markerami udaru niedokrwienego mózgu.

- IV. Opracowane na komórkach mikrogleju modele hipoksji i ischemii *in vitro* odzwierciedlają komórkowe i molekularne mechanizmy towarzyszące aktywacji mikrogleju obserwowanej w warunkach niedotlenienia lub niedokrwienia mózgu *in vivo*. Obejmują one przekształcenie fenotypu na prozapalny „M1”, który manifestuje się nasilonymi procesami zapalnymi, ameboidalną morfologią komórek, a także wzrostem potencjału proliferacyjnego i aktywności metabolicznej mikrogleju. Poznanie mechanizmów odpowiedzi mikrogleju na warunki hipoksyjno-ischemiczne może mieć istotne znaczenie dla identyfikacji substancji o potencjale przeciwzapalnym, których zdolność do modulowania fenotypu mikrogleju może zostać wykorzystana do potęgowania efektu neuroprotekcijnego.
- V. Amorfrutyna B hamuje aktywację mikrogleju i zmienia fenotyp komórek na przeciwzapalny „M2”. Mechanizm ten opiera się na osłabieniu procesów zapalnych w sposób zależny od receptora PPAR $\gamma$ , zmianie morfologii komórek na bardziej rozgałęziony fenotyp, a także hamowaniu potencjału proliferacyjnego i aktywności metabolicznej mikrogleju. Modulacja aktywności mikrogleju przez substancję neuroprotekcijną, jaką jest amorfrutyna B, może mieć kluczowe znaczenie dla opracowania nowych terapii skutecznych w leczeniu niedotlenienia i niedokrwienia mózgu. Nowa farmakoterapia z użyciem selektywnych modulatorów receptora PPAR $\gamma$  mogłaby ograniczać szkodliwe procesy zapalne, a jednocześnie promować ochronę neuronów.

## WNIOSKI KOŃCOWE

1. Badania objęte obecną rozprawą doktorską pozwoliły zidentyfikować mechanizmy działania amorfrutyny B w odniesieniu do neuronów i komórek mikrogleju narażonych na hipoksję i ischemię; amorfrutyna B wykazuje silne działanie neuroprotektcyjne, nawet jeśli została podana 6 godzin po zainicjowaniu uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego, oraz zależne od mikrogleju działanie przeciwzapalne.
2. Neuroprotektyjne efekty działania amorfrutyny B są realizowane poprzez hamowanie procesów apoptozy, autofagii i stresu oksydacyjnego, a także za pośrednictwem receptora PPAR $\gamma$  i zmian statusu epigenetycznego neuronów. Natomiast przeciwzapalne efekty działania amorfrutyny B obejmują hamowanie aktywacji mikrogleju, które manifestuje się poprzez zmianę jego fenotypu na przeciwzapalny „M2” oraz obniżanie potencjału proliferacyjnego i aktywności metabolicznej komórek.
3. Wykazane w obecnej rozprawie doktorskiej neuroprotektyjne i przeciwzapalne właściwości amorfrutyny B stanowią silną przesłankę do wykorzystania amorfrutyny B jako substancji modelowej do opracowania nowych farmakoterapii udarów mózgu, które będą oddziaływać na różne typy komórek i posiadać szerokie okno terapeutyczne. W dalszej perspektywie, moje badania mogą poprawić farmakoterapię chorób układu nerwowego, w tym niedotleniowo-niedokrwienych uszkodzeń mózgu i pomóc w identyfikacji nowych celów terapeutycznych opartych na selektywnej modulacji receptora PPAR $\gamma$ .



**Rys. 5 - Amorfrutyna B podana po 6 godzinach od wywołania hipoksji lub ischemii chroni komórki nerwowe przed uszkodzeniem i hamuje aktywację mikrogleju. Schemat wykonano przy użyciu BioRender.**



## **STRESZCZENIE**

Każdego roku 12,2 miliona osób na świecie doświadcza udaru mózgu, co czyni go drugą najczęstszą przyczyną zgonów. Obecna farmakoterapia udaru niedokrwionego obejmuje trombolizę z rtPA, która musi być zaaplikowana w ciągu 4,5 godziny od wystąpienia objawów. Równie istotnym problemem dla współczesnej medycyny jest asfiksja okołoporodowa (niedotlenienie okołoporodowe), której rocznie doświadczają 4 miliony noworodków. Mimo terapii opartej na hipotermii z oknem terapeutycznym wynoszącym do 6 godzin, śmiertelność wciąż utrzymuje się na poziomie 25%. Ze względu na niską efektywność, wąskie okno terapeutyczne oraz szereg przeciwwskazań do stosowania obecnych terapii, wciąż trwają poszukiwania nowych strategii leczenia schorzeń hipoksyjno-ischemicznych mózgu. Interesującym punktem uchwytu dla nowych leków okazał się receptor aktywowany przez proliferatory peroksydomów typu gamma (PPAR $\gamma$ ). Agoniści PPAR $\gamma$ , tiazolidinediony (TZD), wykazują neuroprotektoryjne działanie w leczeniu chorób ośrodkowego układu nerwowego. Niestety, wywołują one również poważne skutki uboczne, co doprowadziło do częściowego wycofania TZD z rynku farmaceutycznego. Z dostępnych danych wynika, że w odróżnieniu od agonistów, selektywne modulatory receptora PPAR $\gamma$  (SPPAR $\gamma$ M), takie jak amorfrutyna B, wywołują częściową odpowiedź transkrypcyjną i mogą być bezpieczną alternatywą dla tradycyjnie stosowanych TZD. Zatem koncepcja moich badań zakłada, że selektywna modulacja PPAR $\gamma$  przez amorfrutynę B może stanowić nowatorskie podejście do leczenia uszkodzeń układu nerwowego wywołanych hipoksją lub ischemią.

W celu określenia neuroprotektoryjnych mechanizmów działania tej substancji i zależnego od mikrogleju potencjału przeciwzapalnego, wykorzystałam pierwotne hodowle neuronów kory mózgowej myszy, a także komórki ludzkiego mikrogleju linii HMC3, które były poddawane niedotlenieniu (model hipoksji), względnie niedotlenieniu z deprivacją glukozy (model ischemii). Dowiodłam, że amorfrutyna B podana 6 godzin po zainicjowaniu uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego wykazuje silne działanie neuroprotektoryjne oraz działanie przeciwzapalne zależne od mikrogleju. Amorfrutyna B chroni komórki nerwowe przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją oraz ischemią poprzez aktywację receptora PPAR $\gamma$  oraz zmniejszenie stresu oksydacyjnego i zależnych od wolnych rodników uszkodzeń DNA. Neuroprotektoryjne efekty działania amorfrutyny B obejmują także hamowanie wywołanej hipoksją i ischemią apoptozy i autofagii, co manifestuje się wzrostem błonowego potencjału mitochondrialnego, ograniczeniem formowania autofagolizosomów i apoptotycznych skupisk heterochromatyny oraz normalizacją ekspresji genów i/lub białek związanych z apoptozą

i autofagią. Amorfrutyna B reguluje poziom metylacji obszarów promotorowych genów zaangażowanych w procesy apoptozy i autofagii, co sugeruje że amorfrutyna B wywołuje efekt neuroprotekcyny z udziałem mechanizmów epigenetycznych. Substancja ta wykazuje cechy modulatora epigenetycznego, ponieważ w warunkach hipoksyjno-ischemicznych podwyższa poziom acetylotransferaz histonowych (HAT), obniża poziom sirtuin oraz normalizuje ekspresję miRNA będących markerami udaru niedokrwienego mózgu. Na ostatnim etapie badań wykazałam, że amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją i ischemią aktywację mikrogleju, a także przekształca fenotyp komórek z prozapalnego „M1” na przeciwzapalny „M2”. Ściślej ujmując, amorfrutyna B wycisza procesy zapalne, zmienia morfologię komórek mikrogleju na bardziej rozgałęziony fenotyp, jak również hamuje potencjał proliferacyjny i aktywność metaboliczną mikrogleju. Zmianom tym towarzyszy wzrost ekspresji receptora PPAR $\gamma$  i jego koaktywatora PGC1 $\alpha$ , co sugeruje zaangażowanie tych ścieżek sygnałowych w przeciwzapalne właściwości badanej substancji.

Wykazane w obecnej rozprawie doktorskiej neuroprotekcjne i przeciwzapalne właściwości amorfrutyny B stanowią silną przesłankę do wykorzystania amorfrutyny B jako substancji modelowej do opracowania nowych farmakoterapii udarów mózgu, które będą oddziaływać na różne typy komórek i posiadać szerokie okno terapeutyczne. W dalszej perspektywie, moje badania mogą przyczynić się do poprawy farmakoterapii chorób układu nerwowego i pomóc w identyfikacji nowych celów terapeutycznych opartych na selektywnej modulacji receptora PPAR $\gamma$ .

## **SUMMARY**

Each year, 12.2 million people worldwide experience a stroke, making it the second most common cause of death. The current pharmacotherapy for ischemic stroke involves thrombolysis with rtPA, which must be administered within 4.5 hours of symptom onset. Another significant challenge for modern medicine is perinatal asphyxia, which affects 4 million newborns annually. Despite the use of hypothermia, which has a therapeutic window up to 6 hours, the mortality rate of newborns remains 25%. Due to the low effectiveness, narrow therapeutic window, and contraindications associated with the use of current therapies, there is a need for new strategies to treat hypoxic-ischemic brain damage. An interesting target for new drugs is the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). PPAR $\gamma$  agonists, thiazolidinediones (TZDs), show neuroprotective effects in the treatment of central nervous system disorders. Unfortunately, they also cause severe side effects, leading

to the partial withdrawal of TZDs from the pharmaceutical market. Available data suggest that, unlike full PPAR $\gamma$  agonists, selective PPAR $\gamma$  modulators (SPPAR $\gamma$ Ms), such as amorfrutin B, induce a partial transcriptional response and may be a safer alternative to traditionally used TZDs. Therefore, the concept of my research assumes that selective modulation of PPAR $\gamma$  by amorfrutin B could represent a novel approach to treat neurodegeneration caused by hypoxia or ischemia.

To determine the neuroprotective mechanisms of action of this substance and its microglia-dependent anti-inflammatory potential, the primary cultures of mouse cortical neurons as well as human microglial HMC3 cells were subjected to oxygen deprivation (hypoxic model) or oxygen and glucose deprivation (ischemic model). I demonstrated that amorfrutin B, administered 6 hours after the onset of hypoxic-ischemic injury, exhibits strong neuroprotective effects and microglia-dependent anti-inflammatory action. Amorfrutin B protects neuronal cells from hypoxia- and ischemia-induced damage by activating the PPAR $\gamma$  receptor and reducing oxidative stress and free radical-dependent DNA damage. The neuroprotective effects of amorfrutin B also include the inhibition of hypoxia- and ischemia-induced apoptosis and autophagy, manifested by an increase in mitochondrial membrane potential, a reduction in autophagolysosome formation and apoptotic heterochromatin foci, and normalization of the expression of genes and/or proteins associated with apoptosis and autophagy. Amorfrutin B regulates the methylation levels of promoter regions of genes involved in apoptosis and autophagy processes, suggesting that this substance exerts its neuroprotective effect through epigenetic mechanisms. Amorfrutin B exhibits characteristics of an epigenetic modulator, as it increases the levels of histone acetyltransferases (HAT), decreases sirtuin levels, and normalizes the expression of miRNAs that are markers of ischemic stroke in hypoxic-ischemic conditions. In the final stage of the research, I showed that amorfrutin B inhibits hypoxia- and ischemia-induced microglial activation and transforms the cell phenotype from pro-inflammatory “M1” to anti-inflammatory “M2.” More specifically, amorfrutin B suppresses inflammatory processes, changes microglial cell morphology to a more branched phenotype, and inhibits the proliferative potential and metabolic activity of microglia. These changes are accompanied by increased expression of the PPAR $\gamma$  receptor and its coactivator PGC1 $\alpha$ , suggesting the involvement of these signaling pathways in the anti-inflammatory properties of the studied substance.

The neuroprotective and anti-inflammatory properties of amorfrutin B demonstrated in this doctoral dissertation provide strong evidence for using amorfrutin B as a model substance for developing new stroke pharmacotherapies that target various cell types and possess a wide therapeutic window. In the longer term, my research may improve the pharmacotherapy of nervous system diseases and help identifying new therapeutic targets based on the selective modulation of the PPAR $\gamma$  receptor.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, 19(5), 557–566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>
2. Ahn, C. H., & Lim, S. (2019). Effects of Thiazolidinedione and New Antidiabetic Agents on Stroke. *Journal of stroke*, 21(2), 139–150. <https://doi.org/10.5853/jos.2019.00038>
3. Air, E. L., & Kissela, B. M. (2007). Diabetes, the metabolic syndrome, and ischemic stroke: epidemiology and possible mechanisms. *Diabetes care*, 30(12), 3131–3140. <https://doi.org/10.2337/dc06-1537>
4. Ajoolabady, A., Wang, S., Kroemer, G., Penninger, J. M., Uversky, V. N., Pratico, D., Henninger, N., Reiter, R. J., Bruno, A., Joshipura, K., Aslkhodapasandhokmabad, H., Klionsky, D. J., & Ren, J. (2021). Targeting autophagy in ischemic stroke: From molecular mechanisms to clinical therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 225, 107848. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107848>
5. Akyuva, Y., Nazırođlu, M., & Yıldızhan, K. (2021). Selenium prevents interferon-gamma induced activation of TRPM2 channel and inhibits inflammation, mitochondrial oxidative stress, and apoptosis in microglia. *Metabolic brain disease*, 36(2), 285–298. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00624-0>
6. Alrabghi, L., Alnemari, R., Aloteebi, R., Alshammari, H., Ayyad, M., Al Ibrahim, M., Alotayfi, M., Bugshan, T., Alfaiifi, A., & Aljuwayd, H. (2018). Stroke types and management. *International Journal Of Community Medicine And Public Health*, 5(9), 3715–3719. <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20183439>
7. Anthony, S., Cabantan, D., Monsour, M., & Borlongan, C. V. (2022). Neuroinflammation, Stem Cells, and Stroke. *Stroke*, 53(5), 1460–1472. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.036948>

8. Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., Tipton, T., Chapman, M. A., Riecken, K., Beccari, S., Sierra, A., Molnár, Z., Cragg, M. S., Garaschuk, O., Perry, V. H., & Gomez-Nicola, D. (2017). Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell reports*, 18(2), 391–405. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041>
9. Baek, M., Yoo, E., Choi, H. I., An, G. Y., Chai, J. C., Lee, Y. S., Jung, K. H., & Chai, Y. G. (2021). The BET inhibitor attenuates the inflammatory response and cell migration in human microglial HMC3 cell line. *Scientific reports*, 11(1), 8828. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87828-1>
10. Balint, B. L., & Nagy, L. (2006). Selective modulators of PPAR activity as new therapeutic tools in metabolic diseases. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 6(1), 33–43. <https://doi.org/10.2174/187153006776056620>
11. Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
12. Bauerfeld, C. P., Rastogi, R., Pirockinaite, G., Lee, I., Hüttemann, M., Monks, B., Birnbaum, M. J., Franchi, L., Nuñez, G., & Samavati, L. (2012). TLR4-mediated AKT activation is MyD88/TRIF dependent and critical for induction of oxidative phosphorylation and mitochondrial transcription factor A in murine macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(6), 2847–2857. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102157>
13. Bernardo, A., Levi, G., & Minghetti, L. (2000). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. *The European journal of neuroscience*, 12(7), 2215–2223. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00110.x>
14. Bhatti, A., & Kumar, P. (2014). Systemic effects of perinatal asphyxia. *Indian journal of pediatrics*, 81(3), 231–233. <https://doi.org/10.1007/s12098-013-1328-9>
15. Bouhrel, M. A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dièvert, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., Staels, B., & Chinetti-Gbaguidi, G. (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell metabolism*, 6(2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.06.010>
16. Bourget, C., Adams, K. V., & Morshead, C. M. (2022). Reduced microglia activation following metformin administration or microglia ablation is sufficient to prevent

- functional deficits in a mouse model of neonatal stroke. *Journal of neuroinflammation*, 19(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02487-x>
17. Bustelo, M., Barkhuizen, M., van den Hove, D. L. A., Steinbusch, H. W. M., Bruno, M. A., Loidl, C. F., & Gavilanes, A. W. D. (2020). Clinical Implications of Epigenetic Dysregulation in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Frontiers in neurology*, 11, 483. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00483>
  18. Butler, P. M., & Chiong, W. (2019). Neurodegenerative disorders of the human frontal lobes. *Handbook of clinical neurology*, 163, 391–410. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804281-6.00021-5>
  19. Cai, W., Yang, T., Liu, H., Han, L., Zhang, K., Hu, X., Zhang, X., Yin, K. J., Gao, Y., Bennett, M. V. L., Leak, R. K., & Chen, J. (2018). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ): A master gatekeeper in CNS injury and repair. *Progress in neurobiology*, 163-164, 27–58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.002>
  20. Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischaemic stroke. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 70. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
  21. Chamorro, Á., Dirnagl, U., Urra, X., & Planas, A. M. (2016). Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet. Neurology*, 15(8), 869–881. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00114-9)
  22. Chen, C., Wu, Y., Chen, Y., & Du, L. (2015). Isolation and purification of prenylated phenolics from *Amorpha fruticosa* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of separation science*, 38(16), 2924–2929. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500224>
  23. Chen, C., Xue, Y., Li, Q. M., Wu, Y., Liang, J., & Qing, L. S. (2018). Neutral Loss Scan - Based Strategy for Integrated Identification of Amorfrutin Derivatives, New Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists, from *Amorpha fruticosa* by UPLC-QqQ-MS/MS and UPLC-Q-TOF-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(4), 685–693. <https://doi.org/10.1007/s13361-018-1891-4>
  24. Chen, J., Graham, S. H., Nakayama, M., Zhu, R. L., Jin, K., Stetler, R. A., & Simon, R. P. (1997). Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17(1), 2–10. <https://doi.org/10.1097/00004647-199701000-00002>

25. Chen, Z. X., & Pervaiz, S. (2010). Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell death and differentiation*, 17(3), 408–420. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.132>
26. Chen, Z. X., Xu, Q. Q., Shan, C. S., Shi, Y. H., Wang, Y., Chang, R. C., & Zheng, G. Q. (2019). Borneol for Regulating the Permeability of the Blood-Brain Barrier in Experimental Ischemic Stroke: Preclinical Evidence and Possible Mechanism. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 2936737. <https://doi.org/10.1155/2019/2936737>
27. Cheng, D., Gao, H., & Li, W. (2018). Long-term risk of rosiglitazone on cardiovascular events - a systematic review and meta-analysis. *Endokrynologia Polska*, 69(4), 381–394. <https://doi.org/10.5603/EP.a2018.0036>
28. Choi, D. H., Choi, I. A., & Lee, J. (2022). The Role of DNA Methylation in Stroke Recovery. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10373. <https://doi.org/10.3390/ijms231810373>
29. Choi, I. A., Lee, C. S., Kim, H. Y., Choi, D. H., & Lee, J. (2018). Effect of Inhibition of DNA Methylation Combined with Task-Specific Training on Chronic Stroke Recovery. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms19072019>
30. Choi, S. S., Park, J., & Choi, J. H. (2014). Revisiting PPAR $\gamma$  as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB reports*, 47(11), 599–608. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.11.174>
31. Cholewa-Waclaw, J., Bird, A., von Schimmelmann, M., Schaefer, A., Yu, H., Song, H., Madabhushi, R., & Tsai, L. H. (2016). The Role of Epigenetic Mechanisms in the Regulation of Gene Expression in the Nervous System. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(45), 11427–11434. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2492-16.2016>
32. Ciancarelli, I., Morone, G., Iosa, M., Cerasa, A., Calabrò, R. S., Iolascon, G., Gimigliano, F., Tonin, P., & Tozzi Ciancarelli, M. G. (2022). Influence of Oxidative Stress and Inflammation on Nutritional Status and Neural Plasticity: New Perspectives on Post-Stroke Neurorehabilitative Outcome. *Nutrients*, 15(1), 108. <https://doi.org/10.3390/nu15010108>
33. Clausen, B. H., Wirenfeldt, M., Høgedal, S. S., Frich, L. H., Nielsen, H. H., Schrøder, H. D., Østergaard, K., Finsen, B., Kristensen, B. W., & Lambertsen, K. L. (2020). Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic

- stroke. *Acta neuropathologica communications*, 8(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00957-y>
34. Cornette L. (2012). Therapeutic hypothermia in neonatal asphyxia. Facts, views & vision in ObGyn, 4(2), 133–139.
  35. Corti, O., Blomgren, K., Poletti, A., & Beart, P. M. (2020). Autophagy in neurodegeneration: New insights underpinning therapy for neurological diseases. *Journal of neurochemistry*, 154(4), 354–371. <https://doi.org/10.1111/jnc.15002>
  36. Cullell, N., Soriano-Tárraga, C., Gallego-Fábrega, C., Cárcel-Márquez, J., Torres-Águila, N. P., Muiño, E., Lledós, M., Llucià-Carol, L., Esteller, M., Castro de Moura, M., Montaner, J., Fernández-Sanlés, A., Elosua, R., Delgado, P., Martí-Fábregas, J., Krupinski, J., Roquer, J., Jiménez-Conde, J., & Fernández-Cadenas, I. (2022). DNA Methylation and Ischemic Stroke Risk: An Epigenome-Wide Association Study. *Thrombosis and haemostasis*, 122(10), 1767–1778. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1749328>
  37. Dai, S. H., Chen, T., Li, X., Yue, K. Y., Luo, P., Yang, L. K., Zhu, J., Wang, Y. H., Fei, Z., & Jiang, X. F. (2017). Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: Involvement of the AMPK-mTOR pathway. *Free radical biology & medicine*, 108, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.005>
  38. D'Arcy M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
  39. Darwazeh, R., & Yan, Y. (2013). Mild hypothermia as a treatment for central nervous system injuries: Positive or negative effects. *Neural regeneration research*, 8(28), 2677–2686. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.28.010>
  40. Datta V. (2017). Therapeutic Hypothermia for Birth Asphyxia in Neonates. *Indian journal of pediatrics*, 84(3), 219–226. <https://doi.org/10.1007/s12098-016-2266-0>
  41. de Groot, J. C., Weidner, C., Krausze, J., Kawamoto, K., Schroeder, F. C., Sauer, S., & Büssow, K. (2013). Structural characterization of amorfrutins bound to the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Journal of medicinal chemistry*, 56(4), 1535–1543. <https://doi.org/10.1021/jm3013272>
  42. Dello Russo, C., Cappoli, N., Coletta, I., Mezzogori, D., Paciello, F., Pozzoli, G., Navarra, P., & Battaglia, A. (2018). The human microglial HMC3 cell line: where do we stand? A systematic literature review. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 259. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1288-0>



43. DeLong, J. H., Ohashi, S. N., O'Connor, K. C., & Sansing, L. H. (2022). Inflammatory Responses After Ischemic Stroke. *Seminars in immunopathology*, 44(5), 625–648. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00943-7>
44. Denihan, N. M., Boylan, G. B., & Murray, D. M. (2015). Metabolomic profiling in perinatal asphyxia: a promising new field. *BioMed research international*, 2015, 254076. <https://doi.org/10.1155/2015/254076>
45. Dilenge, M. E., Majnemer, A., & Shevell, M. I. (2001). Long-term developmental outcome of asphyxiated term neonates. *Journal of child neurology*, 16(11), 781–792. <https://doi.org/10.1177/08830738010160110201>
46. Dresselhaus, E. C., & Meffert, M. K. (2019). Cellular Specificity of NF-κB Function in the Nervous System. *Frontiers in immunology*, 10, 1043. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01043>
47. Ducsay, C. A., Goyal, R., Pearce, W. J., Wilson, S., Hu, X. Q., & Zhang, L. (2018). Gestational Hypoxia and Developmental Plasticity. *Physiological reviews*, 98(3), 1241–1334. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2017>
48. Edwards, A. D., Brocklehurst, P., Gunn, A. J., Halliday, H., Juszczak, E., Levene, M., Strohm, B., Thoresen, M., Whitelaw, A., & Azzopardi, D. (2010). Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ (Clinical research ed.)*, 340, c363. <https://doi.org/10.1136/bmj.c363>
49. Emerging Risk Factors Collaboration: Sarwar, N., Gao, P., Seshasai, S. R., Gobin, R., Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Ingelsson, E., Lawlor, D. A., Selvin, E., Stampfer, M., Stehouwer, C. D., Lewington, S., Pennells, L., Thompson, A., Sattar, N., White, I. R., Ray, K. K., & Danesh, J. (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet (London, England)*, 375(9733), 2215–2222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60484-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60484-9)
50. Engel, C., Rüdiger, M., Benders, M. J. N. L., van Bel, F., Allegaert, K., Naulaers, G., Bassler, D., Klebermaß-Schrehof, K., Vento, M., Vilan, A., Falck, M., Mauro, I., Metsäranta, M., Vanhatalo, S., Mazela, J., Metsvaht, T., van der Vlugt, R., Franz, A. R., & ALBINO Study Group (2024). Correction: Detailed statistical analysis plan for ALBINO: effect of Allopurinol in addition to hypothermia for hypoxic-ischemic Brain Injury on Neurocognitive Outcome - a blinded randomized placebo-controlled parallel

- group multicenter trial for superiority (phase III). *Trials*, 25(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s13063-024-08031-x>
51. Fan, P. L., Wang, S. S., Chu, S. F., & Chen, N. H. (2023). Time-dependent dual effect of microglia in ischemic stroke. *Neurochemistry international*, 169, 105584. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105584>
  52. Fattuoni, C., Palmas, F., Noto, A., Fanos, V., & Barberini, L. (2015). Perinatal asphyxia: a review from a metabolomics perspective. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(4), 7000–7016. <https://doi.org/10.3390/molecules20047000>
  53. Feige, J. N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W., & Desvergne, B. (2005). Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *The Journal of biological chemistry*, 280(18), 17880–17890. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500786200>
  54. Feigin, V. L., Brainin, M., Norrving, B., Martins, S., Sacco, R. L., Hacke, W., Fisher, M., Pandian, J., & Lindsay, P. (2022). World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*, 17(1), 18–29. <https://doi.org/10.1177/17474930211065917> WSO
  55. Fernandez Garcia-Agudo, L., Steixner-Kumar, A. A., Curto, Y., Barnkothe, N., Hassouna, I., Jähne, S., Butt, U. J., Grewe, K., Weber, M. S., Green, K., Rizzoli, S., Nacher, J., Nave, K. A., & Ehrenreich, H. (2021). Brain erythropoietin fine-tunes a counterbalance between neurodifferentiation and microglia in the adult hippocampus. *Cell reports*, 36(8), 109548. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109548>
  56. Ferriero, D. M., & Miller, S. P. (2010). Imaging selective vulnerability in the developing nervous system. *Journal of anatomy*, 217(4), 429–435. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01226.x>
  57. Fuhr, L., Rousseau, M., Plauth, A., Schroeder, F. C., & Sauer, S. (2015). Amorfrutins Are Natural PPAR $\gamma$  Agonists with Potent Anti-inflammatory Properties. *Journal of natural products*, 78(5), 1160–1164. <https://doi.org/10.1021/np500747y>
  58. Gamdzyk, M., Doycheva, D. M., Malaguit, J., Enkhjargal, B., Tang, J., & Zhang, J. H. (2018). Role of PPAR- $\beta/\delta$ /miR-17/TXNIP pathway in neuronal apoptosis after neonatal hypoxic-ischemic injury in rats. *Neuropharmacology*, 140, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.003>
  59. Gaub, P., Tedeschi, A., Puttagunta, R., Nguyen, T., Schmandke, A., & Di Giovanni, S. (2010). HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone

- collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell death and differentiation*, 17(9), 1392–1408. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.216>
60. Ghosh, P., & Saadat, A. (2023). Neurodegeneration and epigenetics: A review. *Neurologia*, 38(6), e62–e68. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2023.05.001>
  61. Godoy, J. A., Zolezzi, J. M., & Inestrosa, N. C. (2017). INT131 increases dendritic arborization and protects against A $\beta$  toxicity by inducing mitochondrial changes in hippocampal neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, 490(3), 955–962. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.146>
  62. Gold, M., Alderton, C., Zvartau-Hind, M., Egginton, S., Saunders, A. M., Irizarry, M., Craft, S., Landreth, G., Linnamägi, U., & Sawchak, S. (2010). Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 30(2), 131–146. <https://doi.org/10.1159/000318845>
  63. Govindarajulu, M., Pinky, P. D., Bloemer, J., Ghanei, N., Suppiramaniam, V., & Amin, R. (2018). Signaling Mechanisms of Selective PPAR $\gamma$  Modulators in Alzheimer's Disease. *PPAR research*, 2018, 2010675. <https://doi.org/10.1155/2018/2010675>
  64. Greco, P., Nencini, G., Piva, I., Scioscia, M., Volta, C. A., Spadaro, S., Neri, M., Bonaccorsi, G., Greco, F., Cocco, I., Sorrentino, F., D'Antonio, F., & Nappi, L. (2020). Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. *Acta neurologica Belgica*, 120(2), 277–288. <https://doi.org/10.1007/s13760-020-01308-3>
  65. Grygiel-Górniak B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutrition journal*, 13, 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
  66. Guo, C., & Ma, Y. Y. (2021). Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. *Frontiers in neural circuits*, 15, 711564. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.711564>
  67. Halúsková, S., Herzig, R., Krajíčková, D., Hamza, A., Krajina, A., Chovanec, V., Lojík, M., Raupach, J., Renc, O., Šimůnek, L., Vítková, E., Sobíšek, L., & Vališ, M. (2021). Acute Management Should Be Optimized in Patients with Less Specific Stroke Symptoms: Findings from a Retrospective Observational Study. *Journal of clinical medicine*, 10(5), 1143. <https://doi.org/10.3390/jcm10051143>
  68. Han, B., Jiang, W., Cui, P., Zheng, K., Dang, C., Wang, J., Li, H., Chen, L., Zhang, R., Wang, Q. M., Ju, Z., & Hao, J. (2021). Microglial PGC-1 $\alpha$  protects against ischemic

- brain injury by suppressing neuroinflammation. *Genome medicine*, 13(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00863-5>
69. Haupt, M., Gerner, S. T., Bähr, M., & Doeppner, T. R. (2023). Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke-Future Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4334. <https://doi.org/10.3390/ijms24054334>
70. Hee Han, B., Choi, J., & Holtzman, D. M. (2002). Evidence that p38 mitogen-activated protein kinase contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Developmental neuroscience*, 24(5), 405–410. <https://doi.org/10.1159/000069046>
71. Hernandez-Quiles, M., Broekema, M. F., & Kalkhoven, E. (2021). PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Frontiers in endocrinology*, 12, 624112. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.624112>
72. Huang, Y., Smith, D. E., Ibáñez-Sandoval, O., Sims, J. E., & Friedman, W. J. (2011). Neuron-specific effects of interleukin-1 $\beta$  are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(49), 18048–18059. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4067-11.2011>
73. Hung, Y. C., Chiu, L. T., Huang, H. Y., & Bau, D. T. (2020). Pioglitazone for primary stroke prevention in Asian patients with type 2 diabetes and cardiovascular risk factors: a retrospective study. *Cardiovascular diabetology*, 19(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01056-x>
74. Hurd, M. D., Goel, I., Sakai, Y., & Teramura, Y. (2021). Current status of ischemic stroke treatment: From thrombolysis to potential regenerative medicine. *Regenerative therapy*, 18, 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.09.009>
75. Hurford, R., Sekhar, A., Hughes, T. A. T., & Muir, K. W. (2020). Diagnosis and management of acute ischaemic stroke. *Practical neurology*, 20(4), 304–316. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2020-002557>
76. Hwang, J. A., Shin, N., Shin, H. J., Yin, Y., Kwon, H. H., Park, H., Shin, J., Kim, S. I., Kim, D. W., & Song, H. J. (2021). Protective Effects of ShcA Protein Silencing for Photothrombotic Cerebral Infarction. *Translational stroke research*, 12(5), 866–878. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00874-1>
77. Hwang, J. Y., Aromolaran, K. A., & Zukin, R. S. (2017). The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. *Nature reviews. Neuroscience*, 18(6), 347–361. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.46>

78. Javed, K., & Das, J. M. (2023). Neuroanatomy, Anterior Choroidal Arteries. In StatPearls. StatPearls Publishing.
79. Ji, Q., Ji, Y., Peng, J., Zhou, X., Chen, X., Zhao, H., Xu, T., Chen, L., & Xu, Y. (2016). Increased Brain-Specific MiR-9 and MiR-124 in the Serum Exosomes of Acute Ischemic Stroke Patients. *PloS one*, 11(9), e0163645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163645>
80. Jiang, C. T., Wu, W. F., Deng, Y. H., & Ge, J. W. (2020). Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review). *Molecular medicine reports*, 21(5), 2006–2018. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11003>
81. Jiang, W. W., Huang, B. S., Han, Y., Deng, L. H., & Wu, L. X. (2017). Sodium hydrosulfide attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing overactivated autophagy in rats. *FEBS open bio*, 7(11), 1686–1695. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12301>
82. Jiao, W., Lin, H. M., Timmons, J., Nagaich, A. K., Ng, S. W., Misteli, T., & Rane, S. G. (2005). E2F-dependent repression of topoisomerase II regulates heterochromatin formation and apoptosis in cells with melanoma-prone mutation. *Cancer research*, 65(10), 4067–4077. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3999>
83. Juźwik, C. A., S Drake, S., Zhang, Y., Paradis-Isler, N., Sylvester, A., Amar-Zifkin, A., Douglas, C., Morquette, B., Moore, C. S., & Fournier, A. E. (2019). microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Progress in neurobiology*, 182, 101664. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101664>
84. Kajta, M., Rzemieniec, J., & Rużyłło, W. (2016). Poszukiwanie nowych strategii w leczeniu uszkodzeń mózgu wywołanych niedotlenieniem i niedokrwieniem. *Nauka*, 3.
85. Kalani, A., Kamat, P. K., Kalani, K., & Tyagi, N. (2015). Epigenetic impact of curcumin on stroke prevention. *Metabolic brain disease*, 30(2), 427–435. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9537-0>
86. Kalinichenko, S. G., Korobtsov, A. V., Matveeva, N. Y., & Pushchin, I. I. (2022). Topography of neurotrophins in the rat neocortex and their role in neuron apoptosis after experimental ischemic stroke. *Journal of chemical neuroanatomy*, 124, 102122. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102122>
87. Kalinichenko, S. G., Pushchin, I. I., & Matveeva, N. Y. (2023). Neurotoxic and cytoprotective mechanisms in the ischemic neocortex. *Journal of chemical neuroanatomy*, 128, 102230. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102230>

88. Kernan, W. N., Viscoli, C. M., Furie, K. L., Young, L. H., Inzucchi, S. E., Gorman, M., Guarino, P. D., Lovejoy, A. M., Peduzzi, P. N., Conwit, R., Brass, L. M., Schwartz, G. G., Adams, H. P., Jr, Berger, L., Carolei, A., Clark, W., Coull, B., Ford, G. A., Kleindorfer, D., O'Leary, J. R., ... IRIS Trial Investigators (2016). Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *The New England journal of medicine*, 374(14), 1321–1331. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506930>
89. Khera, R., Mehan, S., Kumar, S., Sethi, P., Bhalla, S., & Prajapati, A. (2022). Role of JAK-STAT and PPAR-Gamma Signalling Modulators in the Prevention of Autism and Neurological Dysfunctions. *Molecular neurobiology*, 59(6), 3888–3912. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02819-1>
90. Khoury, N., Koronowski, K. B., Young, J. I., & Perez-Pinzon, M. A. (2018). The NAD<sup>+</sup>-Dependent Family of Sirtuins in Cerebral Ischemia and Preconditioning. *Antioxidants & redox signaling*, 28(8), 691–710. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7258>
91. Kleuskens, D. G., Gonçalves Costa, F., Annink, K. V., van den Hoogen, A., Alderliesten, T., Groenendaal, F., Benders, M. J. N., & Dudink, J. (2021). Pathophysiology of Cerebral Hyperperfusion in Term Neonates With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Systematic Review for Future Research. *Frontiers in pediatrics*, 9, 631258. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.631258>
92. Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., & Uchiyama, Y. (2008). Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *The American journal of pathology*, 172(2), 454–469. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070876>
93. Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
94. Kozuharova, E., Matkowski, A., Woźniak, D., Simeonova, R., Naychov, Z., Malainer, C., Mocan, A., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2017). *Amorpha fruticosa* - A Noxious Invasive Alien Plant in Europe or a Medicinal Plant against Metabolic Disease?. *Frontiers in pharmacology*, 8, 333. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00333>
95. Krishnan, J., Suter, M., Windak, R., Krebs, T., Felley, A., Montessuit, C., Tokarska-Schlattner, M., Aasum, E., Bogdanova, A., Perriard, E., Perriard, J. C., Larsen, T., Pedrazzini, T., & Krek, W. (2009). Activation of a HIF1 $\alpha$ -PPAR $\gamma$  axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac

- hypertrophy. *Cell metabolism*, 9(6), 512–524.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.05.005>
96. Kruk, M., & Pawlewicz, A. (2023). NFZ o zdrowiu. Udar niedokrwienny mózgu. Centrala Narodowego Funduszu Zdrowia, ISBN: 978-83-969225-0-2.
  97. Kvandová, M., Dovinová, I. (2017). Functioning of the PPAR $\gamma$  and its effect on cardiovascular and metabolic diseases. In: *Metabolic Syndrome*. SMgroup, 1–41, Dover, USA.
  98. Lan, L. F., Zheng, L., Yang, X., Ji, X. T., Fan, Y. H., & Zeng, J. S. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone ameliorates white matter lesion and cognitive impairment in hypertensive rats. *CNS neuroscience & therapeutics*, 21(5), 410–416. <https://doi.org/10.1111/cns.12374>
  99. Lanzillotta, A., Pignataro, G., Branca, C., Cuomo, O., Sarnico, I., Benarese, M., Annunziato, L., Spano, P., & Pizzi, M. (2013). Targeted acetylation of NF-kappaB/RelA and histones by epigenetic drugs reduces post-ischemic brain injury in mice with an extended therapeutic window. *Neurobiology of disease*, 49, 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.08.018>
  100. Lapchak, P. A., & Zhang, J. H. (2017). The High Cost of Stroke and Stroke Cytoprotection Research. *Translational stroke research*, 8(4), 307–317. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0518-y>
  101. Lau, L. H., Lew, J., Borschmann, K., Thijs, V., & Ekinici, E. I. (2019). Prevalence of diabetes and its effects on stroke outcomes: A meta-analysis and literature review. *Journal of diabetes investigation*, 10(3), 780–792. <https://doi.org/10.1111/jdi.12932>
  102. Lauer, A. A., Grimm, H. S., Apel, B., Golobrodska, N., Kruse, L., Ratanski, E., Schulten, N., Schwarze, L., Slawik, T., Sperlich, S., Vohla, A., & Grimm, M. O. W. (2022). Mechanistic Link between Vitamin B12 and Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 12(1), 129. <https://doi.org/10.3390/biom12010129>
  103. Lavecchia, A., & Di Giovanni, C. (2015). Amorfrutins are efficient modulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) with potent antidiabetic and anticancer properties: a patent evaluation of WO2014177593 A1. *Expert opinion on therapeutic patents*, 25(11), 1341–1347. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1076393>
  104. Lee, J., & Reding, M. (2007). Effects of thiazolidinediones on stroke recovery: a case-matched controlled study. *Neurochemical research*, 32(4-5), 635–638. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9138-3>

105. Lefterova, M. I., Steger, D. J., Zhuo, D., Qatanani, M., Mullican, S. E., Tuteja, G., Manduchi, E., Grant, G. R., & Lazar, M. A. (2010). Cell-specific determinants of peroxisome proliferator-activated receptor gamma function in adipocytes and macrophages. *Molecular and cellular biology*, 30(9), 2078–2089. <https://doi.org/10.1128/MCB.01651-09>
106. Li, L. Z., Huang, Y. Y., Yang, Z. H., Zhang, S. J., Han, Z. P., & Luo, Y. M. (2020). Potential microglia-based interventions for stroke. *CNS neuroscience & therapeutics*, 26(3), 288–296. <https://doi.org/10.1111/cns.13291>
107. Li, P., Shen, M., Gao, F., Wu, J., Zhang, J., Teng, F., & Zhang, C. (2017). An Antagomir to MicroRNA-106b-5p Ameliorates Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats Via Inhibiting Apoptosis and Oxidative Stress. *Molecular neurobiology*, 54(4), 2901–2921. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9842-1>
108. Li, Q., Dai, Z., Cao, Y., & Wang, L. (2019). Caspase-1 inhibition mediates neuroprotection in experimental stroke by polarizing M2 microglia/macrophage and suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 513(2), 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.202>
109. Li, S., Lei, Z., & Sun, T. (2023). The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: a review. *Cell biology and toxicology*, 39(1), 53–83. <https://doi.org/10.1007/s10565-022-09761-x>
110. Liu, F., Lu, J., Manaenko, A., Tang, J., & Hu, Q. (2018). Mitochondria in Ischemic Stroke: New Insight and Implications. *Aging and disease*, 9(5), 924–937. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.1126>
111. Liu, J., & Wang, L. N. (2019). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists for preventing recurrent stroke and other vascular events in people with stroke or transient ischaemic attack. *The Cochrane database of systematic reviews*, 10(10), CD010693. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010693.pub5>
112. Liu, R., Diao, J., He, S., Li, B., Fei, Y., Li, Y., & Fang, W. (2018). XQ-1H protects against ischemic stroke by regulating microglia polarization through PPAR $\gamma$  pathway in mice. *International immunopharmacology*, 57, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.02.014>
113. Liu, S., Su, M., Song, S. J., Hong, J., Chung, H. Y., & Jung, J. H. (2018). An Anti-Inflammatory PPAR- $\gamma$  Agonist from the Jellyfish-Derived Fungus *Penicillium chrysogenum* J08NF-4. *Journal of natural products*, 81(2), 356–363. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00846>



114. Liu, X., Feng, Z., Du, L., Huang, Y., Ge, J., Deng, Y., & Mei, Z. (2019). The Potential Role of MicroRNA-124 in Cerebral Ischemia Injury. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 120. <https://doi.org/10.3390/ijms21010120>
115. Liu, Y., Wang, L., Yang, G., Chi, X., Liang, X., & Zhang, Y. (2023). Sirtuins: Promising Therapeutic Targets to Treat Ischemic Stroke. *Biomolecules*, 13(8), 1210. <https://doi.org/10.3390/biom13081210>
116. Lorente, L., Martín, M. M., González-Rivero, A. F., Pérez-Cejas, A., Abreu-González, P., Ramos, L., Argueso, M., Cáceres, J. J., Solé-Violán, J., Alvarez-Castillo, A., Jiménez, A., & García-Marín, V. (2021). DNA and RNA oxidative damage are associated to mortality in patients with cerebral infarction. *Medicina intensiva*, 45(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2019.07.008>
117. Lossi L. (2022). The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *The Biochemical journal*, 479(3), 357–384. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210854>
118. Lossi, L., Castagna, C., & Merighi, A. (2024). An Overview of the Epigenetic Modifications in the Brain under Normal and Pathological Conditions. *International journal of molecular sciences*, 25(7), 3881. <https://doi.org/10.3390/ijms25073881>
119. Lu, M., Sarruf, D. A., Talukdar, S., Sharma, S., Li, P., Bandyopadhyay, G., Nalbandian, S., Fan, W., Gayen, J. R., Mahata, S. K., Webster, N. J., Schwartz, M. W., & Olefsky, J. M. (2011). Brain PPAR- $\gamma$  promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nature medicine*, 17(5), 618–622. <https://doi.org/10.1038/nm.2332>
120. Luchowski, P., & Rejdak, K. (2020). Acute stroke treatment. *Lekarz POZ*, 6(3), 199-205.
121. Machado, M. M. F., Bassani, T. B., Cópola-Segovia, V., Moura, E. L. R., Zanata, S. M., Andreatini, R., & Vital, M. A. B. F. (2019). PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone reduces microglial proliferation and NF- $\kappa$ B activation in the substantia nigra in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Pharmacological reports : PR*, 71(4), 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.11.005>
122. Madsen, M. S., Siersbæk, R., Boergesen, M., Nielsen, R., & Mandrup, S. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Molecular and cellular biology*, 34(6), 939–954. <https://doi.org/10.1128/MCB.01344-13>
123. Maida, C. D., Daidone, M., Pacinella, G., Norrito, R. L., Pinto, A., & Tuttolomondo, A. (2022). Diabetes and Ischemic Stroke: An Old and New Relationship an Overview of

- the Close Interaction between These Diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2397. <https://doi.org/10.3390/ijms23042397>
124. Mander, P. K., Jekabsone, A., & Brown, G. C. (2006). Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 176(2), 1046–1052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.2.1046>
  125. Marion-Letellier, R., Savoye, G., & Ghosh, S. (2016). Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *European journal of pharmacology*, 785, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.004>
  126. Martín-Aragón Baudel, M. A. S., Rae, M. T., Darlison, M. G., Poole, A. V., & Fraser, J. A. (2017). Preferential activation of HIF-2 $\alpha$  adaptive signalling in neuronal-like cells in response to acute hypoxia. *PloS one*, 12(10), e0185664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185664>
  127. Martinez, C., Carneiro, L., Vernier, L., Cesa, C., Guardiola, A., & Vidor, D. (2014). Language in children with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *International archives of otorhinolaryngology*, 18(3), 255–259. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1366976>
  128. Martínez-Iglesias, O., Naidoo, V., Carrera, I., Corzo, L., & Cacabelos, R. (2023). Natural Bioactive Products as Epigenetic Modulators for Treating Neurodegenerative Disorders. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 16(2), 216. <https://doi.org/10.3390/ph16020216>
  129. Mens, M. M. J., Heshmatollah, A., Fani, L., Ikram, M. A., Ikram, M. K., & Ghanbari, M. (2021). Circulatory MicroRNAs as Potential Biomarkers for Stroke Risk: The Rotterdam Study. *Stroke*, 52(3), 945–953. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.031543>
  130. Mo, Y., Xu, W., Fu, K., Chen, H., Wen, J., Huang, Q., Guo, F., Mo, L., & Yan, J. (2022). The dual function of microglial polarization and its treatment targets in ischemic stroke. *Frontiers in neurology*, 13, 921705. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.921705>
  131. Mollet, I., Marto, J. P., Mendonça, M., Baptista, M. V., & Vieira, H. L. A. (2022). Remote but not Distant: a Review on Experimental Models and Clinical Trials in Remote Ischemic Conditioning as Potential Therapy in Ischemic Stroke. *Molecular neurobiology*, 59(1), 294–325. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02585-6>
  132. Mota-Rojas, D., Villanueva-García, D., Solimano, A., Muns, R., Ibarra-Ríos, D., & Mota-Reyes, A. (2022). Pathophysiology of Perinatal Asphyxia in Humans and Animal Models. *Biomedicines*, 10(2), 347. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020347>

133. Muresanu, D. F., Strilciuc, S., & Stan, A. (2019). Current Drug Treatment of Acute Ischemic Stroke: Challenges and Opportunities. *CNS drugs*, 33(9), 841–847. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00663-x>
134. Muzio, L., Viotti, A., & Martino, G. (2021). Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. *Frontiers in neuroscience*, 15, 742065. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.742065>
135. Nakajima, H., Unoda, K., Ito, T., Kitaoka, H., Kimura, F., & Hanafusa, T. (2012). The Relation of Urinary 8-OHdG, A Marker of Oxidative Stress to DNA, and Clinical Outcomes for Ischemic Stroke. *The open neurology journal*, 6, 51–57. <https://doi.org/10.2174/1874205X01206010051>
136. Ni, J., Wang, X., Chen, S., Liu, H., Wang, Y., Xu, X., Cheng, J., Jia, J., & Zhen, X. (2015). MicroRNA let-7c-5p protects against cerebral ischemia injury via mechanisms involving the inhibition of microglia activation. *Brain, behavior, and immunity*, 49, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.014>
137. Nicolia, V., Fusco, A., Cavallaro, R. A., Di Luzio, A., & Scarpa, S. (2010). B vitamin deficiency promotes tau phosphorylation through regulation of GSK3beta and PP2A. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 19(3), 895–907. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1284>
138. Niu, F. N., Zhang, X., Hu, X. M., Chen, J., Chang, L. L., Li, J. W., Liu, Z., Cao, W., & Xu, Y. (2012). Targeted mutation of Fas ligand gene attenuates brain inflammation in experimental stroke. *Brain, behavior, and immunity*, 26(1), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.07.235>
139. Ochocka, N., & Kaminska, B. (2021). Microglia Diversity in Healthy and Diseased Brain: Insights from Single-Cell Omics. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3027. <https://doi.org/10.3390/ijms22063027>
140. Okazaki, K., Nakamura, S., Koyano, K., Konishi, Y., Kondo, M., & Kusaka, T. (2023). Neonatal asphyxia as an inflammatory disease: Reactive oxygen species and cytokines. *Frontiers in pediatrics*, 11, 1070743. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1070743>
141. Pang, R., Advic-Belltheus, A., Meehan, C., Fullen, D. J., Golay, X., & Robertson, N. J. (2021). Melatonin for Neonatal Encephalopathy: From Bench to Bedside. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5481. <https://doi.org/10.3390/ijms22115481>
142. Pang, T., Sun, L. X., Wang, T., Jiang, Z. Z., Liao, H., & Zhang, L. Y. (2014). Telmisartan protects central neurons against nutrient deprivation-induced apoptosis in vitro through

- activation of PPAR $\gamma$  and the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. *Acta pharmacologica Sinica*, 35(6), 727–737. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.199>
143. Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., Butovsky, O., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
144. Park, D. J., Kang, J. B., Shah, F. A., & Koh, P. O. (2019). Resveratrol modulates the Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in a middle cerebral artery occlusion animal model. *Laboratory animal research*, 35, 18. <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0019-8>
145. Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G., & Glass, C. K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*, 437(7059), 759–763. <https://doi.org/10.1038/nature03988>
146. Peixoto, P., Cartron, P. F., Serandour, A. A., & Hervouet, E. (2020). From 1957 to Nowadays: A Brief History of Epigenetics. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7571. <https://doi.org/10.3390/ijms21207571>
147. Peng, J., Ghosh, D., Zhang, F., Yang, L., Wu, J., Pang, J., Zhang, L., Yin, S., & Jiang, Y. (2022). Advancement of epigenetics in stroke. *Frontiers in neuroscience*, 16, 981726. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.981726>
148. Peruzzotti-Jametti, L., Willis, C. M., Krzak, G., Hamel, R., Pirvan, L., Ionescu, R. B., Reisz, J. A., Prag, H. A., Garcia-Segura, M. E., Wu, V., Xiang, Y., Barlas, B., Casey, A. M., van den Bosch, A. M. R., Nicaise, A. M., Roth, L., Bates, G. R., Huang, H., Prasad, P., Vincent, A. E., ... Pluchino, S. (2024). Mitochondrial complex I activity in microglia sustains neuroinflammation. *Nature*, 628(8006), 195–203. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07167-9>
149. Pluta, R., Furnaga-Jabłońska, W., Januszewski, S., & Tarkowska, A. (2023). Melatonin: A Potential Candidate for the Treatment of Experimental and Clinical Perinatal Asphyxia. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(3), 1105. <https://doi.org/10.3390/molecules28031105>
150. Przepiórska, K., Wnuk, A., Beyer, C., & Kajta, M. (2023). Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation. *Molecular neurobiology*, 60(2), 576–595. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03087-9>

151. Przepiórska-Drońska, K., Wnuk, A., Pietrzak-Wawrzyńska, B. A., Łach, A., Biernat, W., Wójtowicz, A. K., & Kajta, M. (2024). Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 19(1), 34. <https://doi.org/10.1007/s11481-024-10135-9>
152. Qi, Z., Dong, W., Shi, W., Wang, R., Zhang, C., Zhao, Y., Ji, X., Liu, K. J., & Luo, Y. (2015). Bcl-2 phosphorylation triggers autophagy switch and reduces mitochondrial damage in limb remote ischemic conditioned rats after ischemic stroke. *Translational stroke research*, 6(3), 198–206. <https://doi.org/10.1007/s12975-015-0393-y>
153. Radak, D., Katsiki, N., Resanovic, I., Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Zafirovic, S., Mousad, S. A., & Isenovic, E. R. (2017). Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Current vascular pharmacology*, 15(2), 115–122. <https://doi.org/10.2174/1570161115666161104095522>
154. Rai, M. A., Hammonds, J., Pujato, M., Mayhew, C., Roskin, K., & Spearman, P. (2020). Comparative analysis of human microglial models for studies of HIV replication and pathogenesis. *Retrovirology*, 17(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00544-y>
155. Ramamoorthy, P., & Shi, H. (2014). Ischemia induces different levels of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  protein expression in interneurons and pyramidal neurons. *Acta neuropathologica communications*, 2, 51. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-51>
156. Ranjan, A. K., & Gulati, A. (2023). Advances in Therapies to Treat Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of clinical medicine*, 12(20), 6653. <https://doi.org/10.3390/jcm12206653>
157. Ricote, M., & Glass, C. K. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et biophysica acta*, 1771(8), 926–935. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2007.02.013>
158. Rossiter, J. P., Anderson, L. L., Yang, F., & Cole, G. M. (2002). Caspase-3 activation and caspase-like proteolytic activity in human perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Acta neuropathologica*, 103(1), 66–73. <https://doi.org/10.1007/s004010100432>
159. Ryu, W. S., Hong, K. S., Jeong, S. W., Park, J. E., Kim, B. J., Kim, J. T., Lee, K. B., Park, T. H., Park, S. S., Park, J. M., Kang, K., Cho, Y. J., Park, H. K., Lee, B. C., Yu, K. H., Oh, M. S., Lee, S. J., Kim, J. G., Cha, J. K., Kim, D. H., ... Kim, D. E. (2022). Association of ischemic stroke onset time with presenting severity, acute progression,

- and long-term outcome: A cohort study. *PLoS medicine*, 19(2), e1003910. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003910>
160. Rzemieniec, J., Bratek, E., Wnuk, A., Przepiórska, K., Salińska, E., & Kajta, M. (2020). Neuroprotective effect of 3,3'-Diindolylmethane against perinatal asphyxia involves inhibition of the AhR and NMDA signaling and hypermethylation of specific genes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 25(9-10), 747–762. <https://doi.org/10.1007/s10495-020-01631-3>
161. Rzemieniec, J., Litwa, E., Wnuk, A., Lason, W., Gołas, A., Krzeptowski, W., & Kajta, M. (2015). Neuroprotective action of raloxifene against hypoxia-induced damage in mouse hippocampal cells depends on ER $\alpha$  but not ER $\beta$  or GPR30 signalling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 146, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.005>
162. Rzemieniec, J., Litwa, E., Wnuk, A., Lason, W., Krzeptowski, W., & Kajta, M. (2016). Selective Aryl Hydrocarbon Receptor Modulator 3,3'-Diindolylmethane Impairs AhR and ARNT Signaling and Protects Mouse Neuronal Cells Against Hypoxia. *Molecular neurobiology*, 53(8), 5591–5606. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9471-0>
163. Saha, R. N., & Pahan, K. (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell death and differentiation*, 13(4), 539–550. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401769>
164. Sakai, D., Sugawara, T., Kurokawa, T., Murakami, Y., Tomosugi, M., Masuta, H., Sakata-Haga, H., Hatta, T., & Shoji, H. (2022). Hif1 $\alpha$ -dependent hypoxia signaling contributes to the survival of deep-layer neurons and cortex formation in a mouse model. *Molecular brain*, 15(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13041-022-00911-0>
165. Samaniego, E. A., Roa, J. A., Limaye, K., & Adams, H. P., Jr (2018). Mechanical Thrombectomy: Emerging Technologies and Techniques. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 27(10), 2555–2571. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.025>
166. Sapkota, A., Gaire, B. P., Cho, K. S., Jeon, S. J., Kwon, O. W., Jang, D. S., Kim, S. Y., Ryu, J. H., & Choi, J. W. (2017). Eupatilin exerts neuroprotective effects in mice with transient focal cerebral ischemia by reducing microglial activation. *PloS one*, 12(2), e0171479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171479>
167. Schmidt, C., Schneble-Löhnert, N., Lajqi, T., Wetzker, R., Müller, J. P., & Bauer, R. (2021). PI3K $\gamma$  Mediates Microglial Proliferation and Cell Viability via ROS. *Cells*, 10(10), 2534. <https://doi.org/10.3390/cells10102534>

168. Sekerdag, E., Solaroglu, I., & Gursoy-Ozdemir, Y. (2018). Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Current neuropharmacology*, 16(9), 1396–1415. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180302115544>
169. Shi, Q., Cheng, Q., & Chen, C. (2021). The Role of Autophagy in the Pathogenesis of Ischemic Stroke. *Current neuropharmacology*, 19(5), 629–640. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200729101913>
170. Shvedova, M., Anfinogenova, Y., Atochina-Vasserman, E. N., Schepetkin, I. A., & Atochin, D. N. (2018). c-Jun N-Terminal Kinases (JNKs) in Myocardial and Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in pharmacology*, 9, 715. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00715>
171. Son, Y., Cho, Y. K., Saha, A., Kwon, H. J., Park, J. H., Kim, M., Jung, Y. S., Kim, S. N., Choi, C., Seong, J. K., Burl, R. B., Granneman, J. G., & Lee, Y. H. (2020). Adipocyte-specific Beclin1 deletion impairs lipolysis and mitochondrial integrity in adipose tissue. *Molecular metabolism*, 39, 101005. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101005>
172. Stanzione, R., Cotugno, M., Bianchi, F., Marchitti, S., Forte, M., Volpe, M., & Rubattu, S. (2020). Pathogenesis of Ischemic Stroke: Role of Epigenetic Mechanisms. *Genes*, 11(1), 89. <https://doi.org/10.3390/genes11010089>
173. Tadi, P., & Lui, F. (2023). Acute Stroke. In StatPearls. StatPearls Publishing.
174. Tang, H., Shi, W., Fu, S., Wang, T., Zhai, S., Song, Y., & Han, J. (2018). Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer medicine*, 7(4), 1070–1080. <https://doi.org/10.1002/cam4.1354>
175. Taylor, R. A., & Sansing, L. H. (2013). Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 746068. <https://doi.org/10.1155/2013/746068>
176. Thomas, M. G., Marwood, R. M., Parsons, A. E., & Parsons, R. B. (2015). The effect of foetal bovine serum supplementation upon the lactate dehydrogenase cytotoxicity assay: Important considerations for in vitro toxicity analysis. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 30(1 Pt B), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.10.007>
177. Thornton, C., Leaw, B., Mallard, C., Nair, S., Jinnai, M., & Hagberg, H. (2017). Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 248. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00248>

178. Toledo, E. M., & Inestrosa, N. C. (2010). Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>DeltaE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, 15(3), 272–228. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.72>
179. Tu, Y., & Hu, Y. (2021). MiRNA-34c-5p protects against cerebral ischemia/reperfusion injury: involvement of anti-apoptotic and anti-inflammatory activities. *Metabolic brain disease*, 36(6), 1341–1351. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00724-5>
180. Umemoto, T., & Fujiki, Y. (2012). Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 17(7), 576–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01607.x>
181. Uzdensky A. B. (2019). Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 24(9-10), 687–702. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01556-6>
182. Uzdensky, A. B., & Demyanenko, S. (2021). Histone acetylation and deacetylation in ischemic stroke. *Neural regeneration research*, 16(8), 1529–1530. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.303024>
183. Vahsen, B. F., & Lingor, P. (2021). ULK1 as a novel therapeutic target in neurodegeneration. *Neural regeneration research*, 16(6), 1212–1213. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300442>
184. Verma, R., Ritzel, R. M., Crapser, J., Friedler, B. D., & McCullough, L. D. (2019). Evaluation of the Neuroprotective Effect of Sirt3 in Experimental Stroke. *Translational stroke research*, 10(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0603-x>
185. Vetrovoy, O., Sarieva, K., Lomert, E., Nimiritsky, P., Eschenko, N., Galkina, O., Lyanguzov, A., Tyulkova, E., & Rybnikova, E. (2020). Pharmacological HIF1 Inhibition Eliminates Downregulation of the Pentose Phosphate Pathway and Prevents Neuronal Apoptosis in Rat Hippocampus Caused by Severe Hypoxia. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 70(5), 635–646. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01469-8>
186. Victor, N. A., Wanderi, E. W., Gamboa, J., Zhao, X., Aronowski, J., Deininger, K., Lust, W. D., Landreth, G. E., & Sundararajan, S. (2006). Altered PPAR $\gamma$  expression and activation after transient focal ischemia in rats. *The European journal of neuroscience*, 24(6), 1653–1663. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05037.x>



187. Vidal-Itriago, A., Radford, R. A. W., Aramideh, J. A., Maurel, C., Scherer, N. M., Don, E. K., Lee, A., Chung, R. S., Graeber, M. B., & Morsch, M. (2022). Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Frontiers in immunology*, 13, 997786. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.997786>
188. Vinet, J., Weering, H. R., Heinrich, A., Kälin, R. E., Wegner, A., Brouwer, N., Heppner, F. L., Rooijen, N.v, Boddeke, H. W., & Biber, K. (2012). Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *Journal of neuroinflammation*, 9, 27. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-27>
189. Walas, W., Wilińska, M., Bekiesińska-Figatowska, M., Halaba, Z., & Śmigiel, R. (2020). Methods for assessing the severity of perinatal asphyxia and early prognostic tools in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy treated with therapeutic hypothermia. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 29(8), 1011–1016. <https://doi.org/10.17219/acem/124437>
190. Wang, D., Liu, F., Zhu, L., Lin, P., Han, F., Wang, X., Tan, X., Lin, L., & Xiong, Y. (2020). FGF21 alleviates neuroinflammation following ischemic stroke by modulating the temporal and spatial dynamics of microglia/macrophages. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01921-2>
191. Wang, P., Shao, B. Z., Deng, Z., Chen, S., Yue, Z., & Miao, C. Y. (2018). Autophagy in ischemic stroke. *Progress in neurobiology*, 163-164, 98–117. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.01.001>
192. Wang, Y., Leak, R. K., & Cao, G. (2022). Microglia-mediated neuroinflammation and neuroplasticity after stroke. *Frontiers in cellular neuroscience*, 16, 980722. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.980722>
193. Wang, Y., Zu, G., Yu, Y., Tang, J., Han, T., & Zhang, C. (2023). Curcumin's mechanism of action against ischemic stroke: A network pharmacology and molecular dynamics study. *PloS one*, 18(1), e0280112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280112>
194. Wang, Z., Chen, J., Zhu, L., Jiao, S., Chen, Y., & Sun, Y. (2023). Metabolic disorders and risk of cardiovascular diseases: a two-sample mendelian randomization study. *BMC cardiovascular disorders*, 23(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12872-023-03567-3>
195. Warden, A., Truitt, J., Merriman, M., Ponomareva, O., Jameson, K., Ferguson, L. B., Mayfield, R. D., & Harris, R. A. (2016). Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Scientific reports*, 6, 27618. <https://doi.org/10.1038/srep27618>
196. Weidner, C., de Groot, J. C., Prasad, A., Freiwald, A., Quedenau, C., Kliem, M., Witzke, A., Kodelja, V., Han, C. T., Giegold, S., Baumann, M., Klebl, B., Siems, K., Müller-

- Kuhrt, L., Schürmann, A., Schüler, R., Pfeiffer, A. F., Schroeder, F. C., Büssow, K., & Sauer, S. (2012). Amorfrutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19), 7257–7262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116971109>
197. Weidner, C., Wowro, S. J., Freiwald, A., Kawamoto, K., Witzke, A., Kliem, M., Siems, K., Müller-Kuhrt, L., Schroeder, F. C., & Sauer, S. (2013). Amorfrutin B is an efficient natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) agonist with potent glucose-lowering properties. *Diabetologia*, 56(8), 1802–1812. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2920-2>
198. White, A. T., & Murphy, A. N. (2010). Administration of thiazolidinediones for neuroprotection in ischemic stroke: a pre-clinical systematic review. *Journal of neurochemistry*, 115(4), 845–853. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06999.x>
199. Wittekindt, M., Kaddatz, H., Joost, S., Staffeld, A., Bitar, Y., Kipp, M., & Frintrop, L. (2022). Different Methods for Evaluating Microglial Activation Using Anti-Ionized Calcium-Binding Adaptor Protein-1 Immunohistochemistry in the Cuprizone Model. *Cells*, 11(11), 1723. <https://doi.org/10.3390/cells11111723>
200. Wnuk, A., & Kajta, M. (2017). Steroid and Xenobiotic Receptor Signalling in Apoptosis and Autophagy of the Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2394. <https://doi.org/10.3390/ijms18112394>
201. Wnuk, A., Przepiórska, K., Pietrzak, B. A., & Kajta, M. (2021). Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia. *Biomedicines*, 9(8), 854. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080854>
202. Wnuk, A., Rzemieniec, J., Lasoń, W., Krzeptowski, W., & Kajta, M. (2018). Apoptosis Induced by the UV Filter Benzophenone-3 in Mouse Neuronal Cells Is Mediated via Attenuation of Era/Ppar $\gamma$  and Stimulation of Er $\beta$ /Gpr30 Signaling. *Molecular neurobiology*, 55(3), 2362–2383. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0480-z>
203. Wu, H., Che, X., Zheng, Q., Wu, A., Pan, K., Shao, A., Wu, Q., Zhang, J., & Hong, Y. (2014). Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *International journal of biological sciences*, 10(9), 1072–1083. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9719>
204. Wu, Q. J., Zhang, T. N., Chen, H. H., Yu, X. F., Lv, J. L., Liu, Y. Y., Liu, Y. S., Zheng, G., Zhao, J. Q., Wei, Y. F., Guo, J. Y., Liu, F. H., Chang, Q., Zhang, Y. X., Liu, C. G., & Zhao, Y. H. (2022). The sirtuin family in health and disease. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 402. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01257-8>

205. Xia, C. Y., Zhang, S., Gao, Y., Wang, Z. Z., & Chen, N. H. (2015). Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *International immunopharmacology*, 25(2), 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.019>
206. Xie, X., Peng, L., Zhu, J., Zhou, Y., Li, L., Chen, Y., Yu, S., & Zhao, Y. (2017). miR-145-5p/Nurr1/TNF- $\alpha$  Signaling-Induced Microglia Activation Regulates Neuron Injury of Acute Cerebral Ischemic/Reperfusion in Rats. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 383. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00383>
207. Xu, L. J., Ouyang, Y. B., Xiong, X., Stary, C. M., & Giffard, R. G. (2015). Post-stroke treatment with miR-181 antagomir reduces injury and improves long-term behavioral recovery in mice after focal cerebral ischemia. *Experimental neurology*, 264, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.11.007>
208. Xu, S., Lu, J., Shao, A., Zhang, J. H., & Zhang, J. (2020). Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Frontiers in immunology*, 11, 294. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00294>
209. Xu, X. J., Zeng, T., Huang, Z. X., Xu, X. F., Lin, J., & Chen, W. M. (2018). Synthesis and Biological Evaluation of Cajaninstilbene Acid and Amorfrutins A and B as Inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing System. *Journal of natural products*, 81(12), 2621–2629. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00315>
210. Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
211. Yan, Q., Zhang, Y., Wang, Q., & Yuan, L. (2022). Autophagy: A Double-Edged Sword in Male Reproduction. *International journal of molecular sciences*, 23(23), 15273. <https://doi.org/10.3390/ijms232315273>
212. Yang, J., Zhang, X., Chen, X., Wang, L., & Yang, G. (2017). Exosome Mediated Delivery of miR-124 Promotes Neurogenesis after Ischemia. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 7, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.010>
213. Yenari, M. A., Kauppinen, T. M., & Swanson, R. A. (2010). Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(4), 378–391. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.005>
214. Yew, T., Toh, S. A., & Millar, J. S. (2012). Selective peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  modulation to reduce cardiovascular risk in patients with insulin resistance.

- Recent patents on cardiovascular drug discovery, 7(1), 33–41. <https://doi.org/10.2174/157489012799362359>
215. Yokoi, T. (2010). Troglitazone. In: Uetrecht, J. (eds) Adverse Drug Reactions. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 196. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_14)
216. Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14(2), 207–215. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>
217. Yu, S., Zhai, J., Yu, J., Yang, Q., & Yang, J. (2021). miR-98-5p protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through anti-apoptosis and anti-oxidative stress in mice. *Journal of biochemistry*, 169(2), 195–206. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa099>
218. Zewdie, R., Getachew, L., Dubele, G., Oluma, A., Israel, G., Dese, K., & Simegn, G. L. (2021). Treatment device for neonatal birth asphyxia related Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *BMC pediatrics*, 21(1), 487. <https://doi.org/10.1186/s12887-021-02970-z>
219. Zhao, X., Strong, R., Zhang, J., Sun, G., Tsien, J. Z., Cui, Z., Grotta, J. C., & Aronowski, J. (2009). Neuronal PPARgamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(19), 6186–6195. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5857-08.2009>
220. Zhao, Y., Zhang, X., Chen, X., & Wei, Y. (2022). Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review). *International journal of molecular medicine*, 49(2), 15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>
221. Zheng, Y., Hou, J., Liu, J., Yao, M., Li, L., Zhang, B., Zhu, H., & Wang, Z. (2014). Inhibition of autophagy contributes to melatonin-mediated neuroprotection against transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of pharmacological sciences*, 124(3), 354–364. <https://doi.org/10.1254/jphs.13220fp>
222. Zhu, Y., Liu, F., Jian, F., & Rong, Y. (2024). Recent progresses in the late stages of autophagy. *Cell insight*, 3(2), 100152. <https://doi.org/10.1016/j.cellin.2024.100152>



Mgr Karolina Przepiórska-Drońska  
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki  
Zakład Farmakologii Uzależnień  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polska Akademia Nauk

Kraków, 18.07.2024

### **Oświadczenie**

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M. *Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation*. Mol Neurobiol. 2023 Feb;60(2):576-595. doi: 10.1007/s12035-022-03087-9.

polegał na: opracowaniu koncepcji badań, planowaniu eksperymentów, opiece nad hodowlami komórek nerwowych, przeprowadzaniu doświadczeń, wykonaniu analiz biochemicznych i molekularnych, opracowaniu analiz statystycznych oraz przygotowaniu figur. Ponadto byłam odpowiedzialna za pisanie manuskryptu, opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz przygotowanie ostatecznej formy publikacji.

2. Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPARγ-dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

polegał na: opracowaniu koncepcji badań, planowaniu eksperymentów, opiece nad hodowlami komórek nerwowych, prowadzeniu hodowli ludzkiej linii komórek mikrogleju HMC3, przeprowadzaniu doświadczeń, wykonaniu analiz biochemicznych i molekularnych, opracowaniu analiz statystycznych oraz przygotowaniu figur. Ponadto byłam odpowiedzialna za pisanie manuskryptu, opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz przygotowanie ostatecznej formy publikacji.



Ponadto oświadczam, że w opisowej części rozprawy doktorskiej zamieszczono część wyników (Fig. 3, 5, 6, 7, 8 i 10) z publikacji, w której pełnię rolę jednego z dwóch pierwszych autorów o takim samym wkładzie w powstanie publikacji:

3. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia*. *Biomedicines*. 2021 Jul 21;9(8):854. doi: 10.3390/biomedicines9080854.

Oświadczam, że mój udział w pracy nad tą częścią rozprawy doktorskiej polegał na: planowaniu eksperymentów, opiece nad hodowlami komórek nerwowych, przeprowadzaniu doświadczeń, wykonaniu analiz biochemicznych i molekularnych, opracowaniu analiz statystycznych oraz przygotowaniu figur. Ponadto byłam odpowiedzialna za pisanie manuskryptu, opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz przygotowanie ostatecznej formy publikacji.

Pozostałe wyniki wymienionej publikacji (Fig. 1, 2, 4 i 9) zostały wykorzystane w dziele habilitacyjnym dr hab. Agnieszki Wnuk.

  
Mgr Karolina Przepiórska-Drońska





**Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**

Prof. dr hab. Małgorzata Kajta  
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki  
Zakład Farmakologii Uzależnień  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polska Akademia Nauk

Kraków, 5.09.2024

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracach:

1. Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M. *Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation.* Mol Neurobiol. 2023 Feb;60(2):576-595. doi: 10.1007/s12035-022-03087-9.

2. Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status.* J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

polegał na: pozyskaniu funduszy na badania i opracowaniu ogólnej koncepcji pracy, zakładaniu pierwotnych hodowli neuronów *in vitro*, a także pomocy w planowaniu doświadczeń, pisaniu manuskryptów i przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji oraz udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. W obydwu publikacjach pełnię rolę autora korespondującego.



Ponadto oświadczam, że w opisowej części rozprawy doktorskiej zamieszczono część wyników (Fig. 3, 5, 6, 7, 8 i 10) z publikacji:

3. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia.* Biomedicines. 2021 Jul 21;9(8):854. doi: 10.3390/biomedicines9080854.

Mój udział w pracy nad tą częścią rozprawy doktorskiej polegał na: pozyskaniu funduszy na badania i opracowaniu ogólnej koncepcji pracy, zakładaniu pierwotnych hodowli neuronów *in vitro*, a także pomocy w planowaniu doświadczeń, pisaniu manuskryptu i przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji oraz udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. W wymienionej publikacji pełnię rolę autora korespondującego.

Pozostałe wyniki wymienionej publikacji (Fig. 1, 2, 4 i 9) zostały wykorzystane w dziele habilitacyjnym dr hab. Agnieszki Wnuk.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszych publikacji i wyników w postępowaniu doktorskim Pani mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej oraz oświadczam, że wyniki nie zostaną ponownie wykorzystane w innych postępowaniach o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego.



---

Prof. dr hab. Małgorzata Kajta





Dr hab. Agnieszka Wnuk  
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki  
Zakład Farmakologii Uzależnień  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polska Akademia Nauk

Kraków, 30.07.2024

### **Oświadczenie**

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M. *Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation*. Mol Neurobiol. 2023 Feb;60(2):576-595. doi: 10.1007/s12035-022-03087-9.

polegał na: pomocy w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów, wsparciu w wykonaniu analiz biochemicznych/molekularnych i analiz statystycznych. Dodatkowo, brałam udział w przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na pytania recenzentów.

2. Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

polegał na: pomocy w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów, wsparciu w wykonaniu analiz biochemicznych/molekularnych i analiz statystycznych oraz wsparciu finansowym badań. Dodatkowo, brałam udział w przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na pytania recenzentów.



Ponadto, oświadczam że w opisowej części rozprawy doktorskiej zamieszczono część wyników (Fig. 3, 5, 6, 7, 8 i 10) z publikacji, w której pełnię rolę jednego z dwóch pierwszych autorów o takim samym wkładzie w powstanie publikacji:

3. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia*. *Biomedicines*. 2021 Jul 21;9(8):854. doi: 10.3390/biomedicines9080854.

Pozostałe wyniki wymienionej publikacji (Fig. 1, 2, 4 i 9) zostały wykorzystane w moim dziele habilitacyjnym.

Oświadczam, że mój udział w pracy nad tą częścią rozprawy doktorskiej polegał na: pomocy w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów, wsparciu w wykonaniu analiz biochemicznych/molekularnych i analiz statystycznych. Dodatkowo, brałam udział w przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na pytania recenzentów.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszych publikacji i wyników w postępowaniu doktorskim Pani mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej oraz oświadczam, że wyniki nie zostaną ponownie wykorzystane w innych postępowaniach o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego.

---

Dr hab. Agnieszka Wnuk

Mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska  
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki  
Zakład Farmakologii Uzależnień  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polska Akademia Nauk

Kraków, 30.07.2024

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

polegał na: pomocy w prowadzeniu hodowli ludzkiej linii komórek mikrogleju HMC3, wykonaniu analiz biochemicznych oraz wsparciu w przygotowaniu figur do publikacji.

Ponadto, oświadczam że mój udział w pracy nad opisową częścią rozprawy doktorskiej opartą na publikacji:

2. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia*. Biomedicines. 2021 Jul 21;9(8):854. doi: 10.3390/biomedicines9080854.

polegał na: pomocy w przeprowadzaniu doświadczeń, wykonaniu analiz biochemicznych, wsparciu w przygotowaniu figur.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji i wyników w postępowaniu doktorskim Pani mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej oraz oświadczam, że wyniki nie zostaną ponownie wykorzystane w innych postępowaniach o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego.

Pietrzak - Waw. B.

Mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska



**Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**

Mgr inż. Andrzej Łach  
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki  
Zakład Farmakologii Uzależnień  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polska Akademia Nauk

Kraków, 30.07.2024

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

polegał na: pomocy w wykonaniu analiz biochemicznych i udziale w przygotowaniu figur.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w postępowaniu doktorskim Pani mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej oraz oświadczam, że wyniki nie zostaną ponownie wykorzystane w innych postępowaniach o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego.

---

Mgr inż. Andrzej Łach



Univ.-Prof. Dr. hum. biol. Cordian Beyer  
Institutsdirektor  
Institut für Neuroanatomie  
Uniklinik RWTH Aachen

Aachen, 25.07.2024

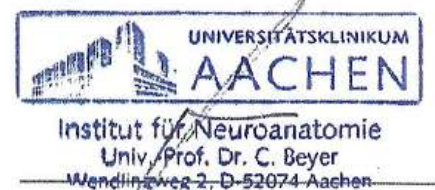
### Declaration

I declare, that my involvement in the publication:

1. Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M. *Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation*. Mol Neurobiol. 2023 Feb;60(2):576-595. doi: 10.1007/s12035-022-03087-9. Epub 2022 Nov 3.

consisted of writing the original draft of the manuscript.

I hereby consent to the use of the publication in the doctoral proceedings of Mrs. Karolina Przepiórska-Drońska, and declare that the results will not be reused in other proceedings to confer a doctoral or post-doctoral degree.



Univ.-Prof. Dr. hum. biol. Cordian Beyer



UNIwersytet Rolniczy  
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Prof. dr hab. Anna K. Wójtowicz  
Katedra Żywnienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa  
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 04.09.2024

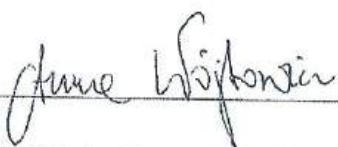
### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9

polegał na opiece merytorycznej nad prowadzeniem hodowli ludzkiej linii komórek mikrogleju HMC3.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w postępowaniu doktorskim Pani Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej oraz oświadczam, że wyniki nie zostaną ponownie wykorzystane w innych postępowaniach o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego.

  
Prof. dr hab. Anna K. Wójtowicz



UNIWERSYTET ROLNICZY  
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Dr inż. Weronika Biernat  
Katedra Żywnienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa  
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 25.07.2024

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy:

1. Przepiórska-Drońska K, Wnuk A, Pietrzak-Wawrzyńska BA, Łach A, Biernat W, Wójtowicz AK, Kajta M. *Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status*. J Neuroimmune Pharmacol. 2024 Jul 1;19(1):34. doi: 10.1007/s11481-024-10135-9.

polegał na pomocy w prowadzeniu hodowli ludzkiej linii komórek mikrogleju HMC3.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w postępowaniu doktorskim Pani Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej oraz oświadczam, że wyniki nie zostaną ponownie wykorzystane w innych postępowaniach o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego.

Weronika Biernat

Dr inż. Weronika Biernat



# Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation

Karolina Przepiórska<sup>1</sup> · Agnieszka Wnuk<sup>1</sup> · Cordian Beyer<sup>2</sup> · Małgorzata Kajta<sup>1</sup> 

Received: 5 May 2022 / Accepted: 10 October 2022 / Published online: 3 November 2022  
© The Author(s) 2022

## Abstract

Amorfrutin B is a selective modulator of the PPAR $\gamma$  receptor, which has recently been identified as an effective neuroprotective compound that protects brain neurons from hypoxic and ischemic damage. Our study demonstrated for the first time that a 6-h delayed post-treatment with amorfrutin B prevented hypoxia/ischemia-induced neuronal apoptosis in terms of the loss of mitochondrial membrane potential, heterochromatin foci formation, and expression of specific genes and proteins. The expression of all studied apoptosis-related factors was decreased in response to amorfrutin B, both during hypoxia and ischemia, except for the expression of anti-apoptotic BCL2, which was increased. After post-treatment with amorfrutin B, the methylation rate of the pro-apoptotic *Bax* gene was inversely correlated with the protein level, which explained the decrease in the BAX/BCL2 ratio as a result of *Bax* hypermethylation. The mechanisms of the protective action of amorfrutin B also involved the inhibition of autophagy, as evidenced by diminished autophagolysosome formation and the loss of neuroprotective properties of amorfrutin B after the silencing of *Becn1* and/or *Atg7*. Although post-treatment with amorfrutin B reduced the expression levels of *Becn1*, *Nup62*, and *Ambra1* during hypoxia, it stimulated *Atg5* and the protein levels of MAP1LC3B and AMBRA1 during ischemia, supporting the ambiguous role of autophagy in the development of brain pathologies. Furthermore, amorfrutin B affected the expression levels of apoptosis-focused and autophagy-related miRNAs, and many of these miRNAs were oppositely regulated by amorfrutin B and hypoxia/ischemia. The results strongly support the position of amorfrutin B among the most promising anti-stroke and wide-window therapeutics.

**Keywords** Hypoxia · Ischemia · Perinatal asphyxia · Stroke · PPAR $\gamma$  · Autophagy

## Introduction

Stroke is the most common cerebrovascular disease, and approximately 85% of stroke cases are of ischemic origin, resulting from vessel occlusion and impaired blood flow to the brain. Data suggest that 1/3 of patients with stroke die, pointing to the ineffectiveness of current therapies. In addition to stroke, perinatal asphyxia is another neurological disorder that leads to the death of 4 million newborns per

year globally [1]. The dysregulation of gas exchange leads to metabolic acidosis of organs, including the brain, and results in ischemic encephalopathy [2]. Current therapies for ischemic stroke and perinatal asphyxia are recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) and hypothermia; however, these therapies have several limitations, including a narrow therapeutic window (up to 6 h) and other adverse effects [3, 4]. For this reason, patients are often not admitted to treatment, which prompts the search for new therapies against stroke and perinatal asphyxia.

Disruption of blood and oxygen supply to the brain leads to a cascade of pathological responses and subsequent cell death. The main mechanism in hypoxic and hypoxic-ischemic brain injury is excitotoxicity, resulting from excessive accumulation of calcium and membrane depolarization [5]. It sequentially leads to dysfunction of mitochondria and apoptosis, a form of programmed cell death characterized by DNA fragmentation, apoptosis-associated heterochromatin

✉ Małgorzata Kajta  
kajta@if-pan.krakow.pl

<sup>1</sup> Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Department of Pharmacology, Laboratory of Neuropharmacology and Epigenetics, Smetna Street 12, 31–343 Krakow, Poland

<sup>2</sup> Institute of Neuroanatomy, Medical Faculty, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany



foci and apoptotic body formation. An intermediary chromatin remodeling state that relies on formation of apoptosis-associated heterochromatin foci finally leads to apoptotic body formation [6, 7]. It is highly connected with autophagy (“self-eating”), which may have protective involvement or pro-apoptotic favor under ischemic or hypoxic conditions. Although some studies propose protective involvement of autophagy in cerebral ischemia, others suggest that autophagy may switch the neuronal injury to apoptosis and cell death under ischemic or hypoxic conditions [8, 9]. Apoptosis and autophagy can be regulated *via* miRNAs, small noncoding RNAs that downregulate gene expression by mRNA cleavage or translational repression [10]. Recent studies have shown that the differential expression of miRNAs (e.g., *miR-124* and *miR-181b*) in the brain has a pivotal role in the pathological mechanism of stroke and cerebral asphyxia, and the potential use of miRNA antagonists may be a promising direction for the improvement of pharmacotherapy [11, 12].

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) is a ligand-activated transcription factor that functions to regulate insulin sensitivity, glucose and lipid metabolism, as well as cell proliferation and inflammation [13, 14]. Due to its ability to adjust many key metabolic processes, it is considered a promising pharmacological target in chronic neurological conditions. The compounds investigated in the context of neuroprotection are thiazolidinediones (TZDs), PPAR $\gamma$  full agonists, which were originally found to have applications as antidiabetic drugs. TZDs such as pioglitazone and rosiglitazone improve the survival of neurons and glial cells during ischemic damage by reducing inflammation and exhibiting antiatherosclerotic properties [15]. Unfortunately, recent research reports about the hepatotoxicity and cardiotoxicity of TZDs resulting in partial withdrawal of these compounds from the pharmaceutical market [16, 17].

Amorfrutin B isolated from *Amorpha fruticosa* is a selective PPAR $\gamma$  modulator (SPPAR $\gamma$ M) that may have a safer pharmacological profile than TZDs. In comparison to full agonists, SPPAR $\gamma$ M activate the receptor in a specific way by modulating the interaction of PPAR $\gamma$  with transcriptional activators or repressors [18]. Recent studies have indicated that the application of amorfrutin B may constitute a promising approach to treat insulin resistance, type 2 diabetes, or metabolic liver diseases [19–21]. Importantly, in diabetes and diet-induced obese mouse models, the compound did not show side effects of TZDs, such as osteoblastogenesis, weight gain, and fluid retention [21]. Among many compounds, amorfrutin B has the lowest binding affinity constant ( $K_i$ ) to purified PPAR $\gamma$ , which makes this compound the most selective and potent SPPAR $\gamma$ M [22]. Moreover, amorfrutin B is a highly lipophilic molecule that crosses the blood–brain barrier (BBB) and accumulates in brain tissue, which is a desirable feature of potential drugs directed

against diseases of the central nervous system [23]. Despite the aforementioned studies, little is known about the potential of amorfrutin B in the treatment of neural degeneration caused by hypoxia and ischemia. Our recent study showed that amorfrutin B, administered even 6 h after injury, evokes a strong neuroprotective effect against hypoxia and ischemia by increasing the viability of neuronal cells and mitochondrial integrity as well as reducing oxidative stress and the accompanying DNA damage. The neuroprotective effect of amorfrutin B involves PPAR $\gamma$  activation and epigenetic modifications, which position this compound among the most promising anti-stroke therapeutics [24].

Due to the diverse etiologies and courses of hypoxic and ischemic injuries, it is crucial to achieve neuroprotective effects against various mechanisms accompanying neurodegeneration. For this reason, the current research is the first to check the effectiveness of amorfrutin B in relation to apoptosis and autophagy. Moreover, the research includes the analysis of the epigenetic status of neuronal cells specifying the miRNA profile. Multidirectional analysis of the action of amorfrutin B would help to define the features of this potential drug that possesses neuroprotective capacity against hypoxia and ischemia within a wide therapeutic window.

## Methods

### Materials

The JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK, TDZD 8, and SB 203580 were purchased from Abcam (Cambridge, Great Britain). A hypoxia modular incubator chamber was obtained from Billups-Rothenberg, Inc. (San Diego, CA, USA). Phosphate-buffered saline (PBS) was purchased from BIOMED LUBLIN (Lublin, Poland). The CYTO-ID® Autophagy detection kit was from Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, USA). B27 and neurobasal media were obtained from Gibco (Grand Island, NY, USA). The oxygen analyzer was from Greisinger (Regenstauf, Germany). Bradford reagent was obtained from Bio-Rad Laboratories (Munich, Germany). The cytotoxicity detection kit was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). ELISA kits for FAS, FASL, BAX, BCL2, GSK3 $\beta$ , BECN1, ATG7, and MAP1LC3B were purchased from Bioassay Technology Laboratory (Shanghai, China). An ELISA kit for AMBRA1 was purchased from ELK Biotechnology (Wuhan, China). The culture plates were obtained from TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Switzerland). The *Becn1* and *Atg7* siRNAs were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Amorfrutin B, Z-DQMD-FMK, SP600125, temsirolimus, SBI-0206965, spautin-1,

MRT68921, *L*-glutamine, fetal bovine serum (FBS), dimethyl sulfoxide (DMSO), radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) buffer, protease inhibitor cocktail for mammalian tissues, penicillin–streptomycin antibiotics, and poly-*L*-ornithine hydrobromide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). AllStars Negative Control siRNA, the RNeasy Mini Kit, the EpiTect MethyLight PCR kit, the EpiTect Bisulfite kit, and the miRNeasy Mini kit were obtained from Qiagen (Hilden, Germany). INTERFERin was obtained from PolyPlus Transfection (Illkirch, France). Sets of TaqMan probes (fully methylated and fully unmethylated probes for the *Bax*, *Bcl2*, *Ambra1*, *Map1lc3b*, *Atg7*, and *Becn1* promoters and the *Hprt1* reference), the High-Capacity cDNA-Reverse Transcription Kit, TaqMan Gene Expression Master Mix, and TaqMan probes for specific genes encoding *Hprt1*,  $\beta$ -actin, *Gapdh*, *Fas*, *Fasl*, *Bax*, *Bcl2*, *Gsk3b*, *Becn1*, *Atg5*, *Atg7*, *Map1lc3a*, *Map1lc3b*, *Nup62*, and *Ambra1* were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Quick-gDNA™ MicroPrep and EZ DNA Methylation-Gold™ kits were obtained from ZymoResearch (Irvine, CA, USA).

### Primary Neuronal Cultures of Neocortical Cells

All experiments were conducted on primary cultures of mouse neocortical neurons, which were cultured as previously described [25]. Neuronal cells were isolated from neocortical tissues from Swiss CD1 mouse strain embryos at 15 days of gestation (Charles River, Germany) and plated at a density of  $2.0 \times 10^5$  cells per  $\text{cm}^2$  on poly-*L*-ornithine-coated multiwell dishes. The cells were suspended in phenol red-free neurobasal medium containing fetal bovine serum, B27, *L*-glutamine, and penicillin–streptomycin antibiotics. The cultures were maintained in a humidified atmosphere (37 °C with 5% (vol/vol)  $\text{CO}_2$ ), and the experiments were conducted at 7 days *in vitro* (DIV). The number of astrocytes was assessed by the content of intermediate filament glial fibrillary acidic protein (GFAP) and did not exceed 10%, as previously described [26]. All animals used in the research were maintained according to the principles of the Three Rs. The experiments were conducted in compliance with European Union Legislation (Directive 2010/63/EU, amended by Regulation (EU) 2019/1010) and approved by the Bioethics Commission as being compliant with Polish Law (21 August 1997).

### Experimental Models of Hypoxia and Ischemia

#### Hypoxia

The hypoxic conditions were evoked by placing the cultures in a prewarmed and humidified hypoxia modular incubator chamber (Billups-Rothenberg, Inc., CA, USA) with 95%

$\text{N}_2/5\% \text{CO}_2$  for 6 h as previously described [24]. The  $\text{O}_2$  level in the chamber was measured with an oxygen analyzer (Greisinger, Germany) and reached less than 0.5%. After 6 h, the neurobasal medium was replaced with standard medium, and the treatment occurred for the next 18 h, i.e., during the reoxygenation period (post-treatment).

#### Ischemia

To induce ischemic conditions, the neurobasal medium was replaced with medium without glucose, and cultures were placed in a prewarmed and humidified hypoxia modular incubator chamber (Billups-Rothenberg, Inc., CA, USA) with 95%  $\text{N}_2/5\% \text{CO}_2$  for 6 h. The  $\text{O}_2$  level in the chamber was measured with an oxygen analyzer (Greisinger, Germany) and reached less than 0.5%. After 6 h, the medium without glucose was replaced with standard medium, and the treatment occurred for the next 18 h of the reoxygenation period (post-treatment).

#### Treatment

After 6 h of hypoxic/ischemic conditions, i.e., during the reoxygenation period, the culture medium was replaced with standard medium, and treatment with amorfrutin B occurred for the next 18 h (post-treatment). To determine the contribution of apoptotic signaling, we used Z-IETD-FMK (caspase-8 inhibitor; 40  $\mu\text{M}$ ), Z-LEHD-FMK (caspase-9 inhibitor; 40  $\mu\text{M}$ ), Z-DQMD-FMK (caspase-3/6 inhibitor; 40  $\mu\text{M}$ ), TDZD 8 (GSK3 $\beta$  inhibitor; 1  $\mu\text{M}$ ), SP600125 (JNK inhibitor; 1  $\mu\text{M}$ ) and SB 203580 (p38 MAPK inhibitor; 1  $\mu\text{M}$ ), which were administered in the same paradigm as amorfrutin B. To assess the contribution of autophagic signaling, we used temsirolimus (mTOR inhibitor, 1  $\mu\text{M}$ ), SBI-0206965 (ULK1 inhibitor, 1  $\mu\text{M}$ ), spautin-1 (USP10 and USP13 inhibitor, 1  $\mu\text{M}$ ), and MRT68921 dihydrochloride (ULK1 and ULK2 inhibitor, 1  $\mu\text{M}$ ), which were also administered in the same paradigm as amorfrutin B. To avoid nonspecific effects, amorfrutin B and all inhibitors were administered at concentrations that did not change the control levels of lactate dehydrogenase (LDH) release under normoxic conditions. According to our previous data [24], we decided to use amorfrutin B at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  because it caused the strongest neuroprotective effect under hypoxic and ischemic conditions. The exception was the siRNA experiment in which we used two concentrations of amorfrutin B, i.e., 1 and 5  $\mu\text{M}$ . Moreover, the post-treatment was selected (after 6 h of hypoxia and/or ischemia) to reflect the terms of the potential clinical therapy. Cell cultures were maintained in a humidified incubator (37 °C with 5% (vol/vol)  $\text{CO}_2$ ), and after 18 h, the biological material was collected for further analysis.

## Assessment of LDH release

Lactate dehydrogenase is an enzyme involved in energy production and is released into the environment in response to cell damage. After the experiments, the cell-free supernatants were collected and used to measure the amount of LDH, as previously described [27]. According to the manufacturer's instructions, the supernatants were incubated with the appropriate reagent mixture from the Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Switzerland) at RT for 30–60 min. The intensity of the red color was measured at a wavelength of 490 nm using an Infinite M200pro microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) and was proportional to the amount of cells damaged in response to hypoxia/ischemia. The data were analyzed with i-control software and are presented as a percentage of the control value  $\pm$  SEM.

## Assessment of the Mitochondrial Membrane Potential

The JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Abcam, Cambridge, Great Britain) was used to measure mitochondrial membrane potential changes in neuronal cells after hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment. JC-10 is a lipophilic dye that enters mitochondria and reversibly changes its color from green to orange, which is detected as an increase in membrane potential. JC-10 dye-loading solution was added to the cell plate and incubated with the cells for 1 h at 37 °C as previously described [28]. After adding Assay Buffer B to the dye-loading plate, the fluorescence was monitored at  $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$  with an Infinite M200pro microplate reader (Tecan Männedorf, Switzerland). The fluorescence intensity was used for the ratio analysis, and the results are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM.

## Fluorescent Staining with CYTO-ID® and Hoechst 33342

The cultures were grown on coverslips and exposed to hypoxic or ischemic conditions for 6 h at 7 DIV. Neuronal cells were treated with amorfrutin B (tested compound), DMSO (solvent/negative control), or rapamycin (positive control) during the reoxygenation period. After 18 h of treatment, the medium was removed, and the cells were washed with assay buffer. A CYTO-ID green detection kit containing a cationic amphiphilic tracer (CAT) dye and Hoechst 33342 was added to each well, and the plates were incubated at 37 °C in the absence of light. Selective staining with CAT dye allowed the measurement of autophagolysosome accumulation. Fusion between autophagosomes and lysosomes forms autophagolysosomes where degradation of the cytoplasmic contents occurs [29]. Cells with

Hoechst 33342 stained bright blue heterochromatin foci, indicating condensed chromatin; an intermediary chromatin remodeling state that relies on formation of apoptosis-associated heterochromatin foci has been suggested to be a marker of apoptosis [6]. After 30 min, the cells were washed with assay buffer, and the coverslips were placed on microscope slides. The stained cells were analyzed by a Leica TCS SP8 WLL confocal laser scanning microscope (DMi8-CS, Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) at 60 $\times$  magnification as recommended by the manufacturer's instructions. To quantify the fluorescence signal corresponding to enhanced accumulation of autophagolysosomes, the frequency of the brightest pixels in the region of interest (ROI) was measured. The pixel intensity was assessed using ImageJ software. The mean fluorescence intensity (MFI) was calculated according to the following formula:  $\text{MFI} = \text{MFI of an ROI} - \text{MFI of background}$ .

## qPCR Analysis of Apoptosis- and Autophagy-Related Genes

After hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment, the total RNA was extracted from neocortical cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), as previously described [30]. The amount of RNA was assessed at 260 nm and 260/280 nm with a NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The purity of RNA was accepted when the A260/A280 ratio was  $\sim 2.0$ . The RNA extract was used as a cDNA template and reverse-transcribed using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The obtained cDNA was amplified using the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method. Both reverse transcription and qPCR were run on a CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For amplification, we used a solution containing 1  $\mu\text{l}$  cDNA, 10  $\mu\text{l}$  FastStart Universal Probe Master, 1  $\mu\text{l}$  TaqMan Gene Expression Assay mix, and 8  $\mu\text{l}$  RNase-free water. The chosen TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, USA) were specific for apoptosis-related (*Fas*, *Fasl*, *Bax*, *Bcl2*, and *Gsk3b*) and autophagy-related genes (*Becn1*, *Atg5*, *Atg7*, *Map1lc3a*, *Map1lc3b*, *Nup62*, and *Ambra1*). The qPCR procedure consisted of a series of following temperature changes: 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The qPCR process was performed using a CFX96 Real-Time system (Bio-Rad, USA), and the data were analyzed using the delta Ct method. The following algorithms, i.e., geNorm, NormFinder, BestKeeper and delta Ct, selected *Hprt1* (instead of  $\beta$ -actin and *Gapdh*) as the most stable reference gene. The results are presented as fold changes  $\pm$  SEM.

## Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Apoptosis- and Autophagy-Related Proteins

The neocortical cells that had undergone hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment were lysed and sonicated in ice-cold RIPA lysis buffer with a protease inhibitor cocktail. After centrifugation (15,000×g for 20 min at 4°C), the supernatants were collected, and the protein concentration was assessed using the Bradford method. The expression levels of apoptosis- (FAS, FASL, BAX, BCL2, and GSK3β) and autophagy-related (BECN1, ATG7, MAP1LC3B, and AMBRA1) proteins were assessed using enzyme-linked immunosorbent mouse-specific assays (Bioassay Technology Laboratory, China; ELK Biotechnology, China). The standards and samples were attached to the biotin-conjugated polyclonal antibodies in each well. Then, streptavidin-HRP was added, and all wells were washed with buffer. The reaction was completed by adding the substrate and acidic stop solution, which resulted in a color change from yellow to blue. The absorbance was measured at 450 nm using an Infinite M200PRO microplate reader, and the values were correlated with the amounts of the specific proteins. The data are presented as a percentage of the control value ± SEM and pg/mg of total protein.

## Silencing of Autophagy-Related Genes Using Specific siRNAs

To inhibit the expression of the *Becn1* and *Atg7* genes in neocortical cells, specific *Becn1* and *Atg7* siRNAs (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) were used as previously described [31]. The siRNAs (at a final concentration of 50 nM) containing transfection reagent (INTERFERin) were applied in antibiotic-free medium for 7 h. After transfection, the culture medium was replaced with standard medium containing antibiotics, and neuronal cells were incubated until the next day of the experiment. Control cells were transfected with negative siRNA, i.e., scrambled sequence that did not lead to specific degradation of any known cellular mRNA. To verify the mRNA silencing, we measured the expression levels of specific mRNAs. As previously described, *Becn1* and *Atg7* expression levels decreased by 68% and 57%, respectively [31].

## Assessment of the Methylation of Apoptosis- and Autophagy-Related Gene Promoters

To extract genomic DNA from neuronal cells, a Quickg-DNA™ MicroPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA) was used according to the manufacturer's protocol. The quantity of DNA was rated spectrophotometrically at 260 nm and 260/280 nm using a NanoDrop ND-1000 UV–Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Next,

the EpiTect Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Germany) was applied to denature DNA and perform bisulfite conversion. To detect changes in DNA methylation status, the EpiTect MethyLight PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sets of TaqMan probes were used. Sets were designed for the bisulfite-converted DNA sequences and represented: (i) fully methylated and fully unmethylated probes for the *Bax*, *Bcl2*, *Ambra1*, *Map1lc3b*, *Atg7*, and *Becn1* promoters, (ii) the internal reference set for the *Hprt1* gene to control for input DNA. Quantitative real-time polymerase chain reaction (MethyLight) was performed as previously described [30], and the EpiTect MethyLight assays enabled the calculation of the degree of methylation according to the following formula:  $\Delta\Delta Ct = \text{methylated signal (Ct target gene)} - \text{Ct Hprt1} - \text{unmethylated signal (Ct target gene)} - \text{Ct Hprt1}$ . The results are presented as the methylation rate ± SEM.

## qPCR Analysis of Specific Apoptosis-Focused miRNAs Determined Using the RT2 Profiler PCR Array

miRNA was isolated from neuronal cell cultures using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified spectrophotometrically at 260 nm and 260/280 nm with a NanoDrop ND-1000 UV–Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Reverse transcription to cDNA was performed using a miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A reaction mixture consisting of our template miRNA and reverse transcription master mix was incubated for 60 min at 42 °C and 5 min at 95 °C. To analyze apoptosis-focused miRNA expression, the MiRCURY LNA miRNA Focus Panel (Qiagen, Hilden, Germany) was used according to the manufacturer's protocol. Both RT and qPCR were performed with the CFX96 Real-Time System (Bio–Rad, Hercules, CA, USA). Ct values were analyzed using GeneGlobe Qiagen web-based software, and the reference genes were U6 snRNA (v2), 5S rRNA, RNU5G, and RNU1A1. Fold changes are presented as heatmaps, which were visualized in Python 3 using the Seaborn module.

## Statistical Analysis

The statistical analysis of the data was performed using raw data measured as the absorbance or fluorescence units per well containing 50,000 cells for the LDH and JC-10 assay; the fluorescence units per 1.5 million cells for qPCR; and the pg of FAS, FASL, BAX, BCL2, GSK3β, ATG7, BECN1, MAP1LC3B, and AMBRA1 per mg of total protein for the ELISAs. To determine overall significance, an analysis of variance (ANOVA) and Levene's test of homogeneity of variances were used. The differences between the control and experimental groups were defined with a post hoc Newman–Keuls test. Significant differences were marked in



the following ways: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  (compared to the control groups), # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , and ### $p < 0.001$  (compared to the cultures exposed to hypoxia), ^ $p < 0.05$ , ^^ $p < 0.01$ , and ^^ $p < 0.001$  (compared to the cultures exposed to ischemia), and \$\$\$ $p < 0.001$  (compared to negative control, scrambled siRNA). The results for qPCR and ELISAs are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The results for LDH release and JC-10 and fluorescence intensity are presented as the percentage of the control  $\pm$  SEM. In case of LDH release measurement and JC-10 test, the results were obtained from 3 independent experiments, and the number of replicates ranged from 8 to 12. The results from qPCR, ELISA, and gene specific methylation level were obtained from 3 independent experiments, and the number of replicates ranged from 5 to 6. The fluorescence intensity was measured based on 5 replicates. In case of microarray analysis, the results are based on 5 replicates for each experimental group. The effect of amorfrutin B administration on cells under normoxic conditions is presented as the supplementary material (Table S1 and Fig. S1).

## Results

### Apoptosis- and Autophagy-Related Pathways Are Involved in Hypoxia- and Ischemia-Induced Neuronal Cell Death

In the present study, 6 h of hypoxia followed by 18 h of reoxygenation induced LDH release up to 176% of the normoxic value. Post-treatment with apoptosis-related inhibitors of caspases-9 and -3/6 (Z-LEHD-FMK and Z-DQMD-FMK, respectively) as well as JNK and p38 MAPK kinases (SP600125, SB 203,580) resulted in LDH activity decreases to 139%, 146%, 151%, and 139% of the control, respectively. In turn, the administration of Z-IETD-FMK (caspase-8 inhibitor) and TDZD 8 (GSK3 $\beta$  inhibitor) did not have a statistically significant effect on LDH levels under hypoxic conditions. Except for temsirolimus (mTOR inhibitor), specific inhibitors of kinases ULK1 and ULK1/ULK2 (SBI-0206965 and MRT68921 dihydrochloride) as well as hydrolases USP10/USP13 (Spautin-1) involved in the process of autophagy decreased LDH release to 138%, 141%, and 134% of the control, respectively (Fig. 1a).

A model of 6-h ischemia followed by 18 h of reoxygenation resulted in an increase in the activity of LDH to 339% of the normoxic value. All apoptosis-related inhibitors of caspase-8, -9, -3/6, GSK3 $\beta$ , JNK, and p38 MAPK (Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK, Z-DQMD-FMK, TDZD 8, SP600125, and SB 203580) reduced LDH activity to 290%, 292%, 274%, 283%, 280%, and 276% of the control, respectively. In addition, specific inhibitors of mTOR, ULK1, USP10/USP13, and ULK1/ULK2 involved in the process

of autophagy, i.e., temsirolimus, SBI-0206965, spautin-1, and MRT68921 dihydrochloride, decreased LDH release to 304%, 301%, 273%, and 271% of the control, respectively (Fig. 1b).

### Post-treatment with Amorfrutin B Partially Reversed Hypoxia- and Ischemia-Reduced Mitochondrial Membrane Potential

In this study, 6 h of hypoxia/ischemia and 18 h of reoxygenation led to mitochondrial membrane potential decreases to 42% and 35% of the normoxic value, respectively. Post-treatment with amorfrutin B partially reversed the effects of hypoxia and ischemia, i.e., the mitochondrial membrane potential reached 85% and 54% of the control (Fig. 2).

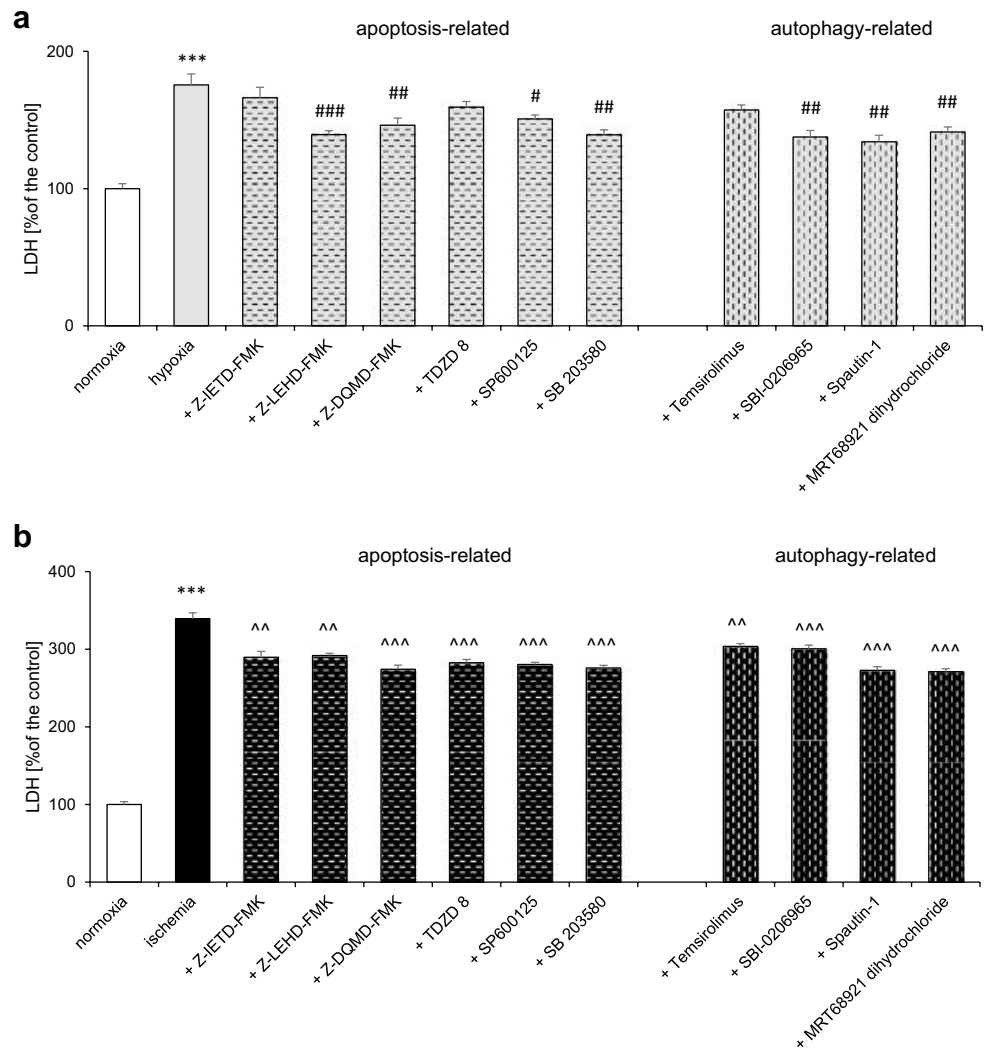
### Post-treatment with Amorfrutin B Reduced the Formation of Apoptosis-Associated Heterochromatin Foci and Autophagolysosomes in Hypoxia/Ischemia-Exposed Neocortical Cells

Both hypoxia and ischemia induced apoptosis in neuronal cell cultures, which was manifested by the formation of apoptosis-associated heterochromatin foci visible as bright blue condensed chromatin labeled with Hoechst 33342. Post-treatment with amorfrutin B reduced chromatin remodeling. The CYTO-ID labeling and intensity quantification method showed the formation of autophagolysosomes in neurons undergoing hypoxia and ischemia, which was indicated by increased levels of MFI from 4.19 in normoxia to 23.54 in hypoxia and 42.91 in ischemia. Administration of amorfrutin B resulted in inhibition of autophagolysosome formation in the case of hypoxia (MFI reached 4.71); however, the compound only partially reversed autophagolysosome formation in the case of ischemia (MFI reached 22.11). Our study included a positive control indicating the formation of autophagolysosomes after treatment with the autophagy inducer—rapamycin (Fig. 3).

### Post-treatment with Amorfrutin B Normalized the Expression Levels of Apoptosis-Related Genes and Proteins in Neuronal Cells Exposed to Hypoxia/Ischemia

In neuronal cell cultures exposed to hypoxia, expression levels of apoptosis-related genes, i.e., *Fas* (2.68-fold increase) and *Bax* (0.33-fold increase) were increased, compared to the control group. Amorfrutin B administered 6 h after the initiation of hypoxic damage diminished the expression levels of *Bax* and *Gsk3 $\beta$*  to 0.93- and 0.80-fold of the control values, respectively. Ischemia induced increases in the expression levels of the following genes: *Fas* (19.02-fold increase), *Bax* (0.90-fold increase), *Bcl2* (1.49-fold increase), and *Gsk3 $\beta$*

**Fig. 1** Hypoxia and ischemia evoked cell death *via* apoptosis- and autophagy-related pathways in primary neocortical cell cultures. Post-treatment with apoptosis- and autophagy-related inhibitors of caspases, kinases, and hydrolases decreased hypoxia- (a) and ischemia-induced (b) LDH release depending on the model. The results are presented as a percentage of the control ± SEM of 3 independent experiments, consisting of 8–12 replicates per group. \*\*\**p* < 0.001 compared to the control group, #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared to the cultures exposed to hypoxia, ^^*p* < 0.01, ^^^*p* < 0.001 compared to the cultures exposed to ischemia



apoptosis-related					
Z-IETD-FMK	Z-LEHD-FMK	Z-DQMD-FMK	TDZD 8	SP600125	SB 203580
caspase-8 inhibitor	caspase-9 inhibitor	caspase-3/6 inhibitor	GSK3β inhibitor	JNK inhibitor	p38 MAPK inhibitor

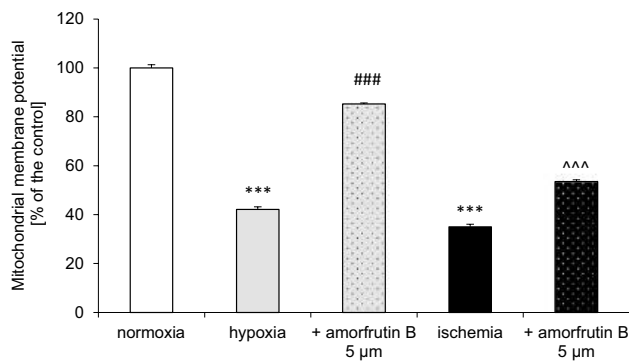
  

autophagy-related			
Temsirolimus	SBI-0206965	Spautin-1	MRT68921 dihydrochloride
mTOR inhibitor	ULK1 inhibitor	USP10 and USP13 inhibitor	ULK1 and ULK2 inhibitor

(0.19-fold increase) compared to normoxia. In this model, post-treatment with amorfrutin B decreased the expression levels of *Fas* and *Bcl2* to 13.74- and 1.98-fold of the control values, respectively. The exception was *Fasl*, whose mRNA expression level did not change after hypoxia, ischemia, or amorfrutin B post-treatment (Fig. 4a).

ELISA analyses revealed that the levels of all apoptosis-related proteins were enhanced due to both hypoxic and ischemic conditions. Under hypoxia, FAS, FASL, BAX, BCL2, and GSK3β protein levels increased to 231%, 142%, 156%, 220%, and 192% (equal to 0.15, 189.36, 29.25, 3.22, 4.62 pg per mg of total protein) of the normoxic value, respectively. In response to amorfrutin B post-treatment

after hypoxia, the protein expression levels decreased to 70% (0.05 pg/mg) in case of FAS, 64% (85.96 pg/mg) in case of FASL, 89% (16.66 pg/mg) in case of BAX, and 59% (1.42 pg/mg) in case of GSK3β compared to the normoxic value. In turn, the BCL2 protein level increased to 394% (5.77 pg/mg) of the control after administration of amorfrutin B. Similarly, the protein expression levels of FAS, FASL, BAX, BCL2, and GSK3β increased to 234%, 149%, 172%, 363%, and 313% (equal to 0.16, 198.88, 32.35, 5.32, 7.53 pg per mg of total protein) of the control in response to ischemic conditions. Amorfrutin B post-treatment after ischemia reduced the protein levels of FAS (140%, 0.09 pg/mg), FASL (109%, 145.03 pg/mg), BAX (140%, 26.36 pg/



**Fig. 2** Post-treatment with amorfrutin B partially reversed hypoxia- and ischemia-induced loss of mitochondrial membrane potential. The results are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, consisting of 8–12 replicates per group. \*\*\* $p < 0.001$  compared to the control group, ### $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia, ^^ $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia

mg), and GSK3 $\beta$  (60%, 1.45 pg/mg). However, the expression level of BCL2 increased to 614% (8.99 pg/mg) of the control after exposure to the compound (Fig. 4b).

### Amorfrutin B Interfered with the Autophagy-Related mRNA and Protein Expression Levels After Exposure to Hypoxia and Ischemia

In our research, qPCR analysis showed that all autophagy-related genes were excessively expressed due to hypoxia and ischemia, except *Map11c3a*, whose expression remained unchanged in both models. Under hypoxic conditions, there were increases in the expression levels of *Becn1* (0.25-fold increase), *Atg5* (0.23-fold increase), *Atg7* (0.4-fold increase), *Map11c3b* (0.34-fold increase), *Nup62* (0.24-fold increase), and *Ambra1* (0.2-fold increase). Exposure to amorfrutin B 6 h after hypoxic injury resulted in a decrease in the mRNA expression levels of *Becn1* to 1.05-fold, *Nup62* to 0.99-fold, and *Ambra1* to 0.93-fold. In response to ischemia, mRNA expression of *Becn1* (0.48-fold increase), *Atg5* (0.62-fold increase), *Atg7* (1.02-fold increase), *Map11c3b* (0.39-fold increase), *Nup62* (0.5-fold increase), and *Ambra1* (0.21-fold increase) was upregulated. Amorfrutin B post-treatment only increased the expression of *Atg5* to 1.78-fold, and the expression levels of other genes did not change (Fig. 5a).

ELISA analyses showed that only the BECN1 expression level increased to 135% (equal to 11.37 pg per mg of total protein) of the control under ischemic conditions and remained unchanged under hypoxic conditions. The levels of other autophagy-related proteins (ATG7, MAP1LC3B, and AMBRA1) did not differ significantly between the hypoxia/ischemia conditions and the control normoxia. Amorfrutin B did not affect the levels of any autophagy-related proteins

under hypoxic conditions. However, post-treatment with amorfrutin B after 6 h of ischemia increased the protein levels of MAP1LC3B (130%, 1.23 pg/mg) and AMBRA1 (123%, 12.30 pg/mg), while the expression levels of other proteins (BECN1 and ATG7) remained unchanged (Fig. 5b). During ischemia, overexpression of MAP1LC3B and AMBRA1 after amorfrutin B post-treatment could be related to other than autophagy-related functions of these proteins. An increase in MAP1LC3B expression level can be associated with neuronal structure improvement [32], whereas overexpression of AMBRA1 may predispose cells to avoid apoptosis and promote their survival [33].

### Silencing of *Becn1* and/or *Atg7* Reduced the Neuroprotective effects of Amorfrutin B Against Hypoxia- and Ischemia-Induced Cell Damage

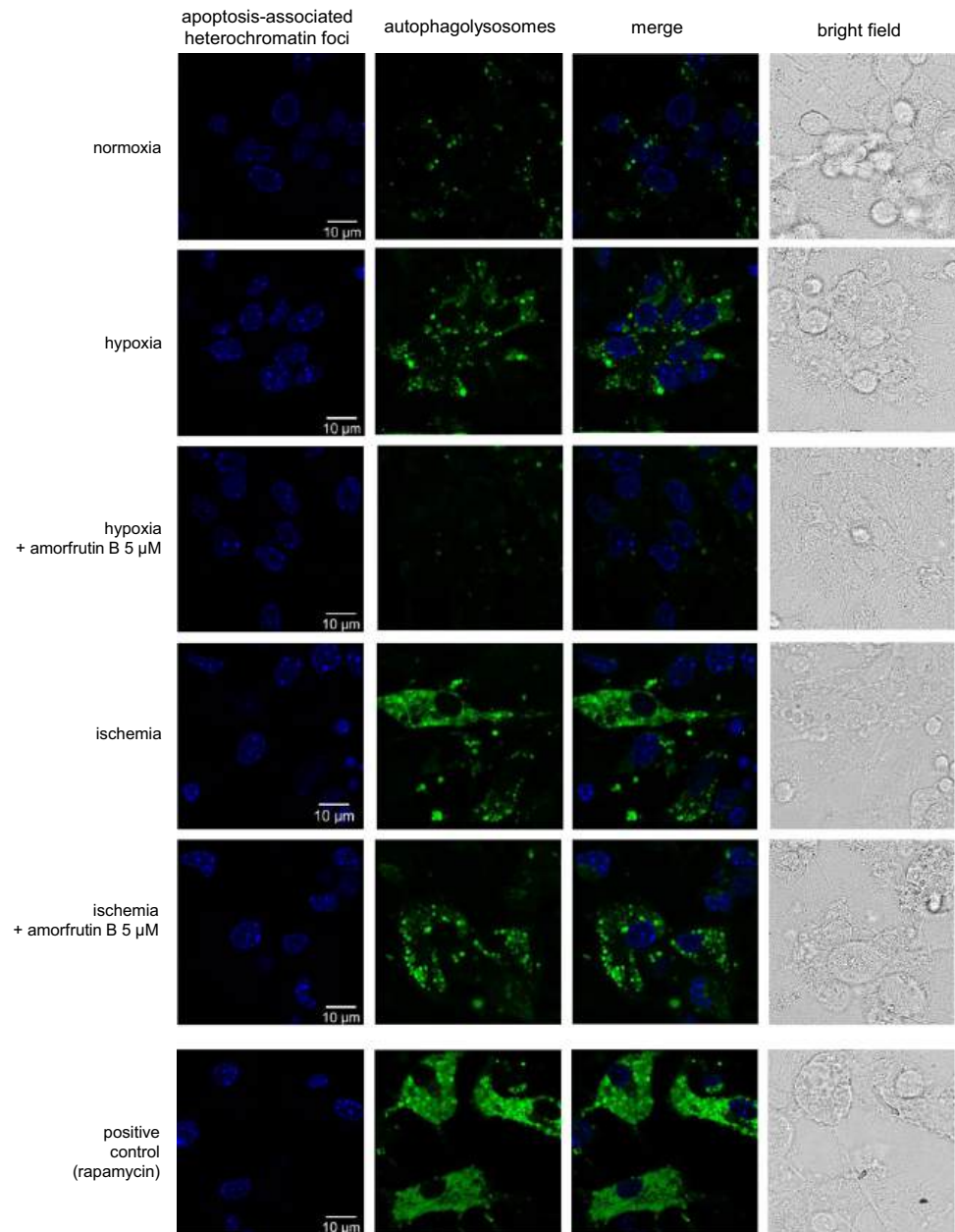
In wild-type cells subjected to hypoxia and ischemia, amorfrutin B (1 and 5  $\mu$ M) protected neuronal cell cultures from cell death, as we previously described [24]. In *Becn1* and *Atg7* siRNA-transfected cells, amorfrutin B lost its neuroprotective potential and did not prevent hypoxia-induced LDH release in comparison to the negative control (Fig. 6a). In the case of ischemia, the silencing of *Becn1* expression with specific siRNA also resulted in the loss of the neuroprotective properties of amorfrutin B. However, in *Atg7* siRNA-transfected cells, amorfrutin B (1 and 5  $\mu$ M) still protected cells from ischemia-induced cell death, as evidenced by the decrease in the LDH parameter to 161% compared to the negative control (Fig. 6b).

The negative control siRNA (scrambled siRNA) that is a control for specific/positive siRNAs may impair the proliferation and viability of cell cultures [34]. Therefore, exposure to ischemia of scrambled siRNA-treated cells would result in smaller effect (low cell density) than exposure to ischemia of wild-type cells (high cell density).

### Changes in the Methylation Rates of Apoptosis- and Autophagy-Related Genes in Response to Hypoxia/Ischemia Conditions and Amorfrutin B Post-treatment

The methylation rates of apoptosis-related genes were analyzed under normoxic conditions and reached 69% for *Bax* and 7% for *Bcl2*. In response to hypoxia and ischemia, the *Bax* methylation decreased to 50% and 40%, respectively. The methylation rate of *Bcl2* did not change in response to hypoxia and ischemia. Post-treatment with amorfrutin B after 6 h of hypoxia did not change the *Bax* methylation rate; however, it increased to 69% in neuronal cells subjected to 6 h of ischemia. Moreover, amorfrutin B administration

**Fig. 3** Amorfrutin B post-treatment reduced the formation of apoptosis-associated heterochromatin foci (bright blue) and autophagolysosomes (green) in neuronal cells undergoing hypoxia and ischemia. Heterochromatin foci and autophagolysosomes were visualized with the use of Hoechst 33342 and CAT dye, respectively. The bright-field images were included. Positive control indicated the formation of autophagolysosomes after treatment with rapamycin. The table shows results presented as MFI (mean fluorescence intensity)  $\pm$  SEM. \*\*\* $p$  < 0.001 compared to the control group, #### $p$  < 0.001 compared to the cultures exposed to hypoxia, ^^ $p$  < 0.001 compared to the cultures exposed to ischemia. The number of replicates in each group was 5



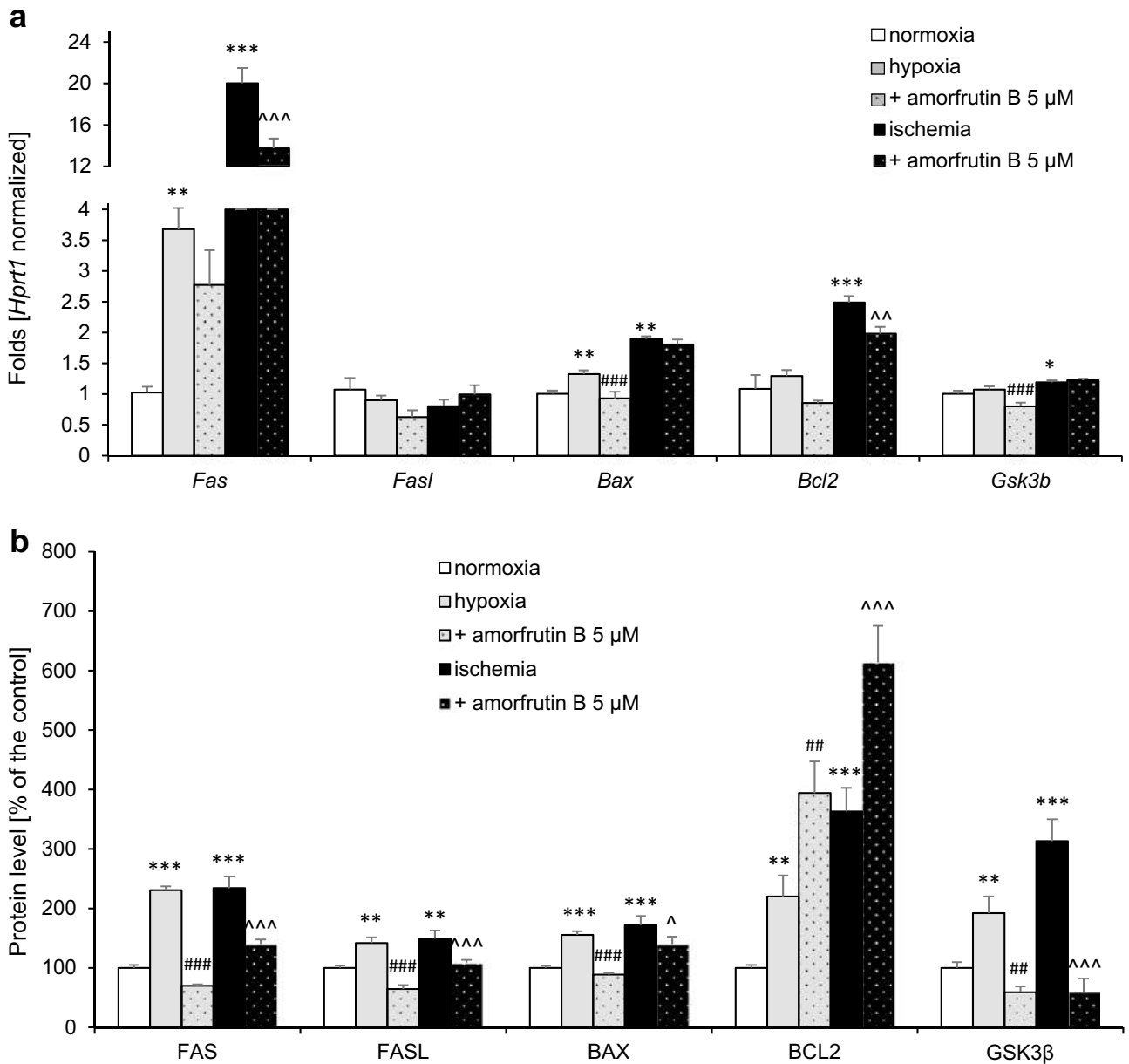
MFI $\pm$ SEM	normoxia	hypoxia	hypoxia + amorfrutin B	ischemia	ischemia + amorfrutin B	positive
<b>Autophagolysosomes</b>	4.19 $\pm$ 0.37	23.54 $\pm$ 1.62***	4.71 $\pm$ 1.30####	42.91 $\pm$ 4.27***	22.11 $\pm$ 4.95***	57.00 $\pm$ 4.41***

decreased the methylation rate of *Bcl2* observed during hypoxia to 4% (Fig. 7a).

In the case of autophagy-related genes, under normoxic conditions, the methylation rates of *Ambra1*, *Map1lc3b*, *Atg7*, and *Becn1* reached values of 50%, 83%, 62%, and 49%, respectively. In response to 6-h hypoxia and 6-h ischemia, the methylation rates of all genes were reduced: the *Ambra1* methylation rate diminished to 27% (hypoxia) and 24% (ischemia), the *Map1lc3b* methylation rate decreased to 39% (hypoxia) and 16% (ischemia), the *Atg7* methylation

rate decreased to 21% (hypoxia) and 15% (ischemia), and the *Becn1* methylation rate was reduced to 33% (hypoxia) and 25% (ischemia). Post-treatment with amorfrutin B caused increases in the methylation of all studied genes, except for *Ambra1*. Following exposure to amorfrutin B, the methylation rate of *Map1lc3b* increased to 52% (hypoxia) and 33% (ischemia), and the methylation rate of *Atg7* increased to 31% (hypoxia) and 48% (ischemia). Moreover, the methylation rate of *Becn1* increased to 53% in the case of hypoxia and 44% in the case of ischemia (Fig. 7b).

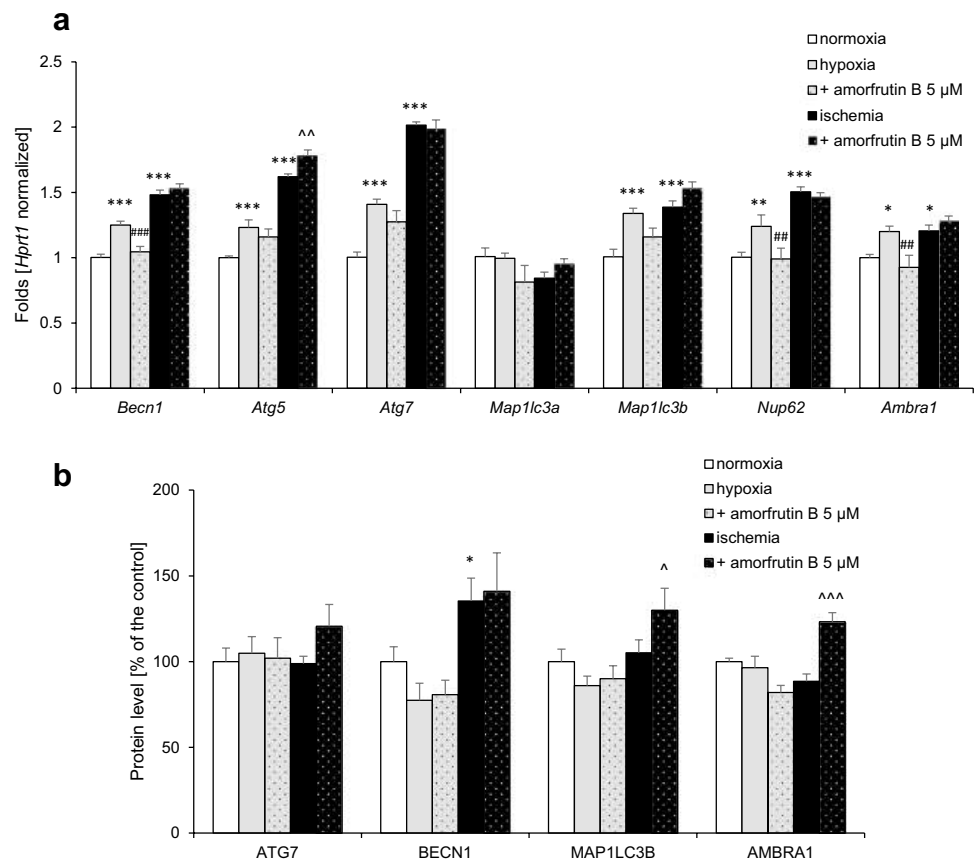




pg/mg of protein	FAS	FASL	BAX	BCL2	GSK3β
normoxia	0.066 ± 0.003	133.459 ± 5.359	18.812 ± 0.692	1.464 ± 0.073	2.405 ± 0.233
hypoxia	0.153 ± 0.004	189.306 ± 12.441	29.249 ± 1.170	3.224 ± 0.517	4.623 ± 0.675
hypoxia + amorfrutin B 5 μM	0.046 ± 0.002	85.959 ± 8.967	16.657 ± 0.573	5.772 ± 0.777	1.418 ± 0.239
ischemia	0.155 ± 0.013	198.877 ± 18.480	32.346 ± 2.863	5.318 ± 0.582	7.534 ± 0.887
ischemia + amorfrutin B 5 μM	0.093 ± 0.005	145.033 ± 6.441	26.363 ± 2.333	8.991 ± 0.900	1.447 ± 0.524

**Fig. 4** Post-treatment with amorfrutin B normalized the expression levels of apoptosis-related genes (a) and proteins (b) in neuronal cells exposed to hypoxia or ischemia. The results are presented as a fold change in case of qPCR and percentage of the control or pg/mg of protein ± SEM in case of ELISA. There were 3 independent experiments, consisting of 5–6 replicates per group. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001 compared to the control group, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared to the cultures exposed to hypoxia, ^*p* < 0.05, ^^*p* < 0.01, ^^^*p* < 0.001 compared to the cultures exposed to ischemia

**Fig. 5** Amorfrutin B post-treatment affected the expression levels of autophagy-related genes (a) and proteins (b), as measured using qPCR and ELISA. The results are presented as a fold change in case of qPCR and percentage of the control or pg/mg of protein  $\pm$  SEM in case of ELISA. There were 3 independent experiments, consisting of 5–6 replicates per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared to the control group, ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia, ^ $p < 0.05$ , ^^ $p < 0.01$ , ^^ $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia



pg/mg of protein	ATG7	BECN1	MAP1LC3B	AMBRA1
normoxia	0.898 $\pm$ 0.072	8.398 $\pm$ 0.726	0.948 $\pm$ 0.069	9.98 $\pm$ 0.204
hypoxia	0.942 $\pm$ 0.086	6.502 $\pm$ 0.844	0.816 $\pm$ 0.053	9.625 $\pm$ 0.670
hypoxia + amorfrutin B 5 $\mu$ M	0.916 $\pm$ 0.107	6.777 $\pm$ 0.712	0.853 $\pm$ 0.072	8.182 $\pm$ 0.413
ischemia	0.887 $\pm$ 0.039	11.368 $\pm$ 1.119	0.997 $\pm$ 0.072	8.838 $\pm$ 0.424
ischemia + amorfrutin B 5 $\mu$ M	1.082 $\pm$ 0.114	11.838 $\pm$ 1.889	1.232 $\pm$ 0.121	12.304 $\pm$ 0.524

### Effects of Amorfrutin B Post-treatment on the Expression of Apoptosis-Focused miRNAs Under Hypoxic and Ischemic Conditions as Determined Using an RT2 Profiler PCR Array

The RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array enabled the analysis of the expression profiles of 84 apoptosis-focused miRNAs in neuronal cell cultures subjected to hypoxia or ischemia and amorfrutin B post-treatment.

#### Hypoxia Dysregulated the Expression of 34 Apoptosis-Focused miRNAs (Fig. 8a)

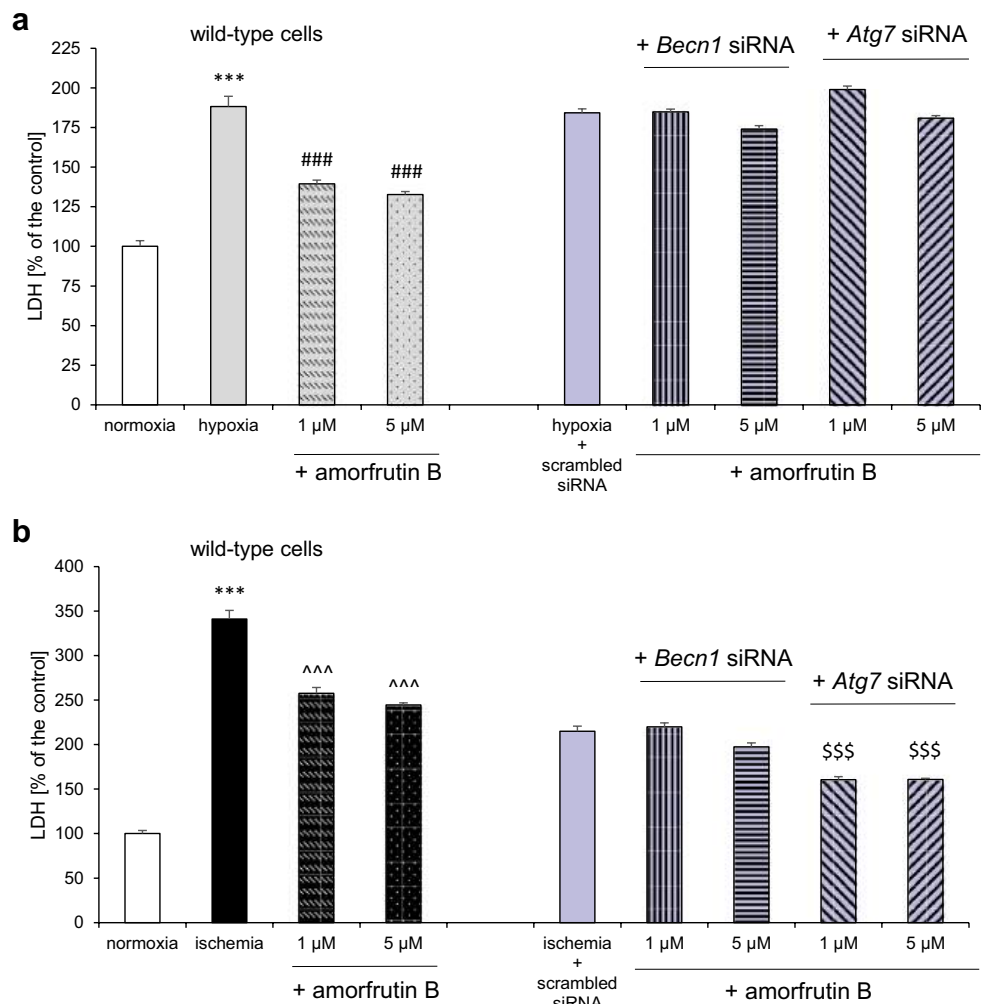
- (i) Seven miRNAs were downregulated (shown in green): *miR-133b*, *miR-146a-5p*, *miR-155-5p*, *miR-1-3p*, *miR-206*, *miR-29b-3p*, and *miR-98-5p*.
- (ii) Twenty-seven miRNAs were upregulated (shown in red): *let-7 g-5p*, *miR-106b-5p*, *miR-125b-5p*, *miR-143-3p*, *miR-144-3p*, *miR-145-5p*, *miR-153-3p*, *miR-15b-5p*,

*miR-16-5p*, *miR-17-5p*, *miR-181c-5p*, *miR-181d-5p*, *miR-183-5p*, *miR-192-5p*, *miR-195-5p*, *miR-200c-3p*, *miR-20a-5p*, *miR-21-5p*, *miR-210-3p*, *miR-214-3p*, *miR-26b-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-365a-3p*, *miR-378a-3p*, *miR-409-3p*, and *miR-7-5p*.

#### Under Hypoxic Conditions, Amorfrutin B Post-treatment Dysregulated 51 Apoptosis-Focused miRNAs (Fig. 8b)

- (i) Forty-seven miRNAs were downregulated (shown in green): *let-7a-5p*, *let-7c-5p*, *let-7e-5p*, *miR-106b-5p*, *miR-122-5p*, *miR-125a-5p*, *miR-125b-5p*, *miR-128-3p*, *miR-134-5p*, *miR-143-3p*, *miR-144-3p*, *miR-145-5p*, *miR-15a-5p*, *miR-16-5p*, *miR-17-5p*, *miR-181a-5p*, *miR-181b-5p*, *miR-181c-5p*, *miR-181d-5p*, *miR-183-5p*, *miR-185-5p*, *miR-186-5p*, *miR-194-5p*, *miR-195-5p*, *miR-203a-3p*, *miR-204-5p*, *miR-20a-5p*, *miR-221-3p*, *miR-222-3p*, *miR-25-3p*, *miR-26a-5p*, *miR-26b-5p*, *miR-298-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-30c-5p*,

**Fig. 6** Silencing of *Becn1* and/or *Atg7* reduced the neuroprotective effects of amorfrutin B against hypoxia- and ischemia-induced cell damage. In *Atg7* siRNA-transfected cells, amorfrutin B lost its neuroprotective capacity under hypoxic (a) but not ischemic (b) conditions. The results were normalized to the absorbance in negative control (scrambled siRNA). The results are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, consisting of 8–12 replicates per group. \*\*\* $p < 0.001$  compared to normoxia, ### $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia, ^^ $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia, \$\$\$ $p < 0.001$  compared to negative control



*miR-30e-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-351-5p*, *miR-365a-3p*, *miR-409-3p*, *miR-449a*, *miR-497-5p*, *miR-503-5p*, *miR-708-5p*, *miR-7-5p*, *miR-9-5p*, and *miR-92a-3p*.

- (ii) Four miRNAs were upregulated (shown in red): *miR-141-3p*, *miR-146a-5p*, *miR-155-5p*, and *miR-1-3p*.

A number of miRNAs were oppositely regulated by hypoxia and amorfrutin B. Many hypoxia-upregulated miRNAs were downregulated in response to amorfrutin B, namely *miR-106b-5p*, *miR-125b-5p*, *miR-143-3p*, *miR-144-3p*, *miR-145-5p*, *miR-16-5p*, *miR-17-5p*, *miR-181c-5p*, *miR-181d-5p*, *miR-183-5p*, *miR-195-5p*, *miR-20a-5p*, *miR-26b-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-365a-3p*, *miR-409-3p*, and *miR-7-5p*. Moreover, amorfrutin B enhanced the expression of several miRNAs that were diminished during the course of hypoxia, i.e., *miR-146a-5p*, *miR-155-5p*, and *miR-1-3p*.

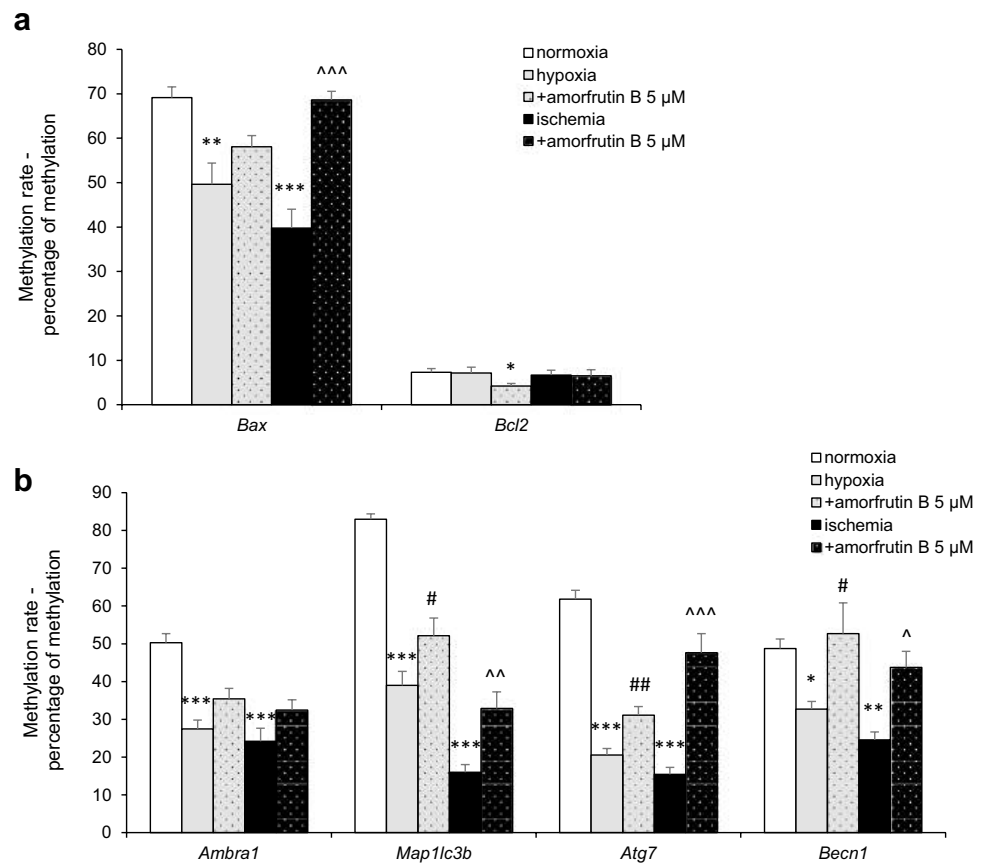
### Ischemia Dysregulated the Expression of 31 Apoptosis-Focused miRNAs (Fig. 8c)

- (i) Twenty-six miRNAs were downregulated (shown in green): *let-7c-5p*, *miR-125a-5p*, *miR-128-3p*, *miR-133a-3p*, *miR-134-5p*, *miR-146a-5p*, *miR-16-5p*, *miR-185-5p*, *miR-194-5p*, *miR-1-3p*, *miR-204-5p*, *miR-218-5p*, *miR-221-3p*, *miR-222-3p*, *miR-298-5p*, *miR-29b-3p*, *miR-30b-5p*, *miR-31-5p*, *miR-338-3p*, *miR-34c-5p*, *miR-351-5p*, *miR-449a*, *miR-497-5p*, *miR-503-5p*, *miR-7-5p*, and *miR-98-5p*.
- (ii) Five miRNAs were upregulated (shown in red): *miR-143-3p*, *miR-145-5p*, *miR-155-5p*, *miR-205-5p*, and *miR-365a-3p*.

### Under Ischemic Conditions, Amorfrutin B Post-treatment Dysregulated 22 Apoptosis-Focused miRNAs (Fig. 8d)

- (i) Four miRNAs were downregulated (shown in green): *miR-133b*, *miR-200c-3p*, *miR-205-5p*, and *miR-206*.

**Fig. 7** Alterations in apoptosis- (a) and autophagy-related (b) gene-specific methylation after hypoxia or ischemia and amorfrutin B post-treatment. The results are presented as the mean  $\pm$  SEM. There were 3 independent experiments consisting of 5 replicates per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the control group, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  compared to the cultures exposed to hypoxia, ^  $p < 0.05$ , ^^  $p < 0.01$ , ^^<sup>^</sup>  $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia



- (ii) Eighteen miRNAs were upregulated (shown in red): *let-7a-5p*, *let-7c-5p*, *let-7g-5p*, *miR-122-5p*, *miR-133a-3p*, *miR-134-5p*, *miR-141-3p*, *miR-16-5p*, *miR-181c-5p*, *miR-183-5p*, *miR-210-3p*, *miR-222-3p*, *miR-26b-5p*, *miR-31-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-365a-3p*, *miR-378a-3p*, and *miR-98-5p*.

Ischemic conditions and amorfrutin B oppositely regulated certain miRNAs. These include amorfrutin B-downregulated miRNA, which was upregulated during ischemia, i.e., *miR-205-5p*. Amorfrutin B also increased the expression levels of some miRNAs that had reduced expression during ischemia, such as *let-7c-5p*, *miR-133a-3p*, *miR-134-5p*, *miR-16-5p*, *miR-222-3p*, *miR-31-5p*, *miR-34c-5p*, and *miR-98-5p*.

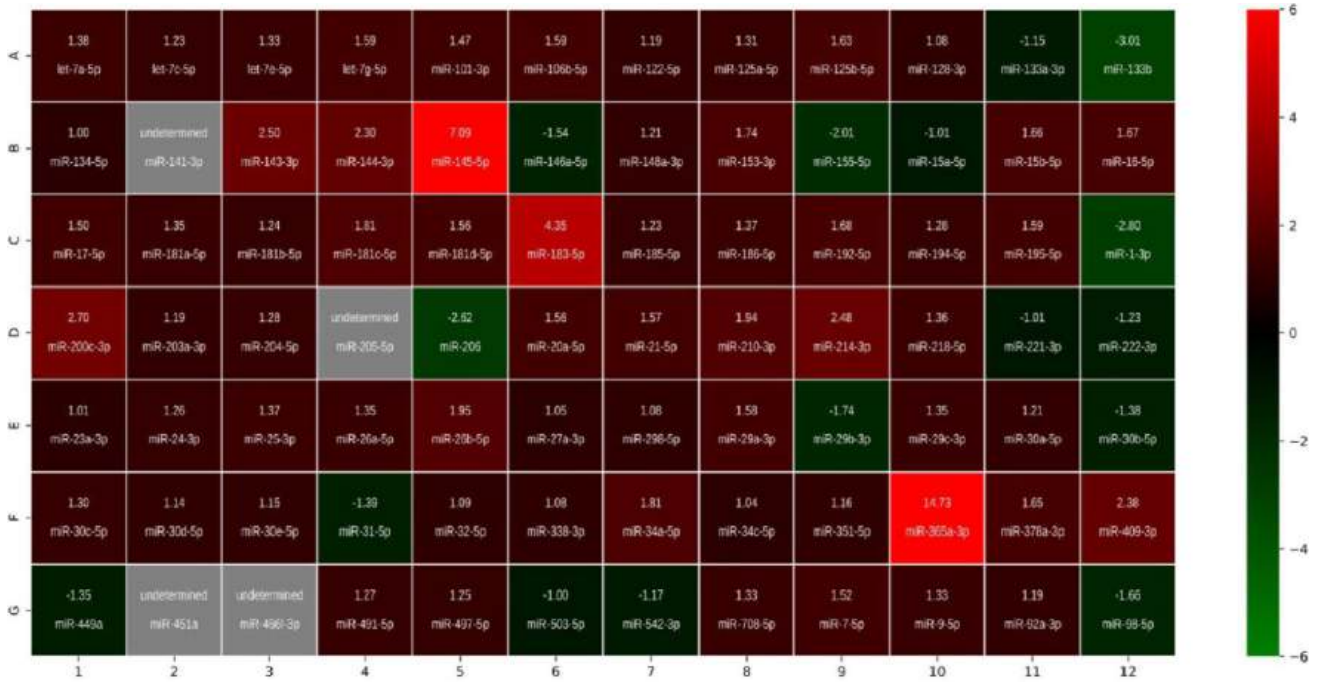
## Discussion

Amorfrutin B is a selective modulator of the PPAR $\gamma$  receptor, which we recently identified as an effective neuroprotective compound that protects brain neurons from hypoxic and ischemic damage when applied as a 6-h delayed post-treatment [24]. Previously, we recognized amorfrutin B as a selective PPAR $\gamma$  modulator that activated PPAR $\gamma$  in the neuronal cells undergoing hypoxia or ischemia and in this

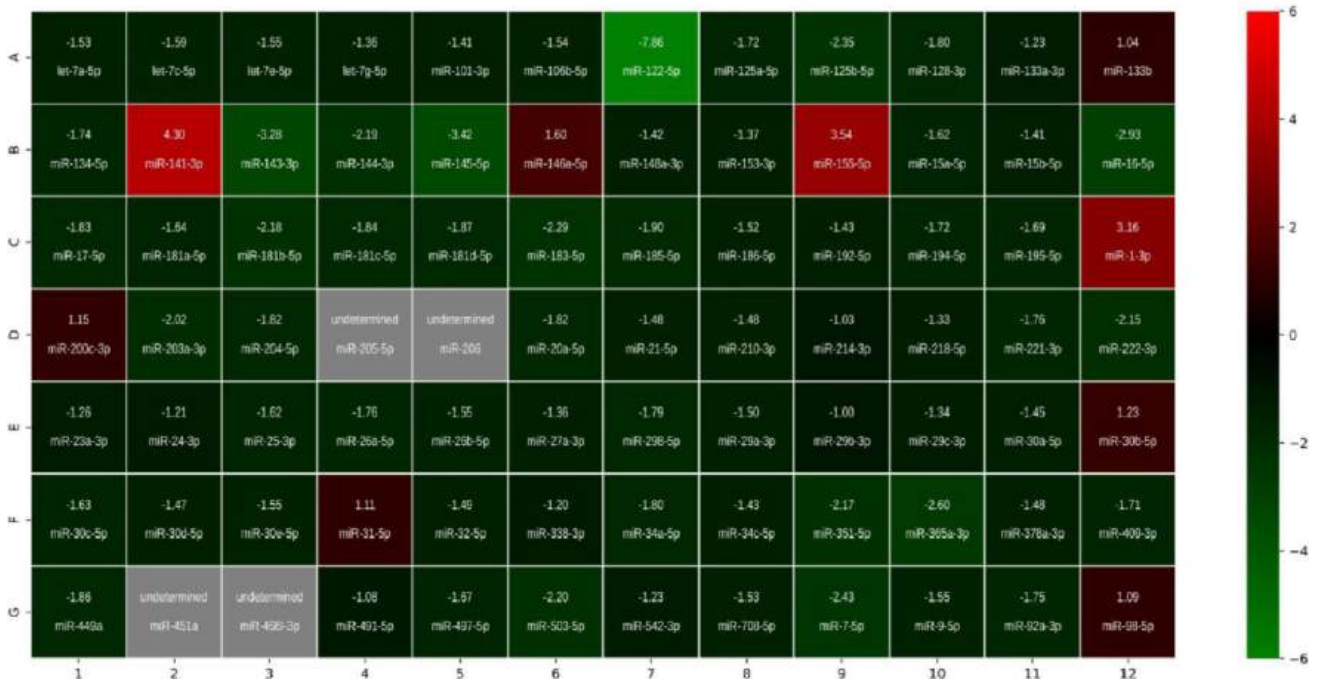
way evoked neuroprotection; amorfrutin B promoted mitochondrial integrity and was capable to inhibit ROS activity and ROS-mediated DNA damage. Since the mechanisms of amorfrutin B-attributed neuroprotection are only partially recognized, this study aimed to assess the apoptosis- and autophagy-related effects of the compound in cellular models of brain hypoxia and ischemia. The adequacy of the implemented models has been confirmed by the use of specific inhibitors targeting apoptosis (caspase-8, -9, -3/6, GSK3 $\beta$ , JNK, p38 MAPK) and autophagy (mTOR, ULK1, ULK2, USP10, USP13) that diminished hypoxia/ischemia-induced neurotoxicity. Moreover, the contribution of apoptosis- and autophagy-dependent signaling to the development of hypoxic/ischemic injuries in brain neurons has been supported by other studies, including ours [28, 35–49].

Although the neuroprotective potential of PPAR $\gamma$  agonists for the treatment of brain hypoxia and stroke is well-accepted, only certain agonists, namely thiazolidinediones, appeared effective when applied as a post-treatment [50–52]. However, thiazolidinediones such as troglitazone were found to cause hepatotoxicity, and rosiglitazone and pioglitazone increased the risk of heart failure [53]. The unique property of amorfrutin B to act as a selective PPAR $\gamma$  modulator is that it covers a partial agonism and/or a partial antagonism of the receptor that favors a safer pharmacological profile than

**a) changes in miRNA levels in response to hypoxia**



**b) changes in miRNA levels under hypoxic conditions in response to amorfrutin B post-treatment**

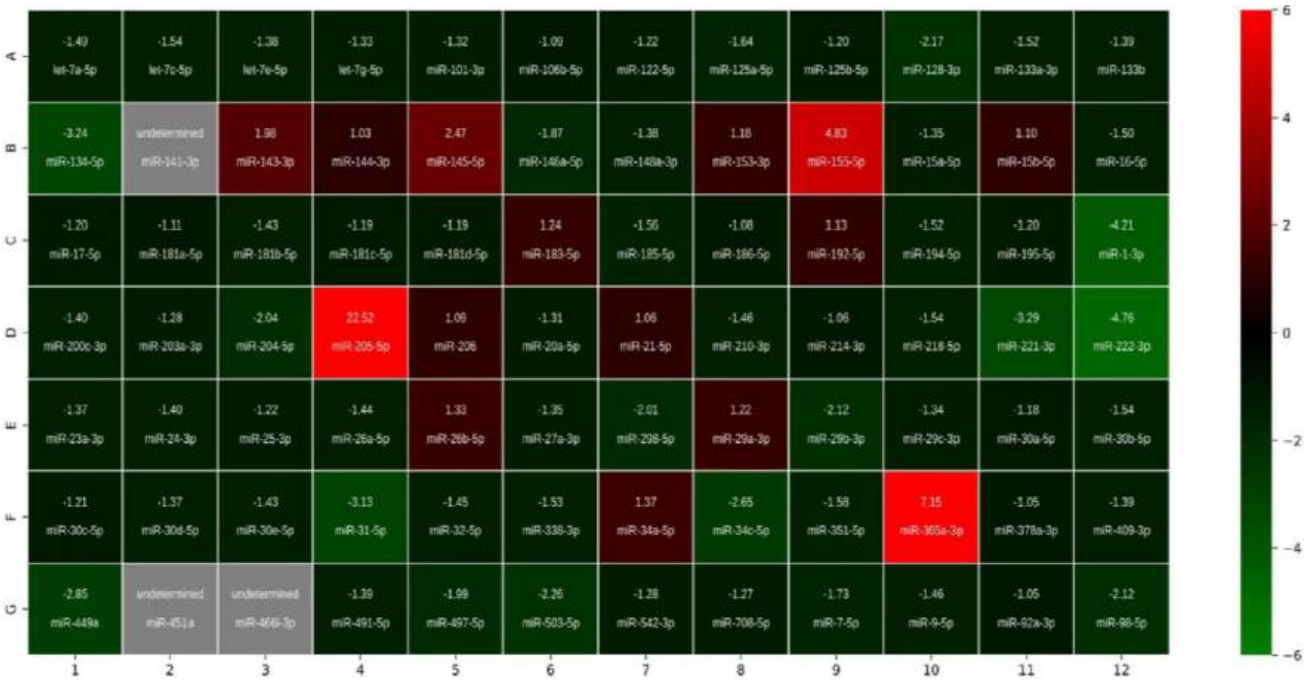


**Fig. 8** Amorfrutin B post-treatment dysregulated the expression levels of apoptosis-focused miRNAs in neuronal cell cultures undergoing hypoxia and ischemia. The results were determined by microarray analyses and are shown as heatmaps of 84 miRNAs. The results are

based on 5 replicates for each experimental group. The cell’s color indicates the fold change of miRNA in the corresponding cell range. Downregulated miRNAs are shown in green, upregulated miRNAs are shown in red, and undetermined miRNAs are shown in gray



## c) changes in miRNA levels in response to ischemia



## d) changes in miRNA levels under ischemic conditions in response to amorfrutin B post-treatment

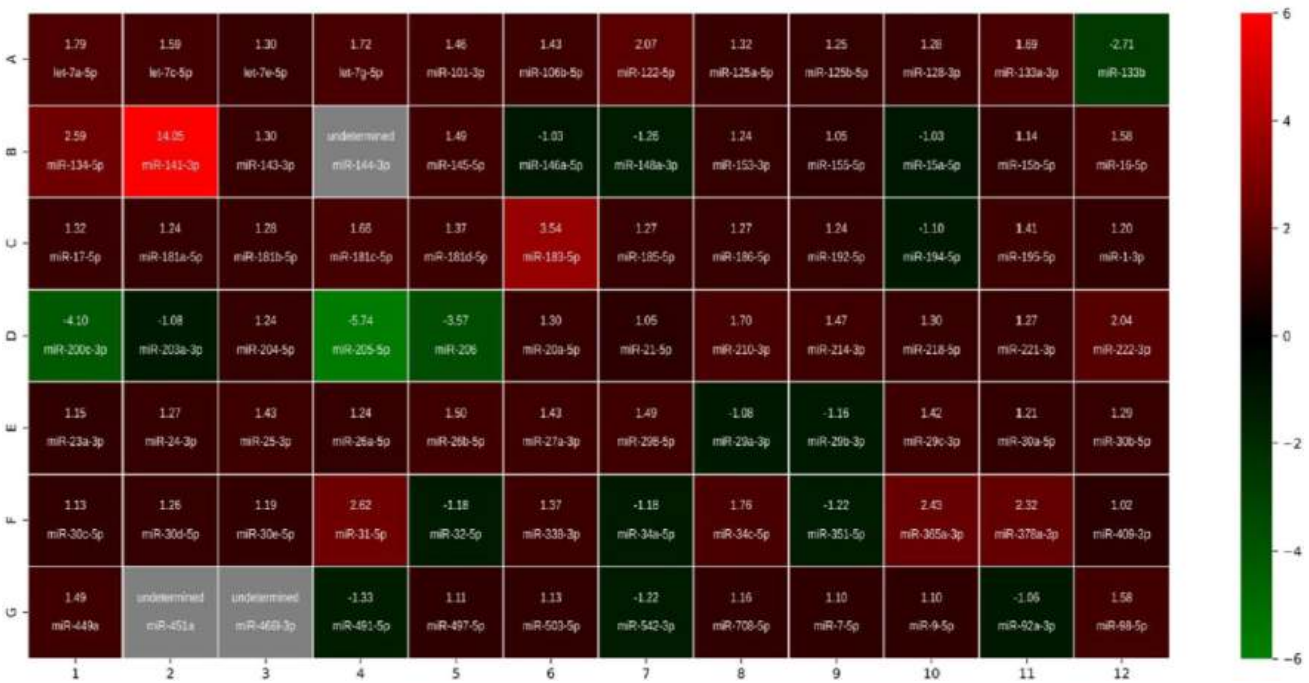


Fig. 8 (continued)

full PPAR $\gamma$  agonism [54]. There is no study, except for ours, showing the neuroprotective effect of post-treatment with a selective PPAR $\gamma$  modulator against hypoxia or ischemia. Telmisartan, which is a selective PPAR $\gamma$  modulator that

binds to the receptor in a different way than thiazolidinediones, suppressed cerebral injury in a murine model of transient focal ischemia, but it was used as a pre-treatment [55]. Since amorfrutin B appeared to exert neuroprotection when

applied with a 6-h delay from initiating hypoxia or ischemia, one may assume that amorfrutin B has the ability to adjust to clinical standards without evoking severe side effects.

We demonstrated for the first time that post-treatment with amorfrutin B prevented neuronal apoptosis in terms of the loss of mitochondrial membrane potential, heterochromatin foci formation, and the expression of specific genes and proteins, such as *Fas*/FAS, FASL, *Bax*/BAX, *Bcl2*/BCL2, and *Gsk3b*/GSK3 $\beta$ . The expression levels of all studied apoptosis-related genes and proteins were decreased in response to amorfrutin B, both during hypoxia and ischemia, except for the expression of anti-apoptotic BCL2, which was increased. Human studies showed the upregulation of the BCL2 expression in the brains of AD (Alzheimer's disease) patients [56–58]. Also, BCL2 expression was upregulated in the brains of HD (Huntington's disease) patients with longer disease duration [59]. In both cases, the increase in BCL2 expression is likely the result of the activation of a defense mechanism and attempt to survive. In our study, after post-treatment with amorfrutin B, the methylation rate of the pro-apoptotic *Bax* gene was inversely correlated with the protein level, which explained the decrease in the BAX/BCL2 ratio as a result of *Bax* hypermethylation. Previously, we showed altered methylation levels of *Bcl2* and *Bax* genes that were correlated with an increased BAX/BCL2 ratio in response to neurotoxic action of triclocarban [26]. Another study from our group showed that benzophenone-3-induced neurotoxicity involved *Bax* hypomethylation and *Bcl2* hypermethylation, which confirmed a key role of DNA methylation in the regulation of the expression levels of apoptosis-related factors [30].

The study showed that the mechanisms of protective action of amorfrutin B also involved an inhibition of autophagy, as evidenced by diminished autophagolysosome formation and loss of neuroprotective properties of amorfrutin B after the silencing of *Becn1* and *Atg7* in cells undergoing hypoxia or after the silencing of *Becn1* in cells undergoing ischemia. In many stroke models determining final fate of neurons, accumulation of autophagosomes and activation of lysosomal function is detected [60]. Autophagolysosomes arise from autophagosome and lysosome fuse allowing degradation of the cytoplasmic contents [29], and by inhibiting autophagolysosomes formation, amorfrutin B would have elicited neuroprotection. The results are in line with the observation that a selective neuronal deletion of *Atg7* in the neonatal brain inhibited hypoxia–ischemia-induced autophagy and caused neuroprotection [61]. In our research, the neuroprotective effects of amorfrutin B disappeared in siRNA-transfected cells, i.e., after massive decreases in *Becn1* and *Atg7* mRNA expression (approx. 70 and 60%), suggesting that the mechanism of amorfrutin B-evoked neuroprotection involves an inhibition of autophagy; however, other mechanisms are not

excluded. Previously, we demonstrated that post-treatment with amorfrutin B protected brain neurons against hypoxia/ischemia-induced damage in a PPAR $\gamma$ -dependent manner [24]. Interestingly, PPAR $\gamma$  functions appeared to be strongly suppressed in adipocyte-specific *Becn1* knockout mice [62], which supports the loss of neuroprotection in *Becn1* siRNA-transfected cells in our present study. Furthermore, treatment with the PPAR $\gamma$  agonist 15d-PGJ2 decreased autophagy-related protein expression and LC3 immunoreactivity in mice subjected to cerebral ischemia–reperfusion injury after MCAO [63]. Although post-treatment with amorfrutin B reduced the expression levels of *Becn1*, *Nup62*, and *Ambra1* during hypoxia, it stimulated *Atg5* and the protein levels of MAP1LC3B and AMBRA1 during ischemia, supporting the ambiguous role of autophagy in the development of brain pathologies. It is generally accepted that autophagy can cause neuroprotection by enhancing the clearance of misfolded protein aggregates or act in parallel with neurodegenerative processes, particularly during hemorrhage, kainic acid-induced excitotoxicity, and hypoxia [7]. Unfortunately, the methylation rates of autophagy-related genes (*Map1lc3b*, *Atg7*, *Becn1*) did not support the altered protein expression levels following exposure to amorfrutin B, thus suggesting other regulatory mechanisms. Indeed, amorfrutin B also affected miRNA expression, and many of the miRNAs were oppositely regulated by amorfrutin B and hypoxia/ischemia.

According to the study, amorfrutin B downregulated many hypoxia-upregulated miRNAs, namely *miR-106b-5p*, *miR-125b-5p*, *miR-143-3p*, *miR-144-3p*, *miR-145-5p*, *miR-16-5p*, *miR-17-5p*, *miR-181c-5p*, *miR-181d-5p*, *miR-183-5p*, *miR-195-5p*, *miR-20a-5p*, *miR-26b-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-365a-3p*, *miR-409-3p*, and *miR-7-5p*. Amorfrutin B also enhanced the expression of several miRNAs that were diminished during the course of hypoxia, such as *miR-146a-5p*, *miR-155-5p*, and *miR-1-3p*. In addition, amorfrutin B upregulated the expression of many ischemia-downregulated miRNAs, such as *let-7c-5p*, *miR-133a-3p*, *miR-134-5p*, *miR-16-5p*, *miR-222-3p*, *miR-31-5p*, *miR-34c-5p*, and *miR-98-5p*. Only *miR-205-5p*, which was increased by ischemia, was reduced by amorfrutin B. Since apoptosis and autophagy interfere with themselves, particularly with BECN1, BCL2, p53, and ATG5, the apoptosis-focused microarrays used in the present study also included autophagy-related miRNAs such as *miR-133a* and *miR-17-5p*. It has been shown that overexpression of *miR-133a* inhibits MPP<sup>+</sup>-induced autophagy (MAP1LC3A/MAP1LC3B, BECN1, NUP62) in a cellular model of Parkinson's disease [64], and downregulation of *miR-17-5p* inhibits infarction-induced myocardial autophagy [65].

In our model of hypoxia, the majority of hypoxia-upregulated miRNAs have already been classified as markers of ischemic stroke and/or targets for novel treatments. These include *miR-106b-5p*, *miR-125b-5p*, *miR-143-3p*,

*miR-145-5p*, *miR-17-5p*, *miR-181c-5p*, *miR-181d*, *miR-34a-5p*, *miR-365a-3p*, *miR-409-3p*, and *miR-7-5p*. Some other hypoxia-upregulated miRNAs, such as *miR-144-3p* and *miR-16-5p*, also appeared to be highly expressed during hemorrhagic stroke and myocardial infarction [66, 67]. Interestingly, the use of antagomir against *miR-106b-5p* or *miR-145-5p* reduced brain infarct volume and caused neuroprotection [68, 69], which is in line with the neuroprotective effect of amorfrutin B in our research, including the amorfrutin B-evoked downregulation of specific miRNAs. For the model of ischemia, decreased expression levels of miRNAs such as *let-7c-5p*, *miR-133a-3p*, *miR-222-3p*, *miR-34c-5p*, and *miR-98-5p* have previously been categorized as predictors of cerebral ischemia in humans as well as in animal and cellular models of ischemic stroke. Since overexpressing *let-7c-5p*, *miR-34c-5p*, and *miR-98-5p* decreased the infarction volume, attenuated neurological deficits, and inhibited apoptosis in MCAO mice [70–72], one may suggest that the amorfrutin B-evoked upregulation of the miRNAs observed in our study could be the mechanism of neuroprotection.

In summary, our study showed that a 6-h delayed post-treatment with amorfrutin B evoked strong neuroprotection against hypoxia and ischemia that was mediated by inhibiting apoptosis and autophagy and engaged regulatory mechanisms based on gene methylation and miRNA expression. Because amorfrutin B oppositely regulated hypoxia/ischemia through many miRNAs and interfered with various signaling pathways, targeting them could be a novel multifactorial therapeutic approach to improve stroke pharmacotherapy. The results strongly support the position of amorfrutin B among the most promising anti-stroke and wide-window therapeutics.

**Abbreviations** *Ambra1*/AMBRA1: Autophagy and beclin 1 regulator 1; ANOVA: Analysis of variance; *Atg5*: Autophagy-related protein 5; *Atg7*/ATG7: Autophagy-related protein 7; *Bax*/BAX: BCL2 associated X; BBB: Blood-brain barrier; *Bcl2*/BCL2: B-cell lymphoma 2; *Becn1*/BECN1: Beclin 1; CAT: Cationic amphiphilic tracer; Ct: Threshold cycle; DIV: Days in vitro; DMSO: Dimethyl sulfoxide; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; *Fas*/FAS: Cell surface death receptor; *FasL*/FASL: FAS Ligand; GFAP: Filament glial fibrillary acidic protein; *Gsk3b*/GSK3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase 3 beta; *Hprt1*: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; JNK: Jun N-terminal kinase; LDH: Lactate dehydrogenase; *Map1lc3a*: Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha; *Map1lc3b*/MAP1LC3B: Microtubule associated protein 1 light chain 3 Beta; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; MCAO: Middle carotid artery occlusion; mTOR: Mammalian target of rapamycin; *Nup62*: Nucleoporin 62; PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; ROI: Region of interest; rtPA: Recombinant tissue plasminogen activator; SPPAR $\gamma$ M: Selective PPAR $\gamma$  modulator; TZDs: Thiazolidinediones; ULK1: Unc-51 like autophagy activating kinase 1; ULK2: Unc-51 like autophagy activating kinase 2; USP10: Ubiquitin specific peptidase 10; USP13: Ubiquitin specific peptidase 13

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03087-9>.

**Acknowledgements** The authors thank Julita Wesołowska (Environmental Laboratory of *in vivo* and *in vitro* imaging of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences) for kindly providing access to the Leica TCS SP8 WLL confocal microscope.

**Author Contribution** KP: data curation, formal analysis, investigation, validation, writing — original draft; AW: data curation, formal analysis, investigation, validation, writing — original draft; CB: writing — original draft; MK: conceptualization, funding acquisition, methodology, project administration, supervision, writing — original draft. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** This research was funded by the National Science Centre of Poland, grant number 2018/31/B/NZ7/01815, and the statutory fund of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences in Krakow, Poland. Karolina Przepiórska is a PhD student at Krakow School of Interdisciplinary PhD Studies (KISD).

**Data Availability** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Ethics Approval** The experiments were conducted in compliance with European Union Legislation (Directive 2010/63/EU, amended by Regulation (EU) 2019/1010) and approved by the Bioethics Commission as being compliant with Polish Law (21 August 1997). The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and did not require the approval of the Ethics Committee of Maj Institute of Pharmacology PAS since the research was conducted on primary neuronal cells.

**Consent to Participate** Non-applicable.

**Consent for Publication** Non-applicable.

**Competing Interests** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

1. Workineh Y, Semachew A, Ayalew E, Animaw W, Tirfie M, Birhanu M (2020) Prevalence of perinatal asphyxia in East and Central Africa: systematic review and meta-analysis. *Heliyon* 6(4):e03793. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03793>



2. Herrera-Marschitz M, Perez-Lobos R, Lespay-Rebolledo C, Tapia-Bustos A, Casanova-Ortiz E, Morales P, Valdes JL, Bustamante D et al (2018) Targeting sentinel proteins and extrasynaptic glutamate receptors: a therapeutic strategy for preventing the effects elicited by perinatal asphyxia? *Neurotox Res* 33(2):461–473. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9795-9>
3. Wang S, Ma F, Huang L, Zhang Y, Peng Y, Xing C, Feng Y, Wang X et al (2018) DI-3-n-butylphthalide (NBP): a promising therapeutic agent for ischemic stroke. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 17(5):338–347. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180612125843>
4. Datta V (2017) Therapeutic hypothermia for birth asphyxia in neonates. *Indian J Pediatr* 84(3):219–226. <https://doi.org/10.1007/s12098-016-2266-0>
5. Puyal J, Ginet V, Clarke PG (2013) Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 105:24–48. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.03.002>
6. Jiao W, Lin HM, Timmons J, Nagaich AK, Ng SW, Misteli T, Rane SG (2005) E2F-dependent repression of topoisomerase II regulates heterochromatin formation and apoptosis in cells with melanoma-prone mutation. *Cancer Res* 65(10):4067–4077. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3999>
7. Wnuk A, Kajta M (2017) Steroid and xenobiotic receptor signaling in apoptosis and autophagy of the nervous system. *Int J Mol Sci* 18(11):2394. <https://doi.org/10.3390/ijms18112394>
8. Wu H, Che X, Zheng Q, Wu A, Pan K, Shao A, Wu Q, Zhang J et al (2014) Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Int J Biol Sci* 10(9):1072–1083. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9719>
9. Sekerdag E, Solaroglu I, Gursoy-Ozdemir Y (2018) Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options. *Curr Neuropharmacol* 16(9):1396–1415. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180302115544>
10. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
11. Voelz C, Habib P, Köberlein S, Beyer C, Slowik A (2021) Alteration of miRNA biogenesis regulating proteins in the human microglial cell line HMC-3 after ischemic stress. *Mol Neurobiol* 58(4):1535–1549. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02210-y>
12. Koutsis G, Siasos G, Spengos K (2013) The emerging role of microRNA in stroke. *Curr Top Med Chem* 13(13):1573–1588. <https://doi.org/10.2174/15680266113139990106>
13. Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S (2016) Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *Eur J Pharmacol* 785:44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.004>
14. Cai W, Yang T, Liu H, Han L, Zhang K, Hu X, Zhang X, Yin KJ et al (2018) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ): a master gatekeeper in CNS injury and repair. *Prog Neurobiol* 163–164:27–58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.002>
15. Ahn CH, Lim S (2019) Effects of thiazolidinedione and new anti-diabetic agents on stroke. *J Stroke* 21(2):139–150. <https://doi.org/10.5853/jos.2019.00038>
16. Saha SK, Das SC, Abdullah-AI-Emran SM, Uddin MA, Chowdhury AK, Bachar SC (2013) Biochemical alterations and liver toxicity analysis with pioglitazone in healthy subjects. *Drug Chem Toxicol* 36(2):149–154. <https://doi.org/10.3109/01480545.2012.658920>
17. Viscoli CM, Inzucchi SE, Young LH, Insogna KL, Conwit R, Furie KL, Gorman M, Kelly MA, IRIS Trial Investigators et al (2017) Pioglitazone and risk for bone fracture: safety data from a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 102(3):914–922. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3237>
18. Balint BL, Nagy L (2006) Selective modulators of PPAR activity as new therapeutic tools in metabolic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6(1):33–43. <https://doi.org/10.2174/187153006776056620>
19. Kozuharova E, Matkowski A, Woźniak D, Simeonova R, Naychov Z, Malainer C, Mocan A, Nabavi SM et al (2017) *Amorpha fruticosa* - a noxious invasive alien plant in Europe or a medicinal plant against metabolic disease? *Front Pharmacol* 8:333. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00333>
20. Weidner C, de Groot JC, Prasad A, Freiwald A, Quedenau C, Kliem M, Witzke A, Kodelja V et al (2012) Amorfrutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(19):7257–7262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116971109>
21. Weidner C, Wowro SJ, Freiwald A, Kawamoto K, Witzke A, Kliem M, Siems K, Müller-Kuhrt L et al (2013) Amorfrutin B is an efficient natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) agonist with potent glucose-lowering properties. *Diabetologia* 56(8):1802–1812. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2920-2>
22. Lavecchia A, Di Giovanni C (2015) Amorfrutins are efficient modulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) with potent antidiabetic and anticancer properties: a patent evaluation of WO2014177593 A1. *Expert Opin Ther Pat* 25(11):1341–1347. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1076393>
23. Samad MB, Hasan MN, Banarjee S, Rahman M, Raihan S, Banti FL, Sayfe SS, Hasan S et al (2017) PEG modification of Amorfrutin B from *Amorpha fruticosa* increases gastric absorption, circulation half-life and glucose uptake by T3T-L1 adipocytes. *Biomed Pharmacother* 95:513–519. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.113>
24. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M (2021) Post-treatment with amorfrutin B evokes PPAR $\gamma$ -mediated neuroprotection against hypoxia and ischemia. *Biomedicines* 9(8):854. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080854>
25. Kajta M, Domin H, Gryniewicz G, Lason W (2007) Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: an involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  intracellular signaling pathway. *Neuroscience* 145(2):592–604. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.059>
26. Kajta M, Wnuk A, Rzemieniec J, Lason W, Mackowiak M, Chwastek E, Staniszevska M, Nehring I et al (2019) Triclocarban disrupts the epigenetic status of neuronal cells and induces AHR/CAR-mediated apoptosis. *Mol Neurobiol* 56(5):3113–3131. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1285-4>
27. Kajta M, Rzemieniec J, Litwa E, Lason W, Lenartowicz M, Krzeptowski W, Wojtowicz AK (2013) The key involvement of estrogen receptor  $\beta$  and G-protein-coupled receptor 30 in the neuroprotective action of daidzein. *Neuroscience* 238:345–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.005>
28. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M (2021) Post-treatment strategy against hypoxia and ischemia based on selective targeting of nonnuclear estrogen receptors with PaPE-1. *Neurotox Res* 39(6):2029–2041. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00441-y>
29. Li H, Wu J, Shen H, Yao X, Liu C, Pianta S, Han J, Borlongan CV et al (2018) Autophagy in hemorrhagic stroke: mechanisms and clinical implications. *Prog Neurobiol* 163–164:79–97. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.04.002>
30. Wnuk A, Rzemieniec J, Lason W, Krzeptowski W, Kajta M (2018) Benzophenone-3 impairs autophagy, alters epigenetic status, and disrupts retinoid X receptor signaling in apoptotic neuronal cells. *Mol Neurobiol* 55(6):5059–5074. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0704-2>
31. Kajta M, Rzemieniec J, Wnuk A, Lason W (2020) Triclocarban impairs autophagy in neuronal cells and disrupts estrogen receptor signaling via hypermethylation of specific genes. *Sci Total*

- Environ 701:134818. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134818>
32. Conde C, Cáceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10(5):319–332. <https://doi.org/10.1038/nrn2631>
  33. Sun WL (2016) Ambral1 in autophagy and apoptosis: implications for cell survival and chemotherapy resistance. *Oncol Lett* 12(1):367–374. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4644>
  34. Kleefeldt JM, Pozarska A, Nardiello C, Pfeffer T, Vadász I, Herold S, Seeger W, Morty RE (2020) Commercially available transfection reagents and negative control siRNA are not inert. *Anal Biochem* 606:113828. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113828>
  35. Hee Han B, Choi J, Holtzman DM (2002) Evidence that p38 mitogen-activated protein kinase contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Dev Neurosci* 24(5):405–410. <https://doi.org/10.1159/000069046>
  36. Thornton C, Leaw B, Mallard C, Nair S, Jinnai M, Hagberg H (2017) Cell death in the developing brain after hypoxia-ischemia. *Front Cell Neurosci* 11:248. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00248>
  37. Corti O, Blomgren K, Poletti A, Beart PM (2020) Autophagy in neurodegeneration: new insights underpinning therapy for neurological diseases. *J Neurochem* 154(4):354–371. <https://doi.org/10.1111/jnc.15002>
  38. Sørensen K, Neufeld TP, Simonsen A (2018) Membrane trafficking in autophagy. *Int Rev Cell Mol Biol* 336:1–92. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.001>
  39. Shvedova M, Anfinogenova Y, Atochina-Vasserman EN, Schepetkin IA, Atochin DN (2018) c-Jun N-terminal kinases (JNKs) in myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury. *Front Pharmacol* 9:715. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00715>
  40. Wang B, Li W, Jin H, Nie X, Shen H, Li E, Wang W (2018) Curcumin attenuates chronic intermittent hypoxia-induced brain injuries by inhibiting AQP4 and p38 MAPK pathway. *Respir Physiol Neurobiol* 255:50–57. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.05.006>
  41. Park DJ, Kang JB, Shah FA, Koh PO (2019) Resveratrol modulates the Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in a middle cerebral artery occlusion animal model. *Lab Anim Res* 35:18. <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0019-8>
  42. Uzdensky AB (2019) Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis* 24(9–10):687–702. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01556-6>
  43. Bhattacharya U, Neizer-Ashun F, Mukherjee P, Bhattacharya R (2020) When the chains do not break: the role of USP10 in physiology and pathology. *Cell Death Dis* 11(12):1033. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03246-7>
  44. Liu X, Balaraman K, Lynch CC, Hebron M, Wolf C, Moussa C (2021) Novel ubiquitin specific protease-13 inhibitors alleviate neurodegenerative pathology. *Metabolites* 11(9):622. <https://doi.org/10.3390/metabo11090622>
  45. Vahsen BF, Lingor P (2021) ULK1 as a novel therapeutic target in neurodegeneration. *Neural Regen Res* 16(6):1212–1213. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300442>
  46. Kajta M, Makarewicz D, Ziemnińska E, Jantas D, Domin H, Lasoń W, Kutner A, Łazarewicz JW (2009) Neuroprotection by co-treatment and post-treating with calcitriol following the ischemic and excitotoxic insult in vivo and in vitro. *Neurochem Int* 55(5):265–274. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.03.010>
  47. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Gogas A, Krzeptowski W, Kajta M (2015) Neuroprotective action of raloxifene against hypoxia-induced damage in mouse hippocampal cells depends on ER $\alpha$  but not ER $\beta$  or GPR30 signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 146:26–37. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.005>
  48. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Krzeptowski W, Kajta M (2016) Selective Aryl Hydrocarbon Receptor Modulator 3,3'-diindolylmethane impairs AhR and ARNT signaling and protects mouse neuronal cells against hypoxia. *Mol Neurobiol* 53(8):5591–5606. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9471-0>
  49. Rzemieniec J, Bratek E, Wnuk A, Przepiórska K, Salińska E, Kajta M (2020) Neuroprotective effect of 3,3'-diindolylmethane against perinatal asphyxia involves inhibition of the AhR and NMDA signaling and hypermethylation of specific genes. *Apoptosis* 25(9–10):747–762. <https://doi.org/10.1007/s10495-020-01631-3>
  50. Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL, Vemuganti R (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J Neurochem* 101(1):41–56. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04376.x>
  51. Verma R, Mishra V, Gupta K, Sasmal D, Raghurir R (2011) Neuroprotection by rosiglitazone in transient focal cerebral ischemia might not be mediated by glutamate transporter-1. *J Neurosci Res* 89(11):1849–1858. <https://doi.org/10.1002/jnr.22710>
  52. Yu SJ, Reiner D, Shen H, Wu KJ, Liu QR, Wang Y (2015) Time-dependent protection of CB2 receptor agonist in stroke. *PLoS One* 10(7):e0132487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132487>
  53. Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar M (2018) Thiazolidinediones as antidiabetic agents: a critical review. *Bioorg Chem* 77:548–567. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.02.009>
  54. Chen Y, Ma H, Zhu D, Zhao G, Wang L, Fu X, Chen W (2017) Discovery of novel insulin sensitizers: promising approaches and targets. *PPAR Res* 2017:8360919. <https://doi.org/10.1155/2017/8360919>
  55. Kasahara Y, Taguchi A, Uno H, Nakano A, Nakagomi T, Hirose H, Stern DM, Matsuyama T (2010) Telmisartan suppresses cerebral injury in a murine model of transient focal ischemia. *Brain Res* 1340:70–80. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.101>
  56. Satou T, Cummings BJ, Cotman CW (1995) Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity. *Brain Res* 697(1–2):35–43. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00748-f](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00748-f)
  57. O'Barr S, Schultz J, Rogers J (1996) Expression of the proto-oncogene bcl-2 in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 17(1):131–136. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)02024-1](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)02024-1)
  58. Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Smith MA, Perry G et al (1998) Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Res* 780(2):260–269. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01202-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01202-x)
  59. Sassone J, Maraschi A, Sassone F, Silani V, Ciammola A (2013) Defining the role of the Bcl-2 family proteins in Huntington's disease. *Cell Death Dis* 4(8):e772. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.300>
  60. Liu Y, Xue X, Zhang H, Che X, Luo J, Wang P, Xu J, Xing Z et al (2019) Neuronal-targeted TFEB rescues dysfunction of the autophagy-lysosomal pathway and alleviates ischemic injury in permanent cerebral ischemia. *Autophagy* 15(3):493–509. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1531196>
  61. Xie C, Ginet V, Sun Y, Koike M, Zhou K, Li T, Li H, Li Q et al (2016) Neuroprotection by selective neuronal deletion of Atg7 in neonatal brain injury. *Autophagy* 12(2):410–423. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1132134>
  62. Son Y, Cho YK, Saha A, Kwon HJ, Park JH, Kim M, Jung YS, Kim SN et al (2020) Adipocyte-specific Beclin1 deletion impairs lipolysis and mitochondrial integrity in adipose tissue. *Mol Metab* 39:101005. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101005>
  63. Xu F, Li J, Ni W, Shen YW, Zhang XP (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist 15d-prostaglandin J2 mediates neuronal autophagy after cerebral ischemia-reperfusion injury.

- PLoS One 8(1):e55080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055080>
64. Lu W, Lin J, Zheng D, Hong C, Ke L, Wu X, Chen P (2020) Overexpression of MicroRNA-133a inhibits apoptosis and autophagy in a cell model of Parkinson's disease by downregulating ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1). *Med Sci Monit* 26:e922032. <https://doi.org/10.12659/MSM.922032>
  65. Chen B, Yang Y, Wu J, Song J, Lu J (2022) microRNA-17-5p downregulation inhibits autophagy and myocardial remodelling after myocardial infarction by targeting STAT3. *Autoimmunity* 55(1):43–51. <https://doi.org/10.1080/08916934.2021.1992754>
  66. Fan W, Li X, Zhang D, Li H, Shen H, Liu Y, Chen G (2019) Detrimental role of miRNA-144-3p in intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury is mediated by formyl peptide receptor 2 downregulation both in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 28(6):723–738. <https://doi.org/10.1177/0963689718817219>
  67. Badacz R, Kleczyński P, Legutko J, Żmudka K, Gacoń J, Przewłocki T, Kabłak-Ziembicka A (2021) Expression of miR-1-3p, miR-16-5p and miR-122-5p as possible risk factors of secondary cardiovascular events. *Biomedicines* 9(8):1055. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081055>
  68. Li P, Shen M, Gao F, Wu J, Zhang J, Teng F, Zhang C (2017) An antagomir to microRNA-106b-5p ameliorates cerebral ischemia and reperfusion injury in rats via inhibiting apoptosis and oxidative stress. *Mol Neurobiol* 54(4):2901–2921. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9842-1>
  69. Xie X, Peng L, Zhu J, Zhou Y, Li L, Chen Y, Yu S, Zhao Y (2017) miR-145-5p/Nurr1/TNF- $\alpha$  signaling-induced microglia activation regulates neuron injury of acute cerebral ischemic/reperfusion in rats. *Front Mol Neurosci* 10:383. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00383>
  70. Ni J, Wang X, Chen S, Liu H, Wang Y, Xu X, Cheng J, Jia J et al (2015) MicroRNA let-7c-5p protects against cerebral ischemia injury via mechanisms involving the inhibition of microglia activation. *Brain Behav Immun* 49:75–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.014>
  71. Tu Y, Hu Y (2021) MiRNA-34c-5p protects against cerebral ischemia/reperfusion injury: involvement of anti-apoptotic and anti-inflammatory activities. *Metab Brain Dis* 36(6):1341–1351. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00724-5>
  72. Yu S, Zhai J, Yu J, Yang Q, Yang J (2021) miR-98-5p protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through anti-apoptosis and anti-oxidative stress in mice. *J Biochem* 169(2):195–206. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa099>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



# Amorfrutin B Compromises Hypoxia/Ischemia-induced Activation of Human Microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent Manner: Effects on Inflammation, Proliferation Potential, and Mitochondrial Status

Karolina Przepiórska-Drońska<sup>1</sup> · Agnieszka Wnuk<sup>1</sup> · Bernadeta Angelika Pietrzak-Wawrzyńska<sup>1</sup> · Andrzej Łach<sup>1</sup> · Weronika Biernat<sup>2</sup> · Anna Katarzyna Wójtowicz<sup>2</sup> · Małgorzata Kajta<sup>1</sup>

Received: 22 December 2023 / Accepted: 8 June 2024

© The Author(s) 2024

## Abstract

Amorfrutin B is a selective PPAR $\gamma$  modulator that we demonstrated to be a promising neuroprotective compound in cellular models of stroke and perinatal asphyxia. Although neuronal mechanisms of amorfrutin B-evoked neuroprotection have been identified, none of them reflects the actions of the compound on microglia, which play a pivotal role in brain response to hypoxia/ischemia. Here, we provide evidence for amorfrutin B-induced effects on human microglia subjected to hypoxia/ischemia; the compound counteracts inflammation, and influences mitochondrial status and proliferation potential in a PPAR $\gamma$ -dependent manner. Post-treatment with amorfrutin B decreased the IBA1 fluorescence intensity, reduced caspase-1 activity, and downregulated *IL1B/IL-1 $\beta$*  and *TNFA* but not *IL10/IL-10* expression, which was upregulated. Amorfrutin B also stimulated PPAR $\gamma$  signaling, as evidenced by increased mRNA and/or protein levels of PPAR $\gamma$  and PGC1 $\alpha$ . In addition, amorfrutin B reversed the hypoxia/ischemia-evoked effects on mitochondria-related parameters, such as mitochondrial membrane potential, *BCL2/BCL2* expression and metabolic activity, which were correlated with diminished proliferation potential of microglia. Interestingly, the inhibitory effect of amorfrutin B on the proliferation potential and mitochondrial function of microglia is opposite to the stimulatory effect of amorfrutin B on mouse neuronal survival, as evidenced by increased neuronal viability and reduced neurodegeneration. In summary, this study showed for the first time that amorfrutin B compromises hypoxia/ischemia-induced activation of human microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent manner, which involves inhibiting inflammation, normalizing mitochondrial status, and controlling proliferation potential. These data extend the protective potential of amorfrutin B in the pharmacotherapy of hypoxic/ischemic brain injury, targeting not only neurons but also activated microglia.

**Keywords** HMC3 · Microglia · Inflammation · Selective PPAR $\gamma$  modulator · Perinatal asphyxia · Stroke

## Introduction

Perinatal asphyxia and ischemic stroke are the leading causes of newborn and adult mortality, and they are serious challenges in current medicine. Hypothermia is the primary

therapeutic strategy used for perinatal asphyxia; however, approximately 40% of neonates receiving this treatment develop adverse effects, e.g., hypotension and hemodynamic instability of the cardiopulmonary system (Popescu et al. 2020; Geisinger et al. 2024). In turn, the available treatment for stroke is recombinant tissue plasminogen activator (rtPA), but only 1–5% of patients with ischemic stroke presenting within 4.5 h of symptoms receive this medicine (Jilani and Siddiqui 2023). The unpredictable onset and course of perinatal asphyxia and stroke, as well as the lack of effective therapy without adverse side effects, make identifying an efficient treatment for these brain pathologies a real challenge. Because inflammatory processes determine both the first and later stages of perinatal asphyxia and stroke pathology (Danladi and Sabir 2021), it is widely accepted

✉ Małgorzata Kajta  
kajta@if-pan.krakow.pl

<sup>1</sup> Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Department of Pharmacology, Laboratory of Neuropharmacology and Epigenetics, Smetna Street 12, 31–343 Krakow, Poland

<sup>2</sup> Faculty of Animal Sciences, Department of Nutrition, Animal Biotechnology and Fisheries, University of Agriculture, Adama Mickiewicza 24/28, 30-059 Krakow, Poland



that modulating microglial function in the brain may inhibit neuroinflammation and, in this way, promote recovery. Interestingly, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), a transcription factor that is the molecular target of antidiabetic thiazolidinedione (TZD), is a master regulator of the shift in microglial polarization from activated to quiescent. Full PPAR $\gamma$  agonists, such as pioglitazone, reduce the immunoreactivity of microglia during pathological conditions, preventing neuronal loss (Machado et al. 2019), however, clinical trials have indicated severe side effects (hepatotoxicity or cardiotoxicity) of TZD, which has led to its partial withdrawal from the pharmaceutical market (Zhong et al. 2018; Tang et al. 2018; El-Din et al. 2021).

Current efforts aim to optimize the structure of PPAR $\gamma$  ligands and deprive them of dangerous side effects. An interesting candidate with these properties is plant-derived amorfrutin B, a novel selective PPAR $\gamma$  modulator (SPPAR $\gamma$ M), which activates the receptor in distinct ways depending on the cellular context and different receptor conformations (Grygiel-Górniak 2014). To date, amorfrutin B has been shown to elicit positive outcomes in mice with insulin resistance, liver steatosis and dyslipidemia (Weidner et al. 2013). In the cited study, male mice were fed with high-fat diet to induce obesity and insulin resistance. Next, the effects of amorfrutin B incorporated in the food were assessed with the use of intraperitoneal insulin sensitivity test and metabolic variable measurements. Amorfrutin B improved insulin sensitivity, glucose tolerance and blood lipid variables, did not induce weight gain and appeared a liver-protecting compound. In addition, *in vivo* studies have indicated that these properties are not accompanied by side effects typical of TZDs, such as osteoblastogenesis or fluid retention (Lavecchia and Di Giovanni 2015). Our team was the first to demonstrate that amorfrutin B protects primary mouse neurons against hypoxia/ischemia-induced cell damage, even when applied 6 h after injury. We showed that this PPAR $\gamma$ -specific neuroprotection relies on epigenetic modifications, as well as inhibition of apoptosis, autophagy and oxidative stress (Wnuk et al. 2021a, Wnuk, Przepiórska et al. 2021; Przepiórska et al. 2023). The strong effectiveness of amorfrutin B in protecting cells against hypoxia/ischemia suggests that this compound has the potential to adjust to clinical standards, however, it is unknown whether its possible use may be applicable to modulating microglial immunoreactivity in pathological conditions caused by hypoxia and ischemia.

Recent studies have indicated that acute ischemic stroke contributes to a mean loss of 2.03 million neurons or even 14.8 billion synapses per minute in the human brain (Desai et al. 2019). Hypoxic/ischemic events induce brain damage, primarily causing death of cerebral neurons localized in ischemic core. In the surrounding penumbra, some neuronal cells survive becoming the targets for therapy. Initially, brain neurons die due to hypoxia/ischemia-induced excitotoxicity,

oxidative stress and necrosis, but later apoptosis and neuroinflammation are prerequisites for cell death (Muzio et al. 2021). Oxidative stress and inflammatory processes may contribute to the severity of brain damage during reperfusion, persisting even for several days after a hypoxic/ischemic episode (Mollet et al. 2022). Importantly, neuroinflammation can play a beneficial role in maintaining brain homeostasis, but when excessively activated it can play a pathological role, damaging brain cells and destroying neurological function. The pathogenesis of various neurological diseases, such as cerebrovascular disease, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and multiple sclerosis, has been closely linked to neuroinflammation (Tian et al. 2022).

Microglia are resident immune cells that represent an equal 10% of the adult brain cell population and participate in inflammatory reactions, acting as the first line of defense during neurodegenerative disorders such as stroke (Ochocka and Kaminska 2021; Li et al. 2020). After ischemia, in the ischemic core, cells with damaged cell membrane e.g., necrotic neurons, generate signals (glutamate, ATP, cytokines or HSP60) stimulating production of inflammatory cytokines and chemokines, and inducing morphological and phenotypic shifts in microglia (Yenari et al. 2010). The dynamics of microglial response during ischemic stroke may be divided into three stages: the acute phase (hours), subacute phase (days to weeks) and chronic phase (weeks to years), while microglia become activated and start proliferating reaching peak values 1–4 days after stroke (DeLong et al. 2022; Fan et al. 2023). A rich variety of ischemic stimuli lead to generation of distinct microglia phenotypes including those exhibiting proinflammatory or dysfunctional traits (e.g., foam cells) and others showing pro-repair features (Planas 2024). Considering that the microglial immune response takes hours to days, microglia represents a target for therapeutic intervention with an accessible time window (Yenari et al. 2010).

In addition to the pathological role of microglia in neurodegenerative diseases including stroke, beneficial roles of microglia have become apparent. These include an ability to regulate brain homeostasis and orchestrate postnatal connectivity in healthy brain (Rayasam et al. 2021). Microglia are commonly believed to play dual roles by presenting an M1-like (proinflammatory) or M2-like (anti-inflammatory) phenotype and exerting detrimental or beneficial effects during different stages of hypoxia/ischemia. The initial inflammatory response after ischemic brain injury involves microglial activation and the transition to classic M1-like phenotype, which is manifested by amoeboid cell morphology, caspase-1 activation, increased IBA1 level and the secretion of proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Taylor and Sansing 2013; Li et al. 2019; Xu et al. 2020). The binary concept of "M1" and "M2" phenotypes and microglial polarization paradigms during inflammatory

activation were widely accepted well into twenty-first century, leading to a surge in articles phenotyping microglia into deleterious “M1” or beneficial “M2” in the 2010s. With the identification of a broad repertoire of microglial states and functions dependent on developmental stage, plasticity, aging, and disease, the binary concept has become incoherent. Currently, a dynamic concept of microglial states that takes into account microglial function is postulated (Paolicelli et al. 2022). To account for the new concept, expressions “M1-like” and “M2-like” were used instead of “M1” and “M2” in this study.

The present study aimed to determine whether amorfrutin B is an effective modulator of the immune response in microglia activated by hypoxia/ischemia. For that reason, we used the human microglial HMC3 cell line, which is a suitable material for biochemical and molecular analyses and shows expression patterns of cytokines and chemokines similar to those of human primary microglia (Baek et al. 2021). We hypothesize that targeting PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$  signaling with amorfrutin B diminishes hypoxia/ischemia-induced microglial activation and contributes to the inhibition of inflammation, a shift in microglial morphology to a quiescent phenotype and mitochondria-dependent control of proliferation potential. We decided to complement our studies on microglia by performing an experiment on primary cortical neurons indicating that, in the future therapy, amorfrutin B should protect neurons and modulate microglial activity. In our opinion, the unique ability of amorfrutin B to regulate the microglial response will support its neuroprotective potential for the future treatment of stroke and perinatal asphyxia.

## Materials and Methods

### Materials

A hypoxia modular incubator chamber (MIC-101) was acquired from Billups-Rothenberg, Inc. (San Diego, CA, USA). We used the following CO<sub>2</sub> incubators; New Brunswick Galaxy 170 R Stainless Steel CO<sub>2</sub> Incubator and New Brunswick Innova CO-170 CO<sub>2</sub> Incubator, both acquired from New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, USA). Phosphate-buffered saline (PBS – MS01P01003) was purchased from Biowest (Nuaille, France). Fluoro-Jade C Dry Powder (TR-160-FJC) was obtained from Biosensis (Thebarton, Australia). JC-1 (#30001) was obtained from Biotium, Inc. (Hayward, CA, USA). B27 (10889–038), Neurobasal medium (with glucose: 12348–017; without glucose: 12015621), and DMEM (with glucose: 31053–028; without glucose: A1443001) were obtained from Gibco (Grand Island, NY, USA). The oxygen analyser (GOX100 Cat. No. 600437) was from Greisinger (Regenstauf, Germany). The Bradford assay (5000006) was obtained from Bio-Rad

Laboratories (Munich, Germany). ELISA kits for IL-1 $\beta$  (E0143Hu), IL-10 (E0102Hu), PPAR $\gamma$  (E1511Hu), PGC1 $\alpha$  (E3509Hu), and BCL2 (BPE040) were purchased from Bioassay Technology Laboratory (Shanghai, China). The culture plates (6-well: 92006, 24-well: 92024, 96-wells: 92096) were obtained from TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Switzerland), and 75 cm<sup>2</sup> U-shaped canted neck cell culture flasks (353136) with a vent cap was obtained from Corning (New York, USA). HMC3 cells (CRL-3304<sup>TM</sup>, Lot number: 70046457), EMEM (30–2003), FBS (30–2020), and trypsin/EDTA (30–2101) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC—Virginia, USA). Fast Probe qPCR Master Mix (E0422-03) was from EurX (Gdansk, Poland). The Cytotoxicity Detection Kit (11644793001) was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). The primary anti-IBA1 (sc-32725) antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Amorfrutin B (SMB00532), GW9662 (M6191), L-glutamine (G-8540), FBS (F7524), DMSO (D8418), RIPA (89,901) buffer, protease inhibitor cocktail for mammalian tissues (P8340), penicillin–streptomycin antibiotics (P4333), caspase-1 substrate (SCP0070), MTT (M5655), BrdU cell proliferation assay (QIA58), calcein AM (C1359), and poly-L-ornithine hydrobromide (P4538) were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The RNeasy Mini Kit (74106) was obtained from Qiagen (Hilden, Germany). Alexa Fluor 647 IgG (A21235), a high-capacity cDNA reverse transcription kit (436881), alamarBlue<sup>TM</sup> Cell Viability Reagent (DAL1101), Hoechst 33342 (62249), and TaqMan probes (4331182) for specific genes encoding *ACTB*, *GAPDH*, *HPRT*, *IL1B*, *IL10*, *TNFA*, *PPARG*, *PGC1A*, and *BCL2* were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

### Human Microglial HMC3 Cell Line

For our experiments, the HMC3 cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA; CRL-3304<sup>TM</sup>, Lot number: 70046457), which is responsible for its distribution and confirmation of authenticity through a comprehensive identification procedure. Although rodent microglia has been extensively studied, the use of human microglia has been limited until human immortalized microglial cell lines have been developed and incorporated in ATCC. HMC3 cells differ from the primary microglia, mainly due to SV40-dependent immortalization of human embryonic microglial cells. According to Rai et al. (2020) HMC3 express microglia-specific and also typical myeloid markers with the exception of low or absent CD45 and CD11b expression. However, the cells have been characterized as responding to a pattern of chemokines and inflammatory stimuli and also regulating the expression

of activated microglia markers (Dello Russo et al. 2018; Baek et al. 2021). In accordance with the manufacturer's instructions, cells were seeded in T-75 flasks and cultivated in 15 ml of complete growth medium consisting of EMEM supplemented with FBS (10%). Trypsinization with 0.25% (w/v) trypsin and 0.53 mM EDTA solution was performed after the cells reached 90% confluence. For the purpose of obtaining a homogenous population for the experiments, cells were subcultured twice, analyzed to exclude the presence of mycoplasma and then frozen in aliquots at passage 3 (p3). After thawing, the cells were moved from cryovial to T-75 flasks and suspended in EMEM supplemented with 10% FBS (Fig. 1a). Due to experimental plans requiring two types of the same media, differing only in the presence or absence of glucose, the next day it was necessary to replace the culture EMEM medium with DMEM, which is commercially available with and without glucose and has a composition similar to EMEM. The day before experiment, the cells were seeded on multiwell dishes ( $2 \times 10^4$  viable cells per  $\text{cm}^2$ ) with reduced FBS concentration (5%) and allowed to recover overnight. The concentration of FBS was reduced in order to achieve more stable experimental conditions by controlling the proliferation rate, which is crucial for obtaining repeatable results.

### Primary neocortical neurons

Primary cultures of cortical neurons were obtained from mouse embryos at 15 days of gestation as previously described (Kajta et al. 2004). All animals were maintained according to the 3Rs principles and in compliance with European Union Legislation approved by the Bioethics Commission. Cortices from Swiss CD1 mouse embryos were dissected and digested with trypsin. After centrifugation, the isolated cells were suspended in Neurobasal medium supplemented with 10% FBS and placed in poly-*L*-ornithine-coated multiwell dishes at a density of  $\sim 2.0 \times 10^5$  viable cells/ $\text{cm}^2$ . After 3 days, the culture medium was exchanged for supplemented medium without FBS, and the cells were cultivated in a humidified atmosphere (37°C with 5% (vol/vol)  $\text{CO}_2$ ) for the next 4 days prior to the experiment. The percentage of astrocytes (identified with GFAP) did not exceed 10%, as previously described (Kajta et al. 2004).

### Experimental Models of Hypoxia/Ischemia

#### Hypoxia of HMC3 Cells and Primary Neurons

To simulate hypoxic conditions and obtain  $\text{O}_2$  levels close to zero, HMC3 cells and primary neurons were placed in a prewarmed and humidified hypoxia modular incubator chamber with 95%  $\text{N}_2/5\%$   $\text{CO}_2$ , as previously described (Wnuk et al. 2021a, Wnuk, Przepiórska et al. 2021). The  $\text{O}_2$  level in the

chamber reached less than 0.5%, as measured with an oxygen analyzer. As for HMC3 cells, the experimental model consisted of the following steps: i. 6 h of hypoxia with a reduced concentration of FBS (1%) in DMEM (4.5 g/l glucose), ii. 18 h of reoxygenation with the restored concentration of FBS (5%) in the same DMEM (6 + 18 paradigm; Fig. 1b). To capture hard to observe effects related to caspase-1 activity, we decided to shorten the chosen paradigm to 2 h of hypoxia and 5 h of reoxygenation, but only in this one case (2 + 5 paradigm; Fig. 1c). For primary neuronal cell cultures, the experimental model consisted of the following steps: i. 6 h of hypoxia in neurobasal medium (4.5 g/l glucose), ii. 18 h of reoxygenation with replaced neurobasal medium (Fig. 1d).

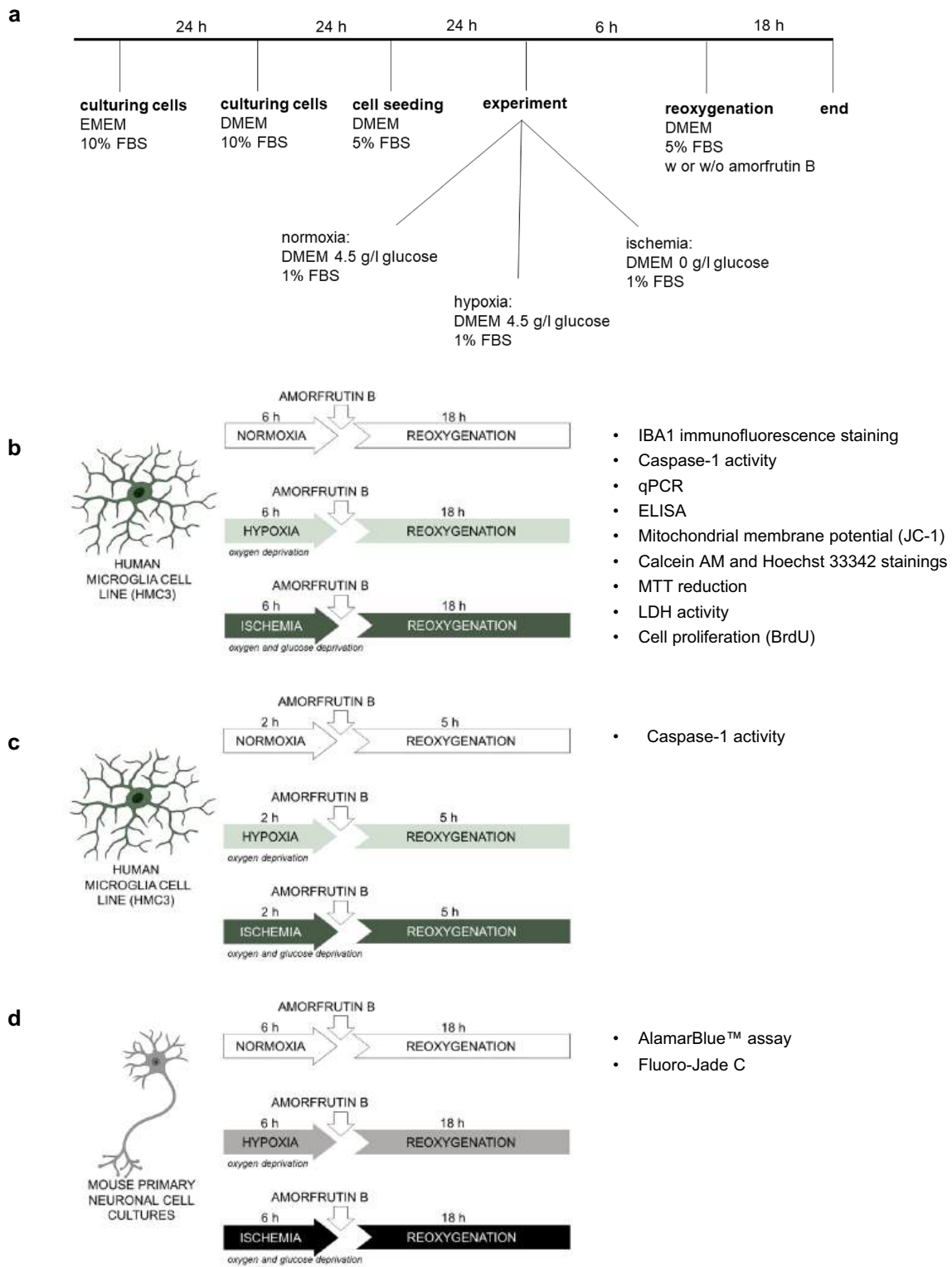
#### Ischemia of HMC3 Cells and Primary Neurons

To mimic ischemic conditions and deprive cells of  $\text{O}_2$  and glucose, HMC3 cells and primary neurons were placed in a prewarmed and humidified hypoxia modular incubator chamber with 95%  $\text{N}_2/5\%$   $\text{CO}_2$  in glucose-free medium. As for HMC3 the following experimental procedure was used: i. 6 h of ischemia with a reduced concentration of FBS (1%) in DMEM without glucose (0 g/l), ii. 18 h of reoxygenation with the restored concentration of FBS (5%) in DMEM supplemented with 4.5 g/l glucose (6 + 18 paradigm; Fig. 1b). Only in the case of caspase-1 activity assessment, we decided to shorten the chosen paradigm to 2 h of ischemia and 5 h of reoxygenation to capture hard to observe effects (2 + 5 paradigm; Fig. 1c). For primary neuronal cultures, the experimental model consisted of the following steps: i. 6 h of ischemia with neurobasal medium without glucose (0 g/l), ii. 18 h of reoxygenation with the medium replaced with standard neurobasal containing 4.5 g/l glucose (Fig. 1d). The control group included cultures that were not subjected to hypoxia or ischemia but were exposed to changes in FBS concentration analogous to those in the other groups (normoxic group).

#### Post-treatment with Amorfrutin B

##### Treatment of HMC3 Cells Subjected to Hypoxia/Ischemia

In our study, we applied the post-treatment paradigm based on the application of amorfrutin B at the beginning of the reoxygenation period. This paradigm better reflects clinical standards due to the narrow therapeutic window of currently available therapies (up to 4.5 h). Taking into account our previous and present studies, we decided to apply 1 and 5  $\mu\text{M}$  amorfrutin B, which induces neuroprotective effects in neurons subjected to hypoxia/ischemia. We wanted to observe specific effects on microglia to compare and follow-up effects obtained in our previous and present studies. Amorfrutin B was dissolved in DMSO and then in DMEM,



**Fig. 1** The timeline showing experimental conditions from culturing to the end of the experiment (**a**). Experimental models of hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment in human microglia cell line HMC3 (**b** and **c**) and primary neuronal cell cultures (**d**)



resulting in DMSO concentrations less than 0.1%. After the experiments, the biological material was collected and used for further biochemical and molecular analyses.

### Treatment of Primary Neurons Exposed to Hypoxia/Ischemia

To complement and compare the effects obtained in HMC3 cells, we decided to conduct additional experiments supporting our previous studies. Both concentration-dependent experiments (0.1, 1, 5, and 10  $\mu\text{M}$ ) and experiments with the most effective concentrations of amorfrutin B (1 and 5  $\mu\text{M}$ ) were performed. In pursuit of better clinical translation, the post-treatment paradigm was applied, i.e., amorfrutin B was added to the cell cultures at the beginning of the reoxygenation period for the next 18 h until the end of the experiments. Treated neurons were maintained in a humidified incubator (37 °C with 5% (vol/vol)  $\text{CO}_2$ ), and after 24 h of experiment, the biological material was collected for further biochemical or molecular analyses. After amorfrutin B was dissolved in DMSO, it was added to the neurobasal medium. The concentration of DMSO was less than 0.1%.

### Treatment with a PPAR $\gamma$ Antagonist (GW9662)

The involvement of the PPAR $\gamma$  receptor in amorfrutin B-induced neuroprotection was verified with the receptor antagonist GW9662 (1  $\mu\text{M}$ ). GW9662 was added to the culture medium after 6 h of hypoxia/ischemia in a post-treatment paradigm. After 40 min, amorfrutin B (1 and 5  $\mu\text{M}$ ) was added to the cell cultures for the next 18 h of reoxygenation. Amorfrutin B and GW9662 were used at concentrations that did not affect the level of cell neurodegeneration, as determined by Fluoro-Jade C; moreover, we applied both effective concentrations of amorfrutin B (1 and 5  $\mu\text{M}$ ) to avoid nonspecific effects. Both compounds were dissolved in DMSO and subsequently in culture medium, leading to a DMSO concentration less than 0.1%.

### Measurement of Cell Viability with AlamarBlue™ Reagent

After 6 h of hypoxia/ischemia and 18 h of amorfrutin B treatment, we diluted 10 $\times$  alamarBlue™ in cell culture medium and added it to the neuronal cultures. The cells were incubated with the solution for 3 h at 37 °C, and the absorbance was assessed at a wavelength of 570 nm (using 600 nm as a reference) with an Infinite M200 PRO microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland) and i-control software. The presence of viable cells induces a reduction in the color of blue resazurin to pink resorufin, and the absorbance level is proportional to the number of living cells (Lescat et al. 2019). All the results were compared with the absorbance levels of vehicle-treated cells and are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM.

### Assessment of Neurodegeneration with Fluoro-Jade C

To assess the level of degenerating neurons in response to hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment, we decided to use Fluoro-Jade C (Wnuk et al. 2021a, Wnuk, Przepiórska et al. 2021; Pietrzak-Wawrzyńska et al. 2023). This fluorochrome dye was diluted in distilled water, resulting in a 0.005% working solution. After the experiment, 100  $\mu\text{l}$  of culture medium was replaced with Fluoro-Jade C reagent per well, and the cells were incubated for 1 h. Subsequently, the fluorescence was measured at an excitation wavelength = 490 nm and an emission wavelength = 525 nm using an Infinite M200 PRO microplate reader, and i-control software. The fluorescence data were compared to those of the vehicle-treated cells and are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM. Fluoro-Jade C is a green fluorescent dye, and the fluorescence intensity is proportional to the number of degenerating neurons.

### Immunofluorescence Staining with IBA1

Immunofluorescence staining with IBA1 and confocal microscopy were used to detect and visualize microglia, which were cultured on glass coverslips. After 6 h of hypoxia/ischemia and 18 h of amorfrutin B treatment, the cultures were fixed with 4% paraformaldehyde. After 3 washes, the cells were incubated for 1 h with blocking buffer containing 5% normal donkey serum and 0.3% Triton X-100 in 0.01 M PBS. Then, the microglial cells were treated with an anti-IBA1 primary antibody (diluted 1:100) and incubated at 4 °C for 24 h. The last step of the assay involved incubating the cells with a secondary antibody, after which the slides were washed, mounted, and coverslipped. The negative control with blocking buffer depleted of primary antibody excluded the nonspecific binding of the secondary antibody to the sample components and confirmed the specific binding of the IBA1 to its target antigen. The microscopic preparations were analyzed with a Leica TCS SP8 WLL confocal laser scanning microscope (DMi8-CS, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and the pixel intensity was assessed using ImageJ software (FIJI version; 1.54f). The frequency of the brightest pixels in the region of interest was quantified by determining the mean fluorescence intensity excluding the background. The immunofluorescence signal corresponded to the IBA1 expression level.

### Estimation of Caspase-1 Activity

Caspase-1 activation was assessed in microglial cells exposed to hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment. Cultures were lysed with buffer containing DTT, and the cell lysates were incubated with caspase-1 substrate (Ac-Trp-Val-Ala-Asp-pNA; Sigma—Aldrich, USA) at 37 °C. According to the manufacturer, this colorimetric substrate

cleaves specifically at aspartic acid in the presence of caspase-1, and the level of released *p*-nitroaniline was determined by measuring the absorbance at 405 nm. After 1 h of incubation, the level of *p*-nitroaniline was measured with an Infinite M200 PRO microplate reader and i-control software. The results were compared to the absorbance of the vehicle-treated cells (normoxic conditions) and are presented as the percentage of the control  $\pm$  SEM.

### Assessment of the Mitochondrial Membrane Potential with JC-1

To determine the mitochondrial membrane potential in microglial cells subjected to hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment, the JC-1 was added to the plate and incubated for 1 h at 37 °C, as previously described (Rzemieniec et al. 2015; Wnuk et al. 2020). This lipophilic dye enters mitochondria, and in healthy cells, forms aggregates, which emit red fluorescence (an indicator of increased mitochondrial membrane potential). The JC-1 solution was replaced with PBS, and both red (540 nm/590 nm) and green (490 nm/525 nm) fluorescence intensities were measured with an Infinite M200 PRO microplate reader. The data are expressed as the red to green fluorescence ratio and are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM.

### Fluorescence Staining with Calcein AM and Hoechst 33342

Microglial cell cultures were subjected to hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment. After the experiment, the cells were incubated with Hoechst 33342 (2  $\mu$ g/ml solution) at room temperature for 5 min. Then, the cultures were incubated with 2  $\mu$ M calcein AM reagent at room temperature for 10 min, as previously described (Kajta et al. 2019). The cells were visualized with a Leica DM IL LED Inverted Microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using constant illumination settings. The living cells presented green cytoplasm (calcein AM), while blue fluorescence staining was specific for the nuclei of microglial cells (Hoechst 33342).

### Microglial Morphometric Analysis

The total number of cells was estimated basing on the number of cell nuclei (Hoechst 33342), while morphometric analysis was performed basing on staining of living cells (calcein AM). The semi-automated analysis with ImageJ (Java-based FIJI version; 1.54f) was performed to assess: the ramification index, cell body area, minimum Feret diameter, and microglia cell number. The basic step of analysis involved converting the grayscale picture into a binary image with setting the threshold value. Segmenting the image and separating the foreground from the background constituted a crucial action in determining

cell number and morphological status. Particle analysis provided valuable insights into the total number of particles in image (microglial cell counting), area occupied by each particle (cell body surface), and closest possible distance between the two parallel tangents of an object (minimum Feret diameter). The ramification index was determined by fractal analysis as presented in previous studies (Becker et al. 2018; Kogel et al. 2021; Wittekindt et al. 2022). It was calculated in three steps: i. estimation of the cell area ( $A_c$ ), ii. using convex hull algorithm to measure projection area ( $A_p$ ), iii. determining the ratio of  $A_c$  to  $A_p$  and interpretation of obtained results. Quiescent microglia exhibit small bodies and ramified processes (small  $A_c$  and large  $A_p$ ), while activated microglia is characterized by hypertrophy of soma and retracted processes (similar  $A_c$  and  $A_p$ ). Consequently, the ramification index of activated microglia approaches the value close to 1. An increased ramification index indicates morphological changes and heightened reactivity of microglia. The results of all analyses are presented as mean or as the percentage of the control  $\pm$  SEM.

**Measurement of MTT Reduction** A colorimetric MTT assay was used to evaluate the mitochondrial function and metabolic activity of microglial cells subjected to hypoxia/ischemia and amorfrutin B treatment. The cell cultures were treated with MTT solution, and after 1 h of incubation at 37 °C, the reagent was replaced with 100% DMSO, which was used to dissolve the formazan crystals. The MTT assay is based on reducing MTT by oxidoreductase enzymes to purple formazan, and the intensity of the purple color is proportional to the metabolic activity of the cells. The absorbance at 570 nm was measured with an Infinite M200 PRO microplate reader, and the data were analyzed with i-control software and are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM.

**Determination of LDH Release** A Cytotoxicity Detection Kit was used to assess the lactate dehydrogenase level in cell-free supernatants collected immediately after the experiment. The supernatants were incubated with the appropriate reaction mixture for 30–60 min, resulting in a colorimetric reaction, as previously described (Kajta et al. 2001). The intensity of the red color was measured using an Infinite M200 PRO microplate reader at a wavelength of 490 nm and was proportional to the extent of plasma membrane damage in response to hypoxia/ischemia. The results obtained from the experiments were analyzed with an i-control and are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM.

**Assessment of the Proliferation Potential with BrdU** To quantify the incorporation of BrdU into newly synthesized DNA from active proliferating microglial cells, a BrdU cell proliferation assay was applied after hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment, according to the manu-

facturer's protocol. The cell medium was complemented with 20  $\mu\text{l}$  of working stock of BrdU per well. After 2 h of incubation at 37°C, the reagent was removed, and the cells were reconstituted with fixative/denaturing solution. The next step involved incubating the cells with an anti-BrdU antibody (1:100 dilution), followed by exposure to a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG HRP. The cells were washed 3 times with buffer and subjected to substrate solution, followed by stop solution. The absorbance of each well was measured at 450 nm with an Infinite M200 PRO microplate reader, and the data were analyzed with i-control software. The results are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM.

**qPCR Analysis of mRNAs Specific to the Genes Encoding *IL1B*, *IL10*, *TNFA*, *PPARG*, *PGC1A* and *BCL2*** Microglial cells were subjected to hypoxic/ischemic conditions and amorfrutin B post-treatment, after which total RNA was collected and isolated using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as previously described (Wnuk et al. 2016, 2018). After spectrophotometric determination of the RNA content in the sample, reverse transcription, and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were performed using a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The RNA (1000 ng) was reverse-transcribed to the cDNA template in a final volume of 50  $\mu\text{l}$  using a high-capacity cDNA reverse transcription kit. The obtained products were amplified using TaqMan Gene Expression Assays specific for genes encoding *IL1B*, *IL10*, *TNFA*, *PPARG*, *PGC1A*, and *BCL2*. The entire volume of the reaction mixture contained 10  $\mu\text{l}$  of Fast Probe qPCR Master Mix, 8  $\mu\text{l}$  of RNase-free water, 1  $\mu\text{l}$  of cDNA, and 1  $\mu\text{l}$  of TaqMan Gene Expression Assay. The qPCR process consisted of series of temperature changes: 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by 55 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The mRNA expression level was detected in the 40<sup>th</sup> (last) cycle; however, due to the small amount of material, we decided to increase the number of cycles from 40 to 55. The data were analyzed using the Ct for each sample and the delta Ct method. The reference gene was chosen from among *GAPDH*, *HPRT* and *ACTB*, while geNorm, NormFinder, and BestKeeper pointed to *ACTB* as the most stable reference gene. The obtained results are presented as fold changes  $\pm$  SEM.

**ELISAs for IL-1 $\beta$ , IL-10, PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ , and BCL2** After 24 h of experiment, the microglial cells were gently washed with ice-cold PBS and lysed with ice-cold RIPA lysis buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail. The collected samples were sonicated and centrifuged (15,000 $\times$ g for 20 min at 4 °C), and the obtained supernatants were collected as previously described (Kajta et al. 2017; Rzemieniec et al. 2019). The protein concentration was estimated using the

Bradford method, and bovine serum albumin was used as a standard. Both standards and samples of known concentrations (~2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) were added to plates precoated with IL-1 $\beta$ , IL-10, PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ , and BCL2. Next, biotin-labeled detection antibodies and streptavidin-HRP were added to each well. All the wells were washed with buffer, and the reaction was completed by adding substrate solutions. The color of the reaction developed according to the concentration of the protein of interest, and the reaction was terminated by the addition of acidic stop solution. The absorbance was measured at 450 nm with an Infinite M200 PRO microplate reader, and the data are presented as a percentage of the control value  $\pm$  SEM or pg/mg of total protein.

**Data Analysis** All the results were obtained as the absorbance or fluorescence units per well for alamarBlue™, caspase-1, MTT, LDH, BrdU or Fluoro-Jade C, JC-1, fluorescence units for qPCR; and pg per mg of total protein for the ELISAs. The statistical analysis of the data and the estimation of significance were conducted with analysis of variance (ANOVA), and the post hoc Newman–Keuls test. A *p* value less than 0.05 was considered to indicate statistical significance and is presented as follows: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001 (compared to the control groups); #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, and ###*p* < 0.001 (compared to the hypoxic group); ^*p* < 0.05, ^^*p* < 0.01, and ^^*p* < 0.001 (compared to the ischemic group); and \$\$\$*p* < 0.001 (compared to the cells subjected to both hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment). The effects of amorfrutin B or GW9662 on selected basic parameters related to cell survival under normoxic conditions are presented in the supplementary information (Figs. S1 and S2, Tables S1 and S2). Differences in the effects of the hypoxic and ischemic models and effects of amorfrutin B action between the hypoxic and ischemic conditions are also presented as the supplementary material (Figs. S3–S10).

## Results

### Amorfrutin B Inhibited the Activation of Microglia Through Decrease in IBA1 Expression

In this study, a 6-h hypoxia/ischemia model followed by 18 h of reoxygenation/amorfrutin B treatment was used. Immunofluorescence staining and confocal microscopy confirmed the expression of IBA1 by microglia. IBA1-specific staining revealed that both during hypoxia and ischemia, there was an increase in signal intensity, which was reduced after amorfrutin B (1 and 5  $\mu\text{M}$ ) treatment (Fig. 2). The basic intensity quantification method indicated that during hypoxia, there was an increase in fluorescence intensity from 100% (normoxia) to 237%, while amorfrutin B decreased it

to 142% (1  $\mu$ M) and 153% (5  $\mu$ M). In the case of ischemia, the fluorescence intensity reached 309%, and amorfrutin B post-treatment decreased the fluorescence intensity to 114% (1  $\mu$ M) and 125% (5  $\mu$ M). The negative control without primary antibody excluded the nonspecific binding of the secondary antibody to the sample. The IBA1 staining of microglial cells under normoxic conditions and amorfrutin B treatment was provided as supplementary material (Fig. S1).

### Post-treatment with Amorfrutin B Decreased Proinflammatory Caspase-1 Activity During Hypoxia and Ischemia

#### 6 h of Hypoxia/Ischemia Followed by 18 h of Reoxygenation with or without Amorfrutin B Post-treatment

During 6 h of hypoxia/ischemia and 18 h of reoxygenation, there were no changes in caspase-1 activity (96% and 87%, respectively), while amorfrutin B post-treatment decreased caspase-1 levels only under ischemic conditions (Fig. 3a). During ischemia, 1 and 5  $\mu$ M amorfrutin B reduced caspase-1 activity to 68% and 72% of the control value, respectively.

#### 2 h of Hypoxia/Ischemia Followed by 5 h of Reoxygenation with or without Amorfrutin B Post-treatment

In our study, 2 h of hypoxia/ischemia and 5 h of reoxygenation increased caspase-1 activity up to 138% and 123% of the control value, respectively. Under hypoxic conditions, amorfrutin B at both concentrations (1 and 5  $\mu$ M) reversed these effects to 97% and 67%, respectively. In the case of ischemia, amorfrutin B (1 and 5  $\mu$ M) also decreased this parameter to 78% and 92% of the control value, respectively (Fig. 3b). The caspase-1 activities in microglial cells under normoxic conditions and amorfrutin B treatment (both paradigms) were provided as supplementary material (Table S1a).

### Administration of Amorfrutin B Inhibited Inflammation in Microglia Subjected to Hypoxia and Ischemia

#### Gene Expression of *IL1B*, *IL10*, and *TNFA* in Microglia

The mRNA expression analysis with qPCR showed that cells exposed to 6 h of hypoxia/ischemia and 18 h of reoxygenation had increased expression levels of proinflammatory factors, such as *IL1B* (1.49-fold) during hypoxia and *TNFA* during hypoxia (6.57-fold), and ischemia (4.89-fold). In response to amorfrutin B post-treatment, *IL1B* expression was decreased to 0.77-fold (1  $\mu$ M amorfrutin B), 0.50-fold (5  $\mu$ M amorfrutin B) during hypoxia, and 0.60-fold (5  $\mu$ M amorfrutin B) in the case of ischemia. Amorfrutin B at a concentration of 5  $\mu$ M decreased *TNFA* expression to

4.90-fold only during hypoxia, while during ischemia, there were no statistically significant changes in *TNFA* expression (Fig. 4a). Interestingly, the *IL10* expression level was not detectable both during hypoxia or ischemia; however, amorfrutin B post-treatment restored the expression of this gene at the detectable level under hypoxic conditions (2.63-fold in the case of 1  $\mu$ M amorfrutin B and 2.51-fold in the case of 5  $\mu$ M amorfrutin B) and ischemic conditions (2.99-fold in the case of 1  $\mu$ M amorfrutin B and 2.08-fold in the case of 5  $\mu$ M amorfrutin B).

#### Protein Expression Levels of IL-1 $\beta$ and IL-10 in Microglia

ELISAs showed that the protein levels of IL-1 $\beta$  and IL-10 reached 0.90 and 0.23 pg/mg of total protein, respectively (Fig. 4b). Both under hypoxic and ischemic conditions, the protein level of IL-1 $\beta$  remained unchanged; however, post-treatment with 1 or 5  $\mu$ M amorfrutin B reduced the level of this factor as follows: 0.61 pg/mg (equal to 68% of the control) and 0.60 pg/mg (equal to 66% of the control) in the hypoxic model, respectively, and 0.52 pg/mg in the case of both concentrations (equal to 57% of the control) in the ischemic model. Both hypoxia and ischemia reduced the protein level of IL-10 to 0.18 pg/mg (equal to 76% of the control). During hypoxia, post-treatment only with 1  $\mu$ M amorfrutin B increased the IL-10 concentration to 0.34 pg/mg (equal to 147% of the control), while during ischemia, post-treatment only with 5  $\mu$ M amorfrutin B increased the IL-10 concentration to 0.24 pg/mg (equal to 104% of the control).

### Amorfrutin B Increases the Expression of *PPARG*/*PPAR $\gamma$* and *PGC1 $\alpha$* in Microglia Subjected to Hypoxia and Ischemia

#### Gene Expression of *PPARG* and *PGC1A* in Microglia

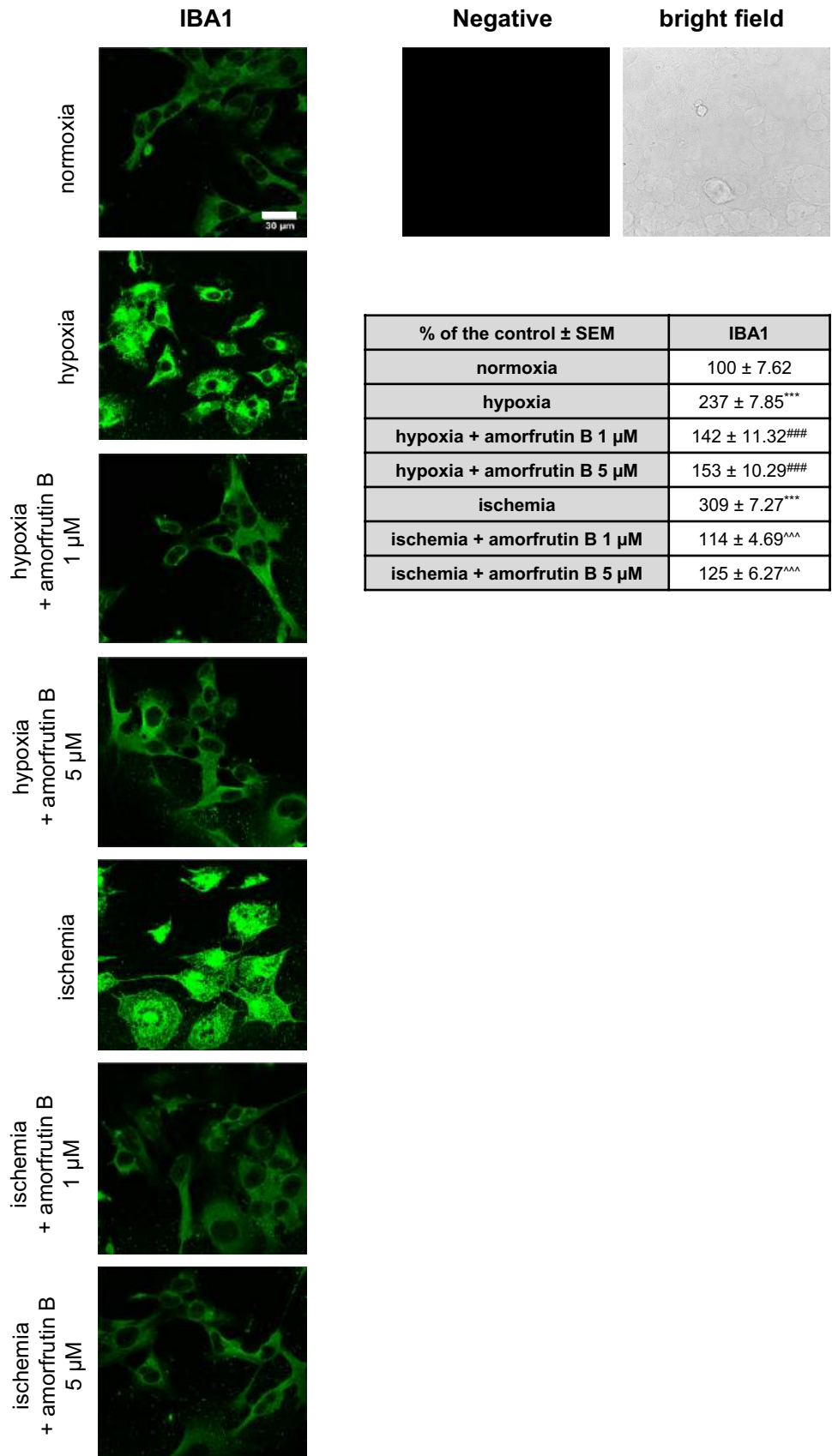
In microglial cultures exposed to hypoxia and ischemia, the expression level of *PPARG* reached 0.67-fold and 0.60-fold, respectively. In the case of hypoxia, the administration of amorfrutin B (1 and 5  $\mu$ M) at the beginning of the reoxygenation period resulted in an increase in *PPARG* expression to 1.11-fold and 1.01-fold relative to the control, respectively. In the case of ischemia, post-treatment with 1  $\mu$ M amorfrutin B resulted in an increase in *PPARG* expression to 1.02-fold of the control. Neither hypoxia/ischemia nor amorfrutin B (1 or 5  $\mu$ M) treatment affected *PGC1A* expression (Fig. 5a).

#### Protein Expression Levels of *PPAR $\gamma$* and *PGC1 $\alpha$* in Microglia

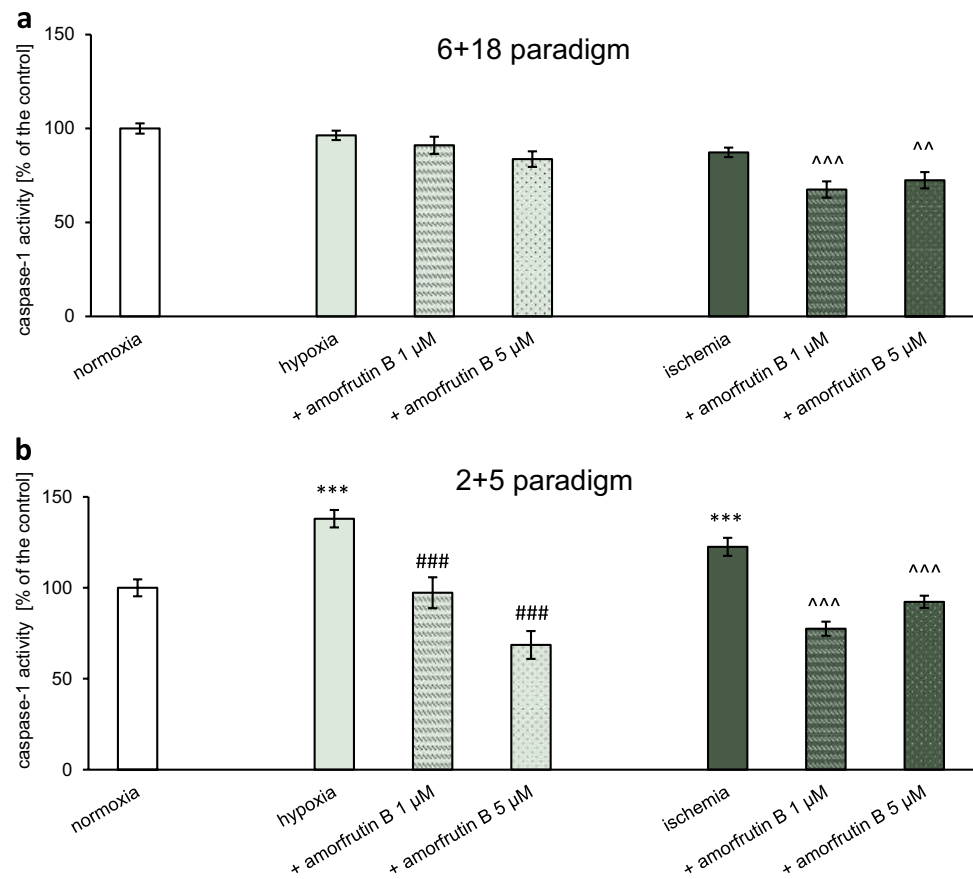
In control cells, the protein levels of *PPAR $\gamma$*  and *PGC1 $\alpha$*  reached 5.86 pg/mg and 32.40 pg/mg, respectively,



**Fig. 2** Post-treatment with amorfrutin B inhibited IBA1 expression (green staining). The negative control and the representative bright field image are also presented. The table shows the mean fluorescence intensity. The results are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM. <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  compared to the control group; <sup>###</sup> $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia; <sup>^^^</sup> $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia. There were 5 replicates in each group



**Fig. 3** Amorfrutin B treatment after 6 h of ischemia inhibited caspase-1 activity in microglia (a), while administration of amorfrutin B after 2 h of hypoxia/ischemia reduced caspase-1 activity, which was increased in microglia in response to hypoxia and ischemia (b). The results are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, consisting of 8–12 replicates per group. \*\*\* $p < 0.001$  compared to the control group; ### $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia; ^^ $p < 0.01$ , ^^ $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia

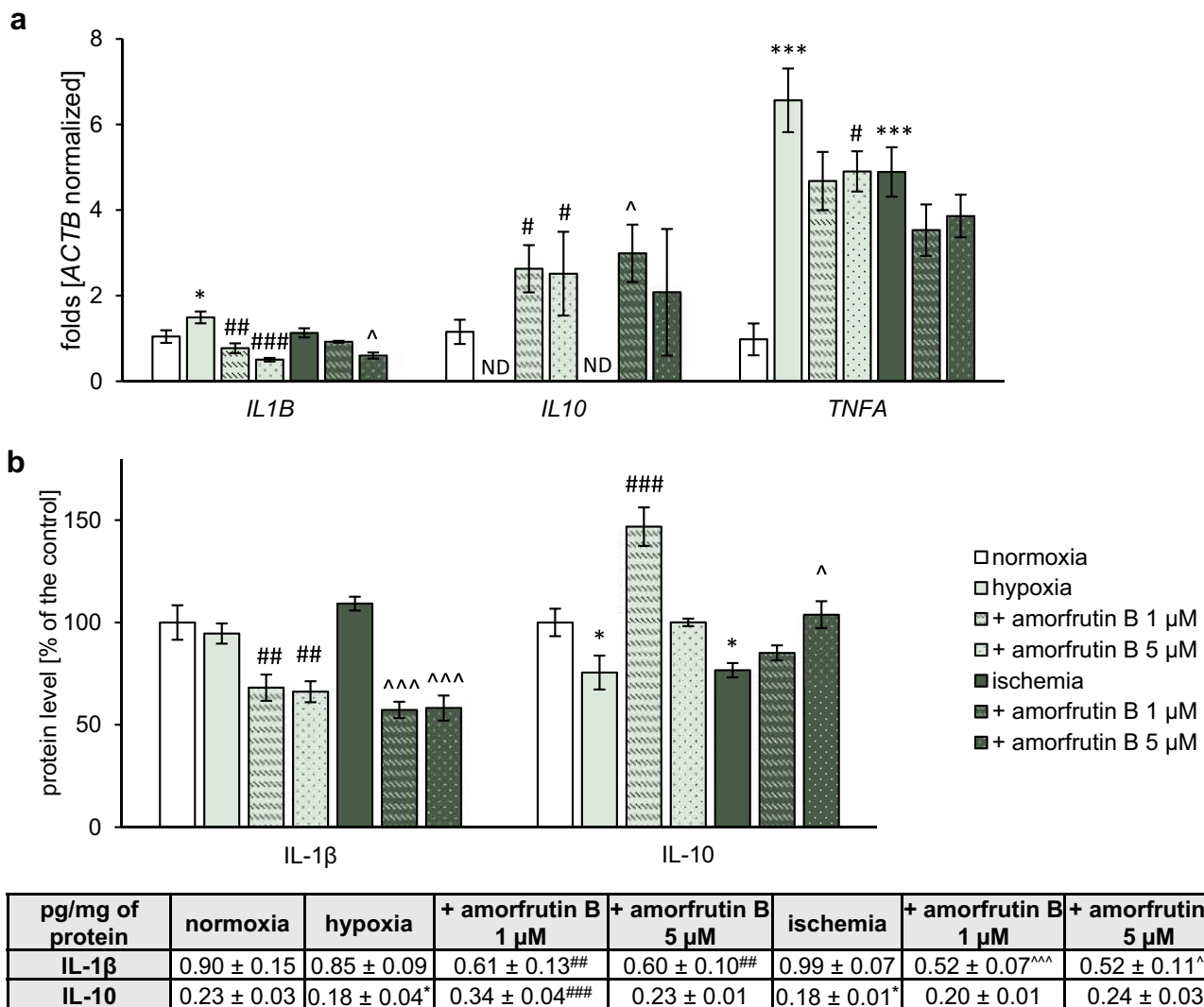


as determined by ELISA (Fig. 5b). During hypoxia and ischemia, the protein level of PPAR $\gamma$  decreased to 3.85 pg/mg (equal to 66% of the control) and 3.79 pg/mg (equal to 65% of the control), respectively. Amorfrutin B partially reversed these effects only at a concentration of 5  $\mu$ M, and during hypoxia, the PPAR $\gamma$  level reached 5.31 pg/mg (equal to 91% of the control). The protein level of PGC1 $\alpha$  was diminished to 26.49 pg/mg (equal to 82% of the control) and 25.64 pg/mg (equal to 79% of the control) in response to hypoxia and ischemia, respectively. In the case of hypoxia, treatment with 1 or 5  $\mu$ M amorfrutin B increased the PGC1 $\alpha$  level up to 39.48 pg/mg (equal to 122% of the control) and 49.36 pg/mg (equal to 152% of the control), respectively. In the case of ischemia, treatment with 1 or 5  $\mu$ M amorfrutin B increased the PGC1 $\alpha$  level up to 47.49 pg/mg (equal to

147% of the control) and 43.66 pg/mg (equal to 135% of the control), respectively.

### Administration of Amorfrutin B Reduced the Mitochondrial Membrane Potential in Microglia Exposed to Hypoxia and Ischemia

Our study using JC-1 demonstrated that 6 h of hypoxia/ischemia and 18 h of reoxygenation led to increases in the mitochondrial membrane potential to 175% and 184% compared to normoxia, respectively (Fig. 6). Amorfrutin B at a concentration of 1  $\mu$ M did not induce changes in mitochondrial membrane potential, but post-treatment with 5  $\mu$ M amorfrutin B decreased it to 138% during hypoxia and 162% during ischemia. The mitochondrial membrane potential in microglial cells under normoxic conditions and amorfrutin



**Fig. 4** Post-treatment with amorfrutin B diminished the expression level of proinflammatory factors and induced/increased the expression level of anti-inflammatory factor in microglia subjected to hypoxia and ischemia. These changes are related to the expression levels of genes (a) and proteins (b). The obtained results are presented as the fold change in the case of qPCR and percentage of the control or pg/mg of protein ± SEM in the case of ELISA. There

were 3 independent experiments, consisting of 5–6 replicates per group. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to the control group; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia; ^ $p < 0.05$  and ^^ $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia. ND indicates that the expression level was undetectable

B treatment was presented as supplementary material (Table S1b).

### Post-treatment with Amorfrutin B Reduced *BCL2* Expression in Microglia Subjected to Hypoxia/Ischemia

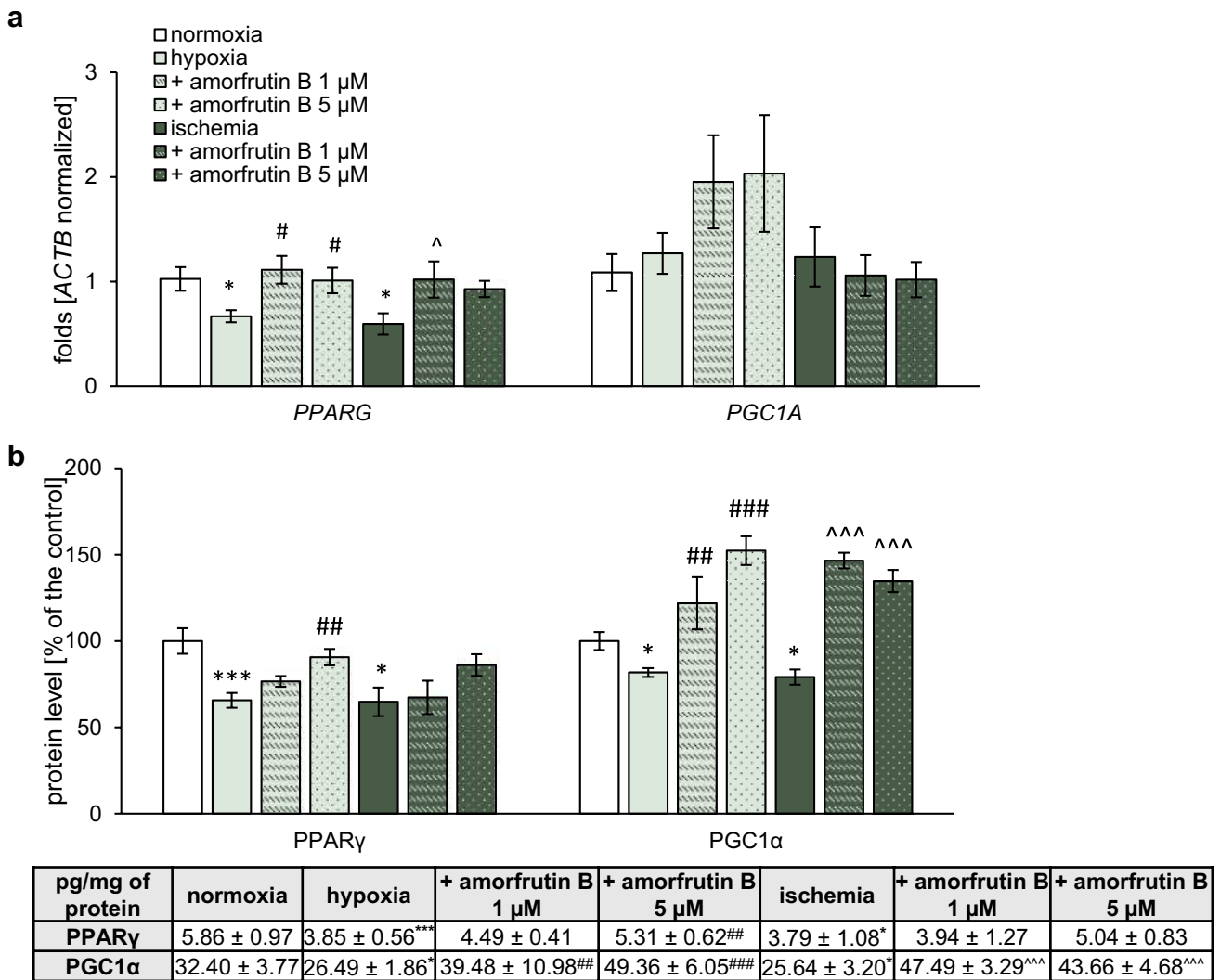
#### Gene Expression of *BCL2* in Microglia

qPCR analysis revealed that both hypoxia and ischemia caused a massive increase in the expression level of *BCL2*, which reached 8.88-fold and 9.88-fold compared

to normoxia, respectively (Fig. 7a). Amorfrutin B at both concentrations (1 and 5 μM) decreased the expression of *BCL2* during hypoxia, which was manifested as a decrease to 2.18-fold and 1.06-fold, respectively. As for ischemia, post-treatment with 1 or 5 μM amorfrutin B decreased the *BCL2* expression level to 5.51-fold or 2.28-fold, respectively.

#### Protein Expression Level of *BCL2* in Microglia

ELISA indicated that hypoxia increased the protein level of *BCL2* from 19.56 pg/mg (normoxia) to 24.38 pg/mg (equal to 125%), while post-treatment with 1 and 5 μM



**Fig. 5** Amorfrutin B post-treatment increased *PPARG*/*PPARγ* and *PGC1α* protein in microglia under hypoxic/ischemic conditions. The results are presented as the fold change in the case of qPCR (a) and as the percentage of the control or pg/mg of protein ± SEM in the case of ELISA (b). There were 3 independent experiments, consisting of

5–6 replicates per group. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the control group; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  and ###  $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia; ^  $p < 0.05$  and ^^  $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia

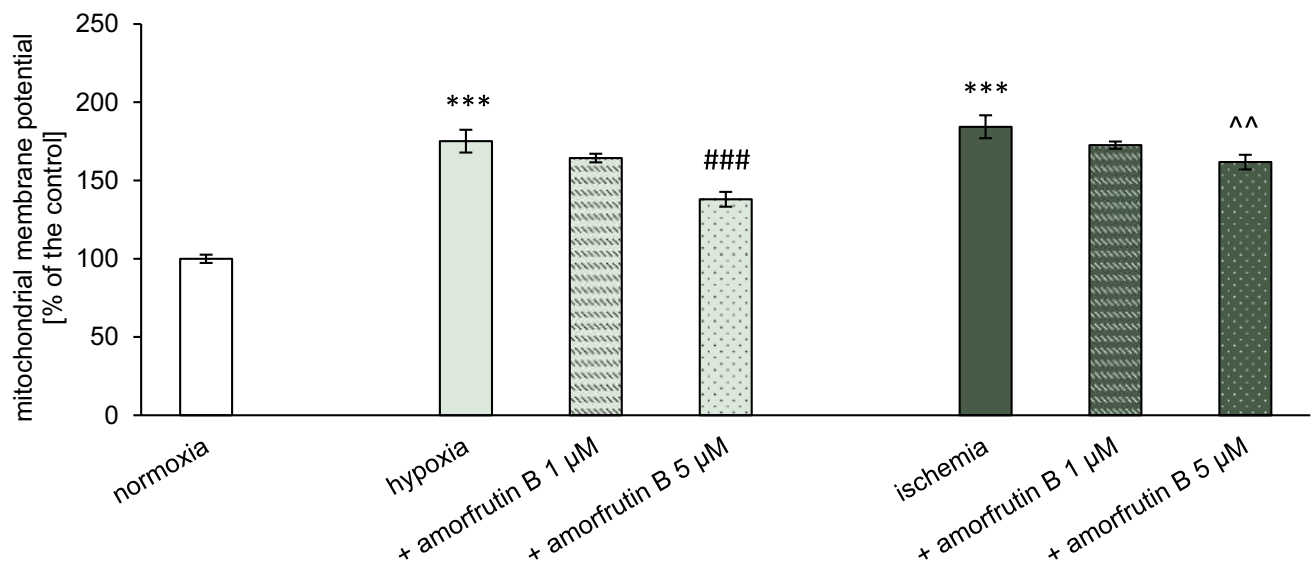
amorfrutin B reduced this level to 17.52 pg/mg (equal to 90% of the normoxic value) and 16.66 pg/mg (equal to 85% of the normoxic value), respectively. Ischemia did not affect the protein level of BCL2, however, post-treatment with 5 μM amorfrutin B decreased the protein level of BCL2 to 14.92 pg/mg, which was equal to 76% of the normoxic value, while a 1 μM concentration had no effect (Fig. 7b).

**Amorfrutin B Normalized the Morphology of Microglia During Hypoxia/Ischemia**

To examine the gross morphology of the HMC3 cells, we used calcein AM to label living cells and Hoechst 33342 to visualize the cell nuclei. The morphometric analysis of cells

was conducted using particle and fractal analysis (Fig. 8a). In case of hypoxia the ramification index increased to 0.77, while amorfrutin B (1 and 5 μM) post-treatment reduced this value to 0.48 and 0.36, respectively. Ischemia also caused an increase in the ramification index, reaching value 0.72, while amorfrutin B decreased this value to 0.44 (1 μM amorfrutin B) and 0.37 (5 μM amorfrutin B). Comparing to normoxia (ramification index = 0.35), we can infer that values close to 1 indicated microglial cell activation, while amorfrutin B normalized this parameter under hypoxic and ischemic conditions, thereby restoring the morphology of cells characteristic of quiescent microglia (Fig. 8b). During hypoxia and ischemia, there was an increase in cell body area (up to 364% and 351%, respectively) and minimum Feret diameter





**Fig. 6** In microglia, post-treatment with amorfrutin B (5 μM) partially reversed hypoxia- and ischemia-induced increases in the mitochondrial membrane potential. The results are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, consisting

of 8–12 replicates per group. \*\*\* $p$  < 0.001 compared to the control group; ### $p$  < 0.001 compared to the cultures exposed to hypoxia; and ^^ $p$  < 0.01 compared to the cultures exposed to ischemia

(up to 176 and 175%, respectively). Treating cells with amorfrutin B (1 and 5 μM) after hypoxic injury resulted in a decrease in cell body surface to 239% and 123%, as well as decrease in minimum Feret diameter to 146% and 105%, respectively. Post-treatment with amorfrutin B (1 and 5 μM) after ischemia contributed to reduction in cell body surface to 191% and 139% (Fig. 8c), as well as reduction in minimum Feret diameter to 126% and 116%, respectively (Fig. 8d). The analysis of the number of cell nuclei (stained with Hoechst 33342) showed that it remained unchanged regardless of the conditions (Fig. 8e). Taking all together, this morphometric analysis indicated that 6 h of hypoxia/ischemia and 18 h of reoxygenation induced a morphological shift; the cells retracted their processes, taking on a rounded or amoeboid shape and large cell bodies (functionally M1-like phenotype). Post-treatment with amorfrutin B in both models resulted in morphological changes resembling the state of cells under normoxic conditions; i.e., cells exhibited a ramified appearance and had smaller cell bodies (functionally M2-like phenotype). The calcein AM and Hoechst 33342 staining of microglial cells under normoxic conditions and amorfrutin B treatment was provided as supplementary material (Fig. S2).

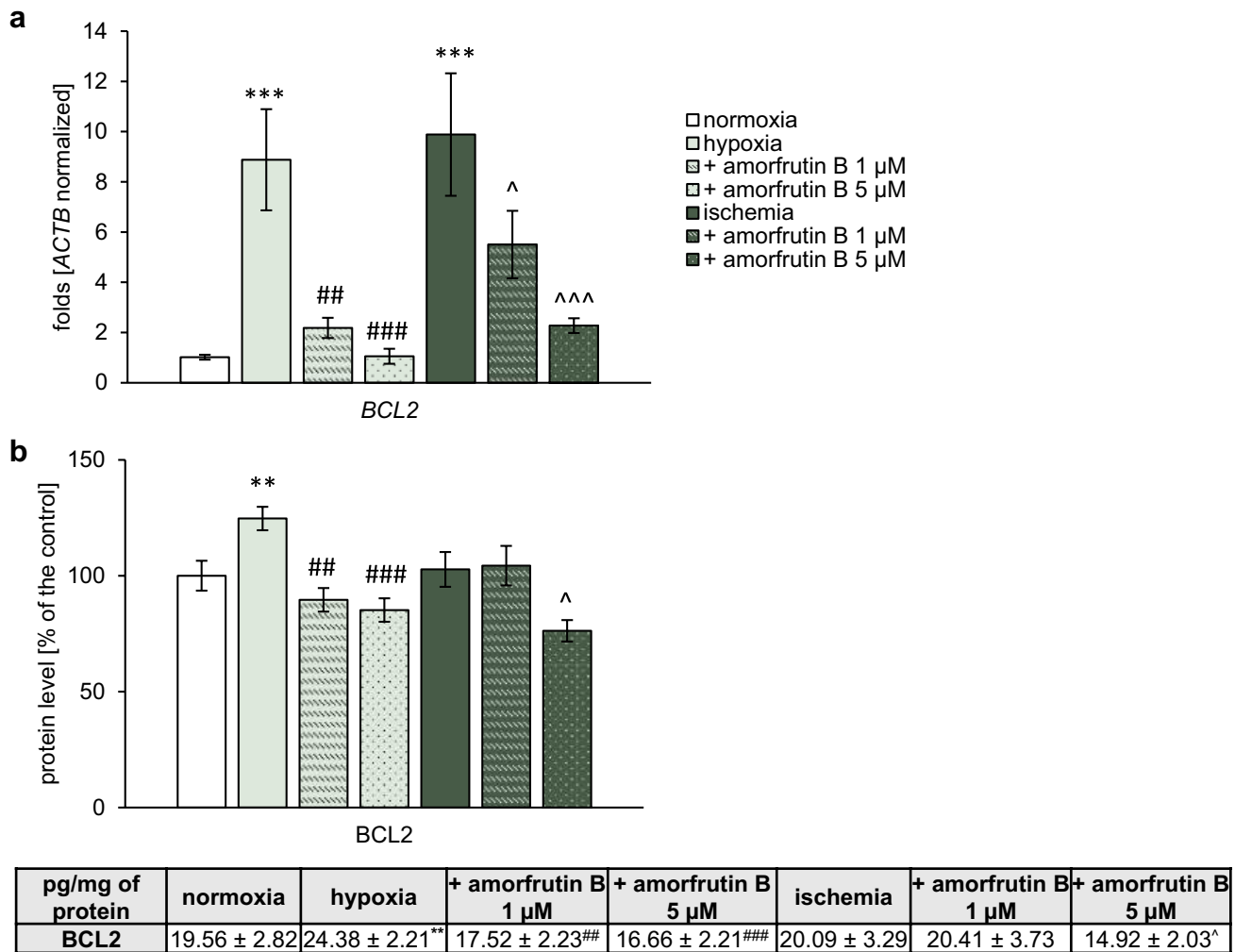
### Amorfrutin B Impaired the Hypoxia/ Ischemia-induced Increase in Metabolic Activity of Microglia

MTT assay determined that 6 h of hypoxic or ischemic conditions and 18 h of reoxygenation increased the metabolic

activity of microglial cells from the control value (100%) to 121% during hypoxia and 119% during ischemia. In the hypoxic paradigm, post-treatment with amorfrutin B at both concentrations (1 and 5 μM) resulted in normalization of metabolic activity, which was manifested by decrease of this parameter to 106% and 112% of the control value, respectively. In the case of ischemia, amorfrutin B (1 and 5 μM) administration at the beginning of the reoxygenation period also resulted in metabolic activity normalization, manifested by decreases to 102% and 111% of the control value, respectively (Fig. 9a). The MTT reduction in microglial cells under normoxic conditions and amorfrutin B treatment was presented as supplementary material (Table S1c).

### Amorfrutin B Only Partially Reversed the Hypoxia/ Ischemia-induced Decrease in LDH Release From Microglial Cells

Our study showed that 6 h of hypoxia or ischemia and 18 h of reoxygenation decreased LDH levels to 79% and 73% of the normoxic value, respectively. Exposure to 1 or 5 μM amorfrutin B for 18 h during the reoxygenation period after hypoxia did not affect LDH release. However, in response to 1 μM amorfrutin B during ischemic conditions, there was an increase in LDH to 85%, while 5 μM amorfrutin B did not affect this parameter (Fig. 9b). The LDH level in microglial cells under normoxic conditions and amorfrutin B treatment was presented as supplementary material (Table S1d).



**Fig. 7** Administration of amorfrutin B after hypoxia/ischemia decreased the gene expression (a) and protein level (b) of *BCL2*/*BCL2* in microglia. The results are presented as the fold change in the case of qPCR and as the percentage of the control or pg/mg of protein  $\pm$  SEM in the case of ELISA. There were 3 inde-

pendent experiments, consisting of 5–6 replicates per group. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to the control group; ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia; and ^ $p < 0.05$  and ^^ $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia

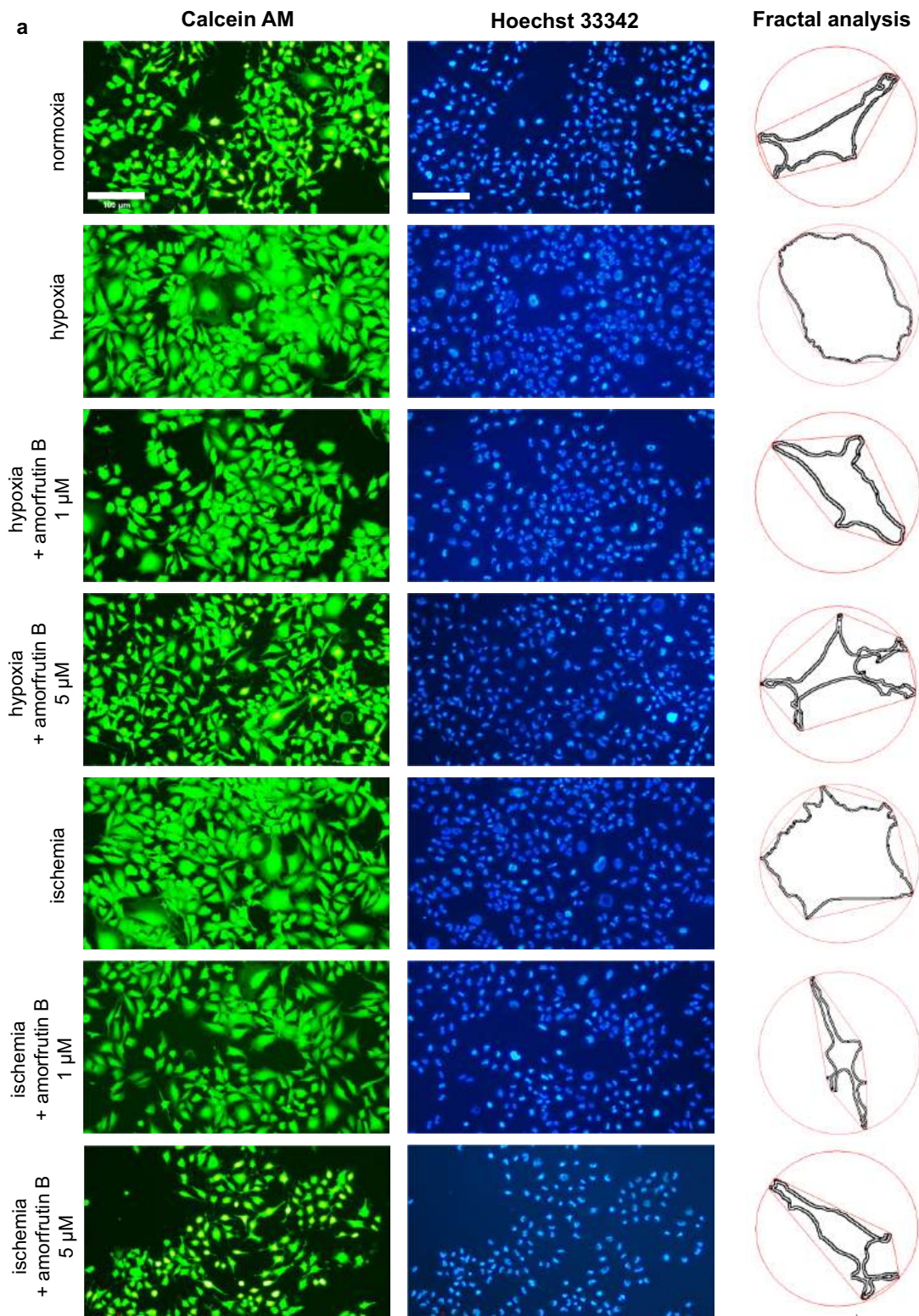
### Amorfrutin B Reduced the Proliferation Potential of Microglia that was Induced in Response to Hypoxia/Ischemia

As demonstrated by the BrdU cell proliferation assay, hypoxia and ischemia induced the proliferative action of microglia, that was manifested as increase in proliferation potential level up to 127% and 163% of the normoxic value, respectively (Fig. 9c). In the case of hypoxia, administration of 1 or 5  $\mu$ M amorfrutin B 6 h after injury resulted in a decrease in proliferation potential to 110% or 98% of the normoxic value, respectively. In the case of ischemia, only 5  $\mu$ M amorfrutin B reduced the proliferation potential of microglia to 135% of the normoxic value, while 1  $\mu$ M amorfrutin B was ineffective. The proliferation potential of microglial cells

under normoxic conditions and amorfrutin B treatment was presented as supplementary material (Table S1e).

### Post-treatment with Amorfrutin B Improved the Viability of Neocortical Cell Cultures Subjected to Hypoxia and Ischemia

An alamarBlue™ assay was applied to assess the viability of primary neurons subjected to hypoxia/ischemia or amorfrutin B post-treatment. Our study showed that 6 h of hypoxia/ischemia and 18 h of reoxygenation resulted in a reduction in viability, which was manifested by a decrease in this parameter to 52% of the control and 22% of the control, respectively. The concentration-dependent responses to amorfrutin B post-treatment during hypoxia were as follows: 86% (1  $\mu$ M amorfrutin



**Fig. 8** Fluorescence staining was used to visualize viable microglia using calcein AM (green labeling), and cell nuclei were visualized using Hoechst 33342 (blue labeling). Particle and fractal analysis enabled the morphometric analysis (**a**). Amorfrutin B post-treatment induced a shift in microglial morphology during hypoxia/ischemia from amoeboid-like to ramified cells (**b**) with smaller cell bodies (**c**

and **d**). The number of microglial cell nuclei remained unchanged regardless of the conditions (**e**). \*\*\* $p < 0.001$  compared to the control group; ### $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia; ^^ $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia. There were 10 replicates in each group

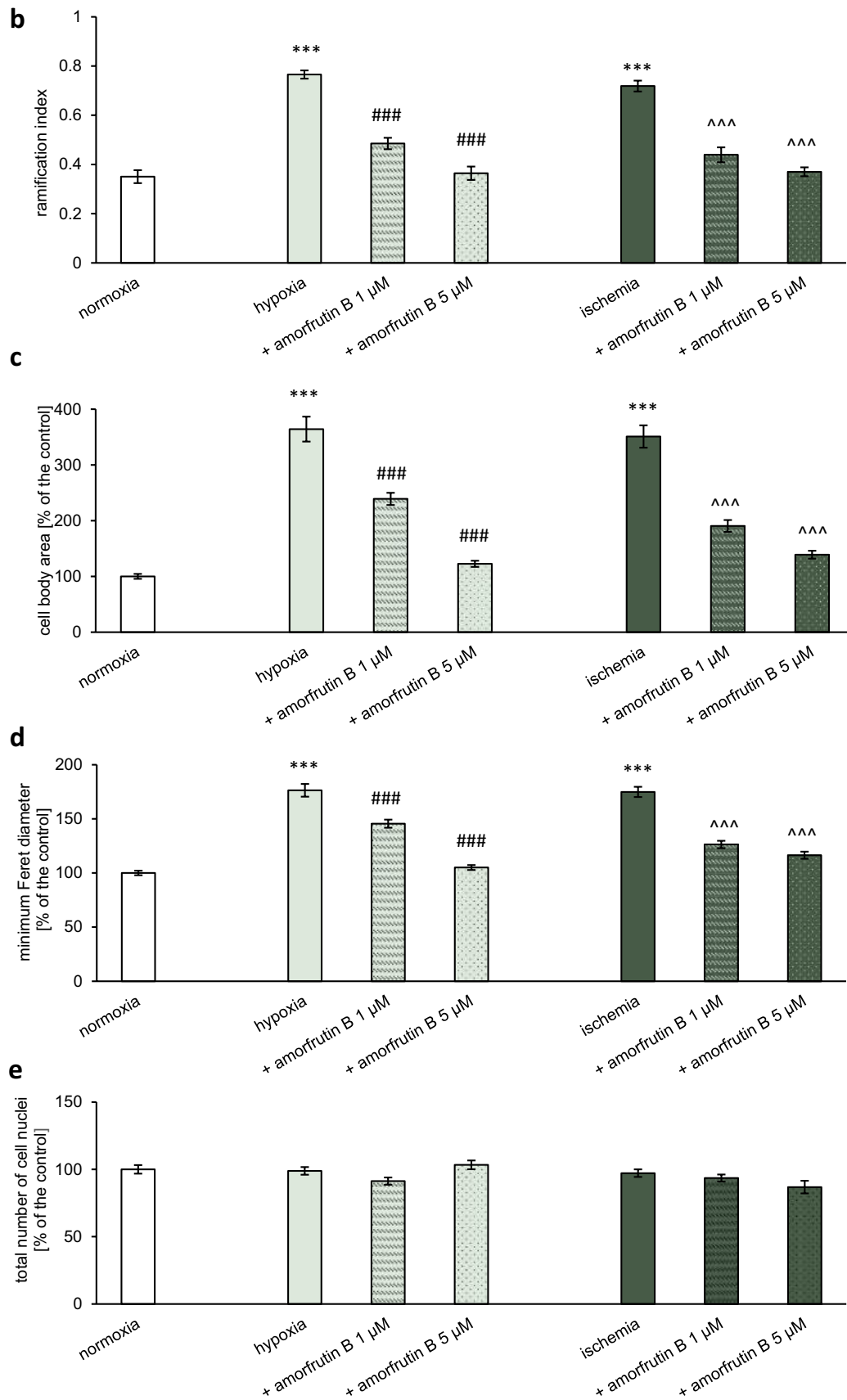
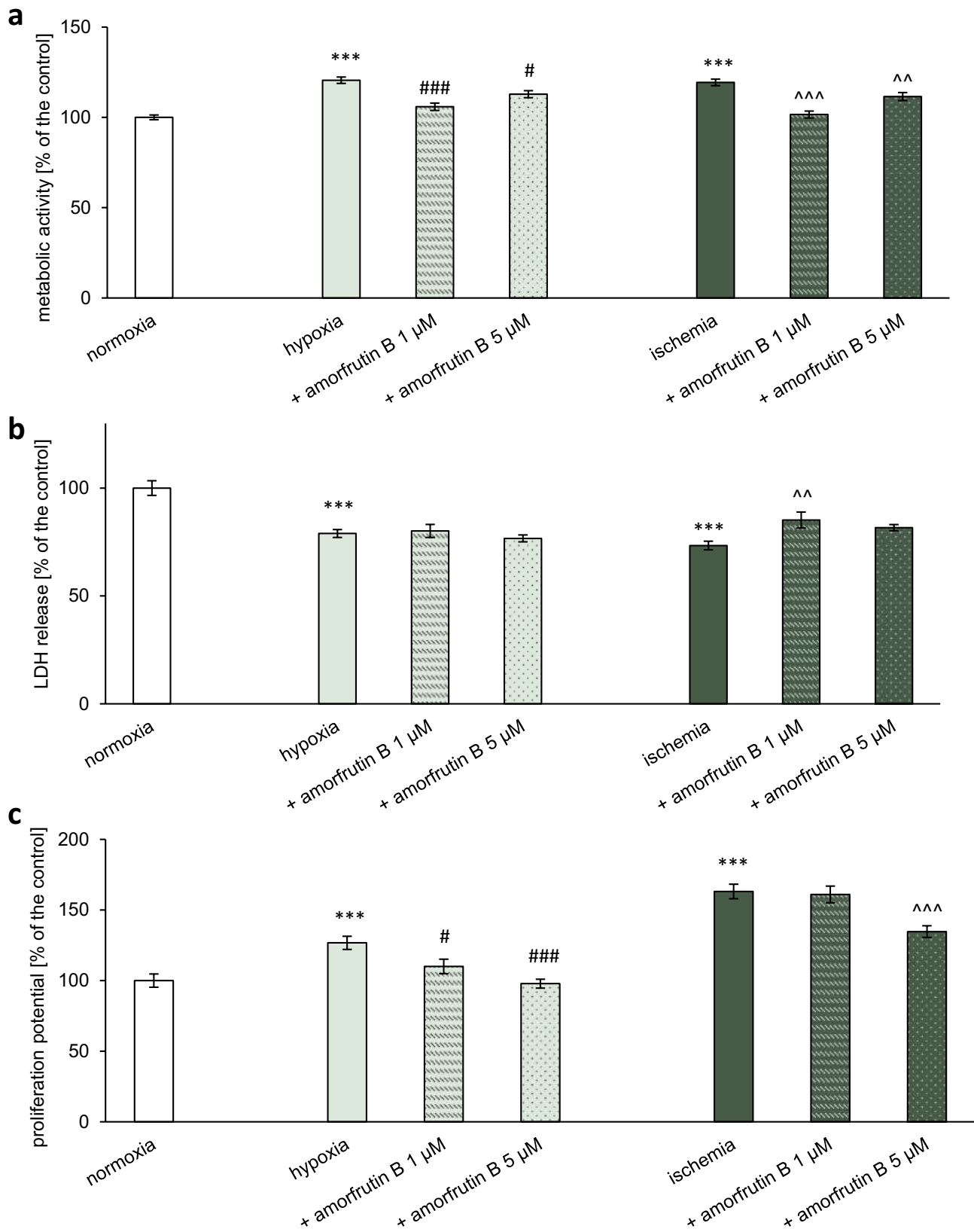


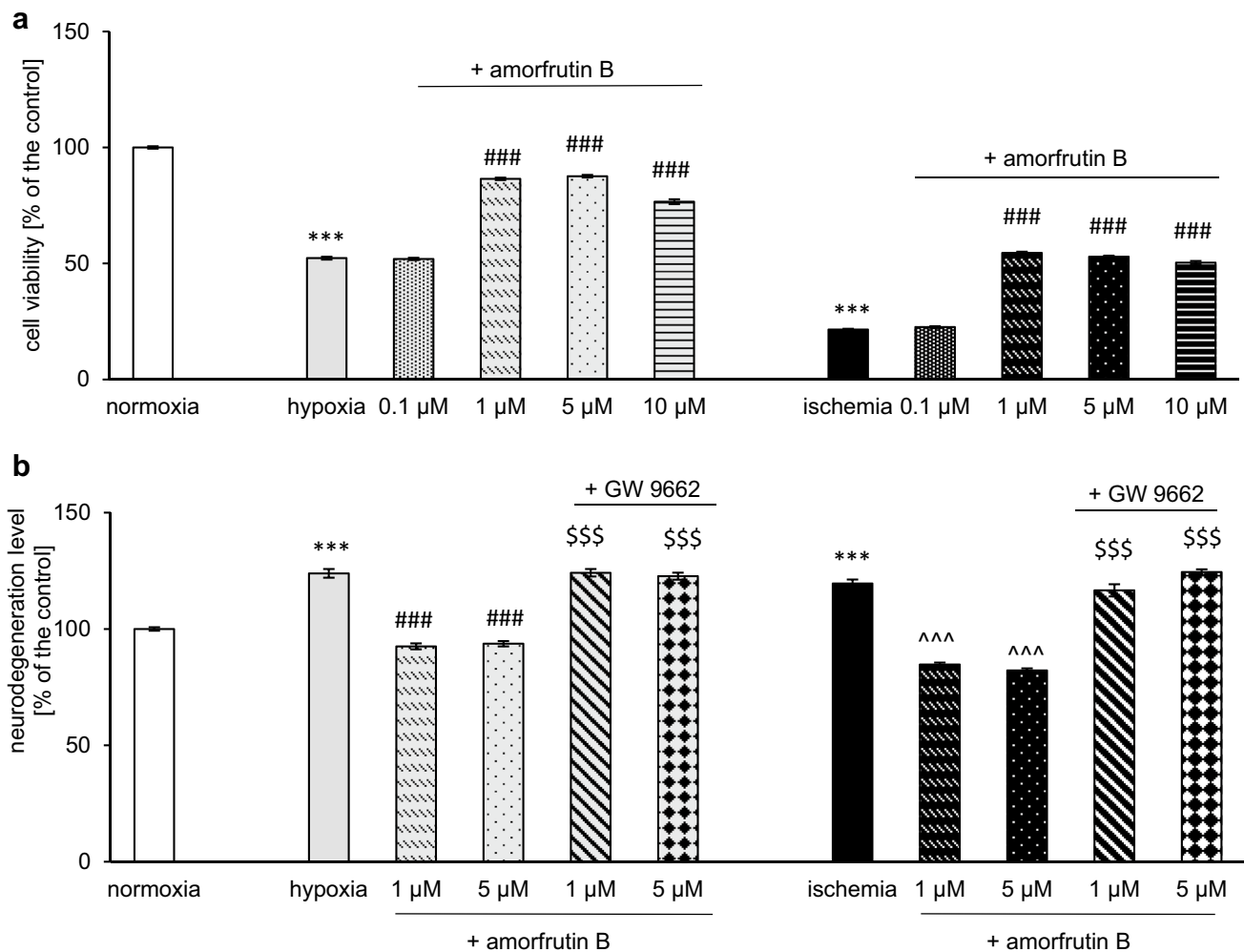
Fig. 8 (continued)





**Fig. 9** Post-treatment with amorfrutin B reversed the increase in metabolic activity (a) or decrease in LDH (b) and reduced the proliferation potential (c) of microglia exposed to hypoxia/ischemia. The results are presented as a percentage of the control  $\pm$  SEM of 3

independent experiments, consisting of 8–12 replicates per group. \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the control group; #  $p < 0.05$  and ###  $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to hypoxia; and ^^  $p < 0.01$  and ^^ $p < 0.001$  compared to the cultures exposed to ischemia



**Fig. 10** Amorfrutin B (1, 5 and 10 μM) post-treatment inhibited the hypoxia- and ischemia-dependent reductions in viability of neuronal cells, as indicated by alamarBlue™ (a). Administration of amorfrutin B (1 and 5 μM) reduced neurodegeneration, and the PPAR $\gamma$  antagonist (GW9662; 1 μM) reversed these effects, as indicated by Fluoro-Jade C (b). The results are presented as a percentage of the

control  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, consisting of 8–12 replicates per group. \*\*\* $p$  < 0.001 compared to the control group; ### $p$  < 0.001 compared to the cultures exposed to hypoxia, ^^ $p$  < 0.001 compared to the cultures exposed to ischemia; \$\$\$ $p$  < 0.001 compared to the cells subjected to both hypoxia/ischemia and amorfrutin B post-treatment

B), 88% (5 μM amorfrutin B), and 77% (10 μM amorfrutin B) of the control value. In the case of ischemia, the concentration-dependent responses to amorfrutin B post-treatment were as follows: 55% (1 μM amorfrutin B), 53% (5 μM amorfrutin B), and 50% (10 μM amorfrutin B) of the control value. Administration of amorfrutin B at a concentration of 0.1 μM did not change the viability of neurons subjected to hypoxia or ischemia. In control cells (normoxic conditions), amorfrutin B treatment at concentrations ranging from 0.1 to 10 μM for 18 h did not affect the viability (supplementary materials, Table S2a). The most profound neuroprotective effects were obtained after the use of 1 or 5 μM amorfrutin B, and for that reason, these concentrations were selected for experiments conducted on human microglia (Fig. 10a).

### Amorfrutin B Post-treatment Reduced Hypoxia/ Ischemia-induced Neurodegeneration, and the PPAR $\gamma$ Antagonist Reversed this Effect

Fluoro-Jade C labeling was used to determine the degree of degeneration of neuronal cells exposed to 6 h of hypoxia/ ischemia and 18 h of reoxygenation/amorfrutin B post-treatment. The neurodegeneration level in response to hypoxia reached 124% of the control value, while post-treatment with 1 or 5 μM amorfrutin B reduced this parameter to 93% and 94% of the control, respectively. Simultaneous administration of GW9662 (1 μM, PPAR $\gamma$  antagonist) reversed the neuroprotective effects of amorfrutin B (1 and 5 μM), manifested as an increase in neurodegeneration up to 124% and

123% of the control value, respectively. Ischemia increased neurodegeneration up to 120%, while amorfrutin B post-treatment (1 and 5  $\mu\text{M}$ ) reduced this effect to 85% and 82% of the control value, respectively. Simultaneous treatment with 1  $\mu\text{M}$  GW9662 reversed the neuroprotective effects of 1 and 5  $\mu\text{M}$  amorfrutin B, that was manifested as enhancements in neurodegeneration level up to 117% and 124% of the control value, respectively (Fig. 10b). The neurodegeneration level under normoxic conditions and amorfrutin B treatment (given separately or in combination with GW9662) was presented as supplementary material (Table S2b).

## Discussion

Here, we provide evidence for specific amorfrutin B-induced effects on human microglia subjected to hypoxia/ischemia; this compound counteracts inflammation and influences mitochondrial status, metabolic activity and proliferation potential in a PPAR $\gamma$ -dependent manner. Amorfrutin B is an SPPAR $\gamma$ M that we recently demonstrated for the first time to be a promising neuroprotective compound in cellular models of stroke and perinatal asphyxia. Indeed, we showed that post-treatment of mouse neurons with amorfrutin B caused neuroprotection that relied on its inhibitory action on hypoxia/ischemia-induced apoptosis, autophagy and oxidative stress as well as on normalization of the epigenetic status of neuronal cells (Wnuk et al. 2021a, Wnuk, Przepiórska et al. 2021; Przepiórska et al. 2023). Although neuronal mechanisms of amorfrutin B-evoked neuroprotection have been identified, none of them reflects the action of the compound on microglia known to play a pivotal role in the response of brain tissue to hypoxic and ischemic damage.

In the present study, we showed that in human microglial cell (HMC3) cultures subjected to hypoxia/ischemia, post-treatment with amorfrutin B decreased the IBA1 fluorescence intensity, which was accompanied by reduced caspase-1 activity and downregulated mRNA expression of *IL1B* and *TNFA* but not *IL10*, which was upregulated. We observed that the changes in the mRNA expression of interleukins were paralleled by changes in protein levels. IBA1 is an actin cross-linking protein that participates in the membrane ruffling of microglia. Its increased density is a measure of microglial activation, which is also manifested by overstimulated caspase-1 activity and elevated levels of interleukins in the brain during ischemic stroke (Li et al. 2019; Wittekindt et al. 2022). Importantly, post-mortem studies of human ischemic brains have shown that glial cells express higher levels of cytokines, including IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (Clausen et al. 2020). Recently, Li et al. (2019) demonstrated that the inhibition of caspase-1 and the downregulation of proinflammatory factors in activated microglia ameliorated cerebral injury and reduced infarct volume in

mice subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO). Therefore, one can assume that the ability to inhibit microglia-dependent inflammation is one of the key elements that constitute the therapeutic capacity of amorfrutin B against cerebral hypoxia/ischemia, as evidenced by our studies on human microglia.

In this study, we also demonstrated that post-treatment of human microglia subjected to hypoxia/ischemia with amorfrutin B stimulated PPAR $\gamma$  signaling, as evidenced by increased mRNA and/or protein levels of PPAR $\gamma$  and PGC1 $\alpha$ . PPAR $\gamma$  is present in microglia, and its expression is downregulated during hypoxic/ischemic episodes (Xia et al. 2015). PPAR $\gamma$  has been defined as a predominant contributor to the anti-inflammatory profile of microglia, and its activation inhibits proinflammatory cytokine production in 3-nitropropionic acid-activated microglia and shifts macrophage polarization from the M1-like phenotype to the M2-like phenotype in obesity-induced inflammation in liver and adipose tissues (Mansour et al. 2022). Moreover, PPAR $\gamma$  was shown to prime human monocytes into macrophages with anti-inflammatory properties (Bouhleb et al. 2007). As for PGC1 $\alpha$ , it has been categorized as a marker of ischemic stroke in humans, and microglia-specific overexpression of PGC1 $\alpha$  significantly reduces proinflammatory cytokine production in the mouse brain after ischemic injury (Han et al. 2021). Since amorfrutin B is a selective PPAR $\gamma$  modulator, we postulate that its anti-inflammatory properties rely on PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$  targeting and reprofiling of microglia to inhibit proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and stimulate anti-inflammatory cytokines such as IL-10, as observed in the present study. Except for studies on the anti-inflammatory action of amorfrutin B on liver cells exposed to a high-fat diet (Weidner et al. 2013), there are no other data showing the anti-inflammatory potential of amorfrutin B in human microglia subjected to hypoxia/ischemia to compare our results with.

We also showed that amorfrutin B reversed the hypoxia/ischemia-evoked effects on mitochondria-related parameters, such as the mitochondrial membrane potential, *BCL2/BCL2* expression and mitochondrial enzyme activity/metabolic activity, which were correlated with diminished proliferation potential of human microglia. In the LPS-induced inflammation model, it has been demonstrated that the mitochondrial membrane potential decreases in the initial stages but gradually returns to normal starting 3 h after LPS treatment, ultimately exceeding the baseline level by 6 h (Bauerfeld et al. 2012). The timeline of recovery and enhancement of mitochondrial potential after LPS treatment is similar to the timeline observed in our study paradigm after exposure of human microglia to hypoxia/ischemia. High mitochondrial membrane potential was also exhibited by microglia during chronic phase of experimental encephalomyelitis (C-EAE), which was associated with downregulation of mitophagy-related

genes, increased activity of mitochondrial complexes I (CI) and II (CII) and reduced ATP levels (Peruzzotti-Jametti et al. 2024). This metabolic reprogramming was interpreted as promoting increased reactive oxygen species (ROS) generation, mainly through CI and reverse electron transport. In microglia, hypoxic/ischemic episodes are known to dysregulate the mitochondrial membrane potential and, in this way, increase metabolic activity; these changes are considered as indicators of activated microglia and were also observed in our studies. Since amorfrutin B reduces the mitochondrial membrane potential and metabolic activity in hypoxia/ischemia-challenged microglia, it can be assumed that this compound has property to control the activity of the CI and CII mitochondrial complexes and in this way may inhibit ROS generation in activated microglia. However, the only relevant study to compare our results with has been performed on a mouse microglia-like BV2 cell line exposed to LPS and telmisartan, which in contrast to amorfrutin B targets not only PPAR $\gamma$ , but also PPAR $\alpha$  (Elkahloun et al. 2019). In the cited study, telmisartan was shown to normalize the expression of genes associated with mitochondrial activity (e.g., *Slc25a51*), which supports the effects of amorfrutin B observed in our study in terms of metabolic activity.

BCL2 is widely recognized as a mitochondrial protein, and its function is usually related to apoptosis and/or autophagy (Wnuk and Kajta 2017). Intriguingly, upregulation of anti-apoptotic BCL2 has been detected in Alzheimer's and Huntington's diseases patients, as well as in models of brain hypoxia and ischemia (Satou et al. 1995; Karlinski et al. 2007; Sassone et al. 2013; Wnuk et al. 2020, 2021a, Wnuk, Przepiórska et al. 2021; Przepiórska et al. 2023; Pietrzak et al. 2023). Since adult human brain express more BCL2 in microglia than in neurons (Merry et al. 1994), and hypoxia/ischemia increase BCL2 expression in brain tissue (Chen et al. 1997), one can assume that this increase is dependent mainly on microglia-localized BCL2. We have previously shown that treatment with amorfrutin B increased BCL2 protein level in mouse neuronal cells undergoing hypoxia/ischemia, suggesting an anti-apoptotic effect of the compound on brain neurons (Przepiórska et al. 2023). In the present study, treatment of human microglial cells with amorfrutin B decreased *BCL2/BCL2* mRNA and protein levels, suggesting that the compound affected BCL2-dependent processes and in this way controlled the activation of microglia. It became evident that, in addition to anti-apoptotic property, BCL2 plays a novel, noncanonical role in augmenting mitochondrial respiration and cytochrome c oxidase (COX) activity, which is closely linked to the slight pro-oxidant activity of the protein. High BCL2 expression level and increased COX activity have been reported in parallel with increased metabolic and mitochondrial activity, indicating the importance of BCL2-COX interaction and association with oxidative stress (Chen and Pervaiz 2010).

BCL2 overexpression in lymphoid and myeloid lineages appeared to significantly change expression of genes associated with metabolic activity, cell cycle, immune response and apoptosis-related genes. Knowing that amorfrutin B reduces *BCL2/BCL2* expression, accompanied by reduced metabolic activity and reduced proliferation potential of human microglia, it can be suggested that the mechanisms of action of amorfrutin B during hypoxia/ischemia include a decrease in mitochondrial respiration and microglial COX activity. Given that the microglial population is subject to continuous and rapid remodeling (Askew et al. 2017), amorfrutin B may shift the dynamic balance between microglial proliferation and microglial apoptosis.

In addition to providing evidence for the anti-inflammatory and PPAR $\gamma$ -dependent properties of amorfrutin B, as well as its ability to normalize mitochondrial status of microglial cells, we demonstrate for the first time that amorfrutin B has the ability to control the metabolic activity and proliferation potential of hypoxia/ischemia-activated microglia. Studies of Sapkota et al. (2017) characterized activated microglia as cells that exhibited increased intensity of IBA1/BrdU labeling, indicating enhanced microglial proliferation potential in the penumbra of MCAO mice. Similarly, Taylor and Sansing (2013) reported that activated microglia retract their ramifications and become amoeboid-like cells. In our study, particle and fractal analysis showed that hypoxia and ischemia increased ramification index, cell body area and minimum Feret diameter, and amorfrutin B reversed all these effects in a concentration-dependent manner. An increased ramification index indicates morphological changes and heightened reactivity of microglia subjected to hypoxia/ischemia. According to Hoechst 33342 staining, which was performed in parallel with calcein AM staining, the number of microglial cell nuclei did not change significantly in response to hypoxia/ischemia or amorfrutin B treatment. Considering the proliferation potential of microglial cells (BrdU incorporation) and metabolic activity (MTT assay), which were stimulated by hypoxia/ischemia and inhibited by amorfrutin B, it can be assumed that amorfrutin B impairs both mitochondrial function and the self-renewal potential of microglial cells. Therefore, stimulatory effect of amorfrutin B on microglia-dependent toxicity (LDH release) is the result of impaired function rather than impaired cell viability of microglia. Our data suggest that the properties of amorfrutin B to control metabolic activity and proliferation potential are restricted to hypoxia/ischemia-activated microglia, because amorfrutin B induced a shift in microglial morphology from amoeboid (M1-like) to ramified (M2-like), resembling the state of cells under normoxic conditions, i.e., cells with a branched appearance and smaller cell bodies.

To address the possible differences in the mechanisms of action of amorfrutin B between microglia and neurons subjected to hypoxia/ischemia, we performed additional



experiments on mouse primary neurons. Current study complements our previous reports on neuroprotective capacity of amorfrutin B by unraveling strong stimulatory effect on hypoxia/ischemia-impaired neuronal cell viability and identifying a PPAR $\gamma$ -mediated decrease in neuronal degeneration. AlamarBlue™ cell viability indicator allowed neuronal cells to remain fully functional, viable and healthy, which is particularly important for cells exposed to hypoxia/ischemia and significantly outperforms analyzes based on the presence of the indicator in cells and causing their death (Longhin et al. 2022). According to the results, amorfrutin B promoted neuronal cell survival, as evidenced by increased cell viability (AlamarBlue™) and reduced neurodegeneration (Fluoro-Jade C), which was achieved in a PPAR $\gamma$ -specific manner i.e., GW9662 reversed the amorfrutin B-evoked decrease in neuronal degeneration. Interestingly, the stimulatory effect of amorfrutin B on mouse neuronal survival, is opposite to the inhibitory effect of amorfrutin B on the proliferation potential and metabolic activity/mitochondrial function of human microglia. However, it should be emphasized that the compared cells differ in many features and the same analyzes may not sufficiently take into account the specificity of their response to hypoxia/ischemia.

In summary, this study showed for the first time that amorfrutin B compromises hypoxia/ischemia-induced activation of human microglia in a PPAR $\gamma$ -dependent manner, which involves inhibiting inflammation, normalizing mitochondrial status, and controlling metabolic activity and proliferation potential. These data extend the protective potential of amorfrutin B in the pharmacotherapy of hypoxic/ischemic brain injury, targeting not only neurons but also activated microglia.

**Abbreviations** *ACTB*: Actin Beta; *ATP*: Adenosine Triphosphate; *BCL2/BCL2L2*: B-cell lymphoma 2 (apoptosis regulator *BCL2*); *BrdU*: Bromodeoxyuridine; *C-EAE*: Chronic experimental autoimmune encephalomyelitis; *CI* and *CII*: Mitochondrial complexes I and II; *COX*: Cytochrome c oxidase; *Ct*: Threshold cycle; *DMEM*: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; *DMSO*: Dimethyl Sulfoxide; *DTT*: Dithiothreitol; *EDTA*: Ethylenediaminetetraacetic Acid; *ELISA*: Enzyme-linked Immunosorbent Assay; *EMEM*: Eagle's Minimum Essential Medium; *FBS*: Fetal Bovine Serum; *GFAP*: Glial Fibrillary Acidic Protein; *HMC3*: Human Microglial Clone 3 cell line; *HSP60*: Heat Shock Protein 60; *IBA1*: Ionized Calcium-binding Adaptor Molecule 1; *IL-10/IL-10*: Interleukin 10; *IL-1B/IL-1 $\beta$* : Interleukin 1 beta; *LDH*: Lactate Dehydrogenase; *LPS*: Lipopolysaccharides; *MCAO*: Middle Cerebral Artery Occlusion; *MTT*: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; *PGC1 $\alpha$* : Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator-1 alpha; *PPAR $\gamma$* : Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma; *qPCR*: Quantitative Polymerase Chain Reaction; *RIPA*: Radioimmunoprecipitation Assay; *ROS*: Reactive oxygen species; *rt-PA*: Recombinant Tissue Plasminogen Activator; *SEM*: Standard Error of the Mean; *SPPAR $\gamma$ M*: Selective PPAR $\gamma$  Modulator; *SV40*: Simian virus 40; *TNFA/TNF $\alpha$* : Tumor Necrosis Factor Alpha; *TZDs*: Thiazolidinediones

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11481-024-10135-9>.

**Acknowledgements** The manuscript was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts—F236-4B94-0C63-6A1D-2490. Graphical abstract and schemes were created with BioRender.com. The authors thank Julita Wesolowska (Environmental Laboratory of *in vivo* and *in vitro* imaging of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences) for kindly providing access to the Leica TCS SP8 WLL confocal microscope.

**Author Contributions** Przepiórska-Drońska Karolina—Data curation, Formal analysis, Investigation, Validation, Writing—original draft; Wnuk Agnieszka—Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft; Pietrzak-Wawrzyńska Bernadeta Angelika – Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft; Łach Andrzej—Data curation, Writing—original draft; Biernat Weronika – Investigation; Wójtowicz Anna Katarzyna – Validation; Kajta Małgorzata—Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Supervision, Writing—original draft. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** National Science Centre of Poland, 2018/31/B/NZ7/01815, the statutory fund of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences in Krakow, Poland. Karolina Przepiórska-Drońska is a PhD student at Krakow School of Interdisciplinary PhD Studies (KISD).

**Data Availability** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Ethics Approval** The experiments were conducted in compliance with European Union Legislation (Directive 2010/63/EU, amended by Regulation (EU) 2019/1010) and approved by the Bioethics Commission as being compliant with Polish Law (21 August 1997). The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and did not require the approval of the Ethics Committee of Maj Institute of Pharmacology PAS since the research was conducted on primary neuronal cells.

**Consent to Participate** Non-applicable.

**Consent for Publication** Non-applicable.

**Competing Interests** The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Askew K, Li K, Olmos-Alonso A et al (2017) Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep* 18(2):391–405. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041>
- Baek M, Yoo E, Choi HI et al (2021) The BET inhibitor attenuates the inflammatory response and cell migration in human microglial HMC3 cell line. *Sci Rep* 11(1):8828. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87828-1>
- Bauerfeld CP, Rastogi R, Pirockinaite G et al (2012) TLR4-mediated AKT activation is MyD88/TRIF dependent and critical for induction of oxidative phosphorylation and mitochondrial transcription factor A in murine macrophages. *J Immunol* (Baltimore, Md.: 1950) 188(6):2847–2587. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102157>
- Becker B, Demirbas M, Johann S et al (2018) Effect of Intrastriatal 6-OHDA Lesions on Extrastriatal Brain Structures in the Mouse. *Mol Neurobiol* 55(5):4240–4252. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0637-9>
- Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E et al (2007) PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6(2):137–143. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.06.010>
- Chen ZX, Pervaiz S (2010) Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death Differ* 17(3):408–420. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.132>
- Chen J, Graham SH, Nakayama M et al (1997) Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17(1):2–10. <https://doi.org/10.1097/00004647-199701000-00002>
- Clausen BH, Wirenfeldt M, Høgedal SS et al (2020) Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke. *Acta Neuropathol Commun* 8(1):81. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00957-y>
- Danladi J, Sabir H (2021) Perinatal Infection: A Major Contributor to Efficacy of Cooling in Newborns Following Birth Asphyxia. *Int J Mol Sci* 22(2):707. <https://doi.org/10.3390/ijms22020707>
- Dello Russo C, Cappoli N, Coletta I et al (2018) The human microglial HMC3 cell line: where do we stand? A systematic literature review. *J Neuroinflammation* 15(1):259. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1288-0>
- DeLong JH, Ohashi SN, O'Connor KC, Sansing LH (2022) Inflammatory responses after Ischemic Stroke. *Semin Immunopathol* 44(5):625–648. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00943-7>
- Desai SM, Rocha M, Jovin TG, Jadhav AP (2019) High Variability in Neuronal Loss. *Stroke* 50(1):34–37. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.02349>
- El-Din SS, Abd Elwahab S, Rashed L et al (2021) Possible role of rice bran extract in microglial modulation through PPAR-gamma receptors in alzheimer's disease mice model. *Metab Brain Dis* 36(7):1903–1915. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00741-4>
- Elkahloun AG, Rodriguez Y, Alaiyed S et al (2019) Telmisartan protects a microglia cell line from LPS injury beyond AT1 receptor blockade or PPARγ activation. *Mol Neurobiol* 56(5):3193–3210. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1300-9>
- Fan PL, Wang SS, Chu SF, Chen NH (2023) Time-dependent dual effect of microglia in ischemic stroke. *Neurochem Int* 169:105584. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105584>
- Geisinger R, Rios DR, McNamara PJ, Levy PT (2024) Asphyxia, therapeutic hypothermia, and pulmonary hypertension. *Clin Perinatol* 51(1):127–149. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2023.11.007>
- Grygiel-Górniak B (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications—a review. *Nutr J* 13:17. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
- Han B, Jiang W, Cui P et al (2021) Microglial PGC-1α protects against ischemic brain injury by suppressing neuroinflammation. *Genome Med* 13(1):47. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00863-5>
- Jilani TN, Siddiqui AH (2023) Tissue plasminogen activator. StatPearls Publishing
- Kajta M, Budziszewska B, Marszał M, Lasoń W (2001) Effects of 17-beta estradiol and estriol on NMDA-induced toxicity and apoptosis in primary cultures of rat cortical neurons. *J Physiol Pharmacol* 52(3):437–446
- Kajta M, Lasoń W, Kupiec T (2004) Effects of estrone on N-methyl-D-aspartic acid- and staurosporine-induced changes in caspase-3-like protease activity and lactate dehydrogenase-release: time- and tissue-dependent effects in neuronal primary cultures. *Neuroscience* 123(2):515–526. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.005>
- Kajta M, Wnuk A, Rzemieniec J et al (2017) Depressive-like effect of prenatal exposure to DDT involves global DNA hypomethylation and impairment of GPER1/ESR1 protein levels but not ESR2 and AHR/ARNT signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 171:94–109. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.001>
- Kajta M, Wnuk A, Rzemieniec J et al (2019) Triclocarban disrupts the epigenetic status of neuronal cells and induces AHR/CAR-mediated apoptosis. *Mol Neurobiol* 56(5):3113–3131. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1285-4>
- Karlnoski R, Wilcock D, Dickey C et al (2007) Up-regulation of Bcl-2 in APP transgenic mice is associated with neuroprotection. *Neurobiol Dis* 25(1):179–188. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.09.007>
- Kogel V, Trinh S, Gasterich N et al (2021) Long-Term glucose starvation induces inflammatory responses and phenotype switch in primary cortical rat astrocytes. *J Mol Neurosci* 61(11):2368–2382. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01800-2>
- Lavecchia A, Di Giovanni C (2015) Amorphins are efficient modulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) with potent antidiabetic and anticancer properties: a patent evaluation of WO2014177593 A1. *Expert Opin Ther Pat* 25(11):1341–1347. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1076393>
- Lescat M, Poirel L, Tinguely C, Nordmann P (2019) A resazurin reduction-based assay for rapid detection of polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 57(3):e01563-e1618. <https://doi.org/10.1128/JCM.01563-18>
- Li Q, Dai Z, Cao Y, Wang L (2019) Caspase-1 inhibition mediates neuroprotection in experimental stroke by polarizing M2 microglia/macrophage and suppressing NF-κB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 513(2):479–485. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.202>
- Li LZ, Huang YY, Yang ZH, Zhang SJ, Han ZP, Luo YM (2020) Potential microglia-based interventions for stroke. *CNS Neurosci Ther* 26(3):288–296. <https://doi.org/10.1111/cns.13291>
- Longhin EM, El Yamani N, Rundén-Pran E, Dusinska M (2022) The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Front Toxicol* 4:981701. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.981701>
- Machado MMF, Bassani TB, Cópola-Segovia V et al (2019) PPAR-γ agonist pioglitazone reduces microglial proliferation and NF-κB activation in the substantia nigra in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Pharmacol Rep* 71(4):556–564. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.11.005>
- Mansour RM, El Sayed NS, Ahmed MAE, El-Sahar AE (2022) Addressing peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in 3-nitropropionic acid-induced striatal neurotoxicity in rats. *Mol Neurobiol* 59(7):4368–4383. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02856-w>
- Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ (1994) bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 120(2):301–311. <https://doi.org/10.1242/dev.120.2.301>

- Mollet I, Marto JP, Mendonça M, Baptista MV, Vieira HLA (2022) Remote but not distant: a review on experimental models and clinical trials in remote ischemic conditioning as potential therapy in ischemic stroke. *Mol Neurobiol* 59(1):294–325. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02585-6>
- Muzio L, Viotti A, Martino G (2021) Microglia in neuroinflammation and neurodegeneration: from understanding to therapy. *Front Neurosci* 15:742065. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.742065>
- Ochocka N, Kaminska B (2021) Microglia diversity in healthy and diseased brain: insights from single-cell omics. *Int J Mol Sci* 22(6):3027. <https://doi.org/10.3390/ijms22063027>
- Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B et al (2022) Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 110(21):3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
- Peruzzotti-Jametti L, Willis CM, Krzak G et al (2024) Mitochondrial complex I activity in microglia sustains neuroinflammation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07167-9>. Advanceonlinepublication.10.1038/s41586-024-07167-9
- Pietrzak BA, Wnuk A, Przepiórska K et al (2023) Posttreatment with ospemifene attenuates hypoxia- and ischemia-induced apoptosis in primary neuronal cells via selective modulation of estrogen receptors. *Neurotox Res* 41(4):362–379. <https://doi.org/10.1007/s12640-023-00644-5>
- Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M (2023) Posttreatment with PaPE-1 protects from A $\beta$ -induced neurodegeneration through inhibiting the expression of Alzheimer's disease-related genes and apoptosis process that involves enhanced DNA methylation of specific genes. *Mol Neurobiol*. Published online December 8, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03819-5>
- Planas AM (2024) Role of microglia in stroke. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.24501>. Advanceonlinepublication.10.1002/glia.24501
- Popescu MR, Panaitescu AM, Pavel B, Zagrean L, Peltecu G, Zagrean AM (2020) Getting an early start in understanding perinatal asphyxia impact on the cardiovascular system. *Front Pediatr* 8:68. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00068>
- Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M (2023) Amorfrutin B protects mouse brain neurons from hypoxia/ischemia by inhibiting apoptosis and autophagy processes through gene methylation- and miRNA-dependent regulation. *Mol Neurobiol* 60(2):576–595. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03087-9>
- Rai MA, Hammonds J, Pujato M et al (2020) Comparative analysis of human microglial models for studies of HIV replication and pathogenesis. *Retrovirology* 17(1):35. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00544-y>
- Rayasam A, Fukuzaki Y, Vexler ZS (2021) Microglia-leucocyte axis in cerebral ischaemia and inflammation in the developing brain. *Acta Physiol (oxford, England)* 233(1):e13674. <https://doi.org/10.1111/apha.13674>
- Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A et al (2015) Neuroprotective action of raloxifene against hypoxia-induced damage in mouse hippocampal cells depends on ER $\alpha$  but not ER $\beta$  or GPR30 signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 146:26–37. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.005>
- Rzemieniec J, Wnuk A, Lasoń W, Bilecki W, Kajta M (2019) The neuroprotective action of 3,3'-diindolylmethane against ischemia involves an inhibition of apoptosis and autophagy that depends on HDAC and AhR/CYP1A1 but not ER $\alpha$ /CYP19A1 signaling. *Apoptosis* 24(5–6):435–452. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01522-2>
- Sapkota A, Gaire BP, Cho KS et al (2017) Eupatilin exerts neuroprotective effects in mice with transient focal cerebral ischemia by reducing microglial activation. *PLoS ONE* 12(2):e0171479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171479>
- Sassone J, Maraschi A, Sassone F, Silani V, Ciammola A (2013) Defining the role of the Bcl-2 family proteins in Huntington's disease. *Cell Death Dis* 4(8):e772. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.300>
- Satou T, Cummings BJ, Cotman CW (1995) Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity. *Brain Res* 697(1–2):35–43. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00748-f](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00748-f)
- Tang H, Shi W, Fu S et al (2018) Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med* 7(4):1070–1080. <https://doi.org/10.1002/cam4.1354>
- Taylor RA, Sansing LH (2013) Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol* 2013:746068. <https://doi.org/10.1155/2013/746068>
- Tian Z, Ji X, Liu J (2022) Neuroinflammation in vascular cognitive impairment and dementia: current evidence, advances, and prospects. *Int J Mol Sci* 23(11):6224. <https://doi.org/10.3390/ijms23116224>
- Weidner C, Wowro SJ, Freiwald A et al (2013) Amorfrutin B is an efficient natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) agonist with potent glucose-lowering properties. *Diabetologia* 56(8):1802–1812. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2920-2>
- Wittekindt M, Kaddatz H, Joost S et al (2022) Different Methods for Evaluating Microglial Activation Using Anti-Ionized Calcium-Binding Adaptor Protein-1 Immunohistochemistry in the Cuprizone Model. *Cells* 11(11):1723. <https://doi.org/10.3390/cells11111723>
- Wnuk A, Kajta M (2017) Steroid and xenobiotic receptor signalling in apoptosis and autophagy of the nervous system. *Int J Mol Sci* 18(11):2394. <https://doi.org/10.3390/ijms18112394>
- Wnuk A, Rzemieniec J, Litwa E et al (2016) The crucial involvement of retinoid X receptors in DDE neurotoxicity. *Neurotox Res* 29(1):155–172. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9572-6>
- Wnuk A, Rzemieniec J, Lasoń W, Krzeptowski W, Kajta M (2018) Apoptosis induced by the UV filter benzophenone-3 in mouse neuronal cells is mediated via attenuation of ER $\alpha$ /Ppar $\gamma$  and stimulation of Er $\beta$ /Gpr30 signaling. *Mol Neurobiol* 55(3):2362–2383. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0480-z>
- Wnuk A, Przepiórska K, Rzemieniec J, Pietrzak B, Kajta M (2020) Selective targeting of non-nuclear estrogen receptors with PaPE-1 as a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 38(4):957–966. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00289-8>
- Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M (2021a) Posttreatment strategy against hypoxia and ischemia based on selective targeting of nonnuclear estrogen receptors with PaPE-1. *Neurotox Res* 39(6):2029–2041. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00441-y>
- Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M (2021b) Post-treatment with Amorfrutin B evokes PPAR $\gamma$ -mediated neuroprotection against hypoxia and ischemia. *Biomedicines* 9(8):854. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080854>
- Xia CY, Zhang S, Gao Y, Wang ZZ, Chen NH (2015) Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *Int Immunopharmacol* 25(2):377–382. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.019>
- Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J (2020) Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke. *Front Immunol* 11:294. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00294>
- Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA (2010) Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7(4):378–391. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.005>
- Zhong W, Jin W, Xu S et al (2018) Pioglitazone induces cardiomyocyte apoptosis and inhibits cardiomyocyte hypertrophy via VEGFR-2 signaling pathway. *Arq Bras Cardiol* 111(2):162–169. <https://doi.org/10.5935/abc.20180108>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.