

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ JOANNY RZEMIENIEC

Hipoksja, czyli inaczej niedotlenienie towarzyszy takim schorzeniom jak udar mózgu asfiksja okołoporodowa, zespół bezdechu sennego, choroba wysokościowa czy przewlekła obturacyjna choroba płuc. Co roku na udar mózgu zapada aż 70 000 Polaków, natomiast asfiksję okołoporodową stwierdza się u 2-4 noworodków na 1000 urodzeń. Jediną dostępną terapią w leczeniu ostrego udaru niedokrwinnego jest dożylne podanie zrekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rt-PA). W przypadku asfiksji okołoporodowej stosuje się resuscytację czy hipotermię. W związku z tym, że wymienione terapie cechuje niska efektywność, wąskie okno terapeutyczne oraz szereg przeciwwskazań do ich stosowania istnieje pilna potrzeba znalezienia nowych leków nakierowanych na złożone procesy towarzyszące zarówno niedotlenieniu, jak i reoksygenacji.

Liczne dane eksperymentalne wskazują na ochronny potencjał estrogenów w komórkowych oraz zwierzęcych modelach udaru mózgu. Pomimo silnych właściwości neuroprotektoryjnych, zastosowanie estrogenów w leczeniu udaru mózgu jest niemożliwe. Wykazano bowiem, że długotrwałe stosowanie estrogenów wiąże się z ryzykiem zachorowania na nowotwory hormonozależne czy też z wystąpieniem powikłań zakrzepowo-zatorowych. Punktem wyjścia do podjęcia badań prezentowanych w pracy doktorskiej było założenie, że selektywne modulatory receptorów estrogenowych SERMs (ang. *Selective Estrogen Receptor Modulators*), mogą stanowić stosunkowo bezpieczną alternatywę wobec estrogenów w leczeniu czy zapobieganiu skutkom niedotlenienia mózgu. SERMs to substancje, które w zależności od tkanki działają jak agoniści lub antagoniści receptorów estrogenowych, przez co ich skutki uboczne są zminimalizowane. Jednym z przedstawicieli SERMs obecnie stosowanym w leczeniu osteoporozy jest raloksifen. Jego neuroprotektoryjne właściwości badano w różnych modelach uszkodzeń i dysfunkcji mózgu, z neurozapaleniem i neurodegeneracją włącznie. Brakuje jednak kompleksowych danych na temat neuroprotektoryjnego potencjału raloksifenu w modelach niedotleniania mózgu.

Dane kliniczne i eksperymentalne dowodzą, że receptory estrogenowe są niezbędne do prawidłowego rozwoju mózgu, a ich niedobór może być przyczyną zaburzeń obserwowanych zarówno w czasie ontogenezy, jak i w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych czy niedokrwienia. Ostatnio wykazano, że receptory estrogenowe (ang. *estrogen receptors*) wchodzą

w interakcje z receptorem aktywowanym przez proliferatory peroksysomów typu gamma PPAR- γ (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). Dość dobrze udokumentowane są także interakcje receptorów estrogenowych z receptorem węglowodorów aromatycznych AhR (ang. *aryl hydrocarbon receptor*). Co więcej, ostatnio zaobserwowano, że udarowi mózgu towarzyszy wzrost ekspresji receptora węglowodorów aromatycznych i jego translokatora jądrowego ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Ze względu na wyżej wymienione fakty postuluje się wykorzystanie selektywnych modulatorów receptorów węglowodorów aromatycznych SAhRMs (ang. *Selective Aryl Hydrocarbon Receptor Modulators*) w klinice. Jednym ze związków o właściwościach SAhRMs jest 3,3'-diindolometan (DIM). DIM jest obecnie testowany w próbach klinicznych dotyczących leczenia nowotworów prostaty, piersi, dysplazji szyjki macicy oraz brodawczaka krtani. Nieliczne dane wskazują na ochronny wpływ DIM na komórki nerwowe w modelach choroby Parkinsona i zapalenia mózgu. Brakuje jednak badań nad neuroprotektynym potencjałem DIM w niedotlenieniu mózgu. Nie istnieją również dane na temat mechanizmów działania raloksifenu oraz DIM w komórkach nerwowych poddanych hipoksji.

Celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie i charakterystyka modelu niedotlenienia mózgu *in vitro*, a następnie określenie efektów działania raloksifenu i DIM w komórkach nerwowych myszy poddanych hipoksji, ze szczególnym uwzględnieniem interakcji wybranych substancji z receptorami estrogenowymi ER α , ER β i GPR30, receptorem węglowodorów aromatycznych AhR i receptorem aktywowanym przez proliferatory peroksysomów PPAR- γ . Przeprowadzone doświadczenia dowiodły, że 18-godzinna hipoksja uszkadza komórki nerwowe będące w 2, 7 i 12 dniu *in vitro* (DIV), przy czym najsilniejsze efekty obserwowane są w 7 DIV. Na tym etapie rozwoju niedotlenienie indukuje apoptozę, której towarzyszy spadek aktywności ATPazy, wzrost uwalniania LDH i śmierć komórek nerwowych. W opracowanym modelu hipoksji *in vitro* dochodzi również do wzrostu ekspresji mRNA *Hif1a*, czemu towarzyszą zmiany w ekspresji mRNA i białka receptorów estrogenowych oraz białka ARNT.

Raloksifen i DIM w komórkach nerwowych myszy hamują efekty hipoksji tj. częściowo normalizują spadek błonowego potencjału mitochondrialnego, hamują apoptotyczną fragmentację jąder komórkowych, uwalnianie LDH i śmierć komórek. Ponadto, DIM obniża aktywność kaspazy-3. Neuroprotektynny potencjał raloksifenu ujawnia się na różnych etapach rozwoju w hodowli *in vitro*, jednak najsilniejszy efekt tej substancji obserwowany jest w 7 DIV.

W komórkach nerwowych myszy w warunkach hipoksji, raloksifen stymuluje ekspresję receptorów ER α i PPAR- γ , zaś DIM obniża ekspresję receptora AhR oraz jego jądrowego translokatora ARNT. Wyciszenie ekspresji *Esr1* z użyciem specyficznego siRNA znosi neuroprotekcyny efekt działania raloksifenu w komórkach hipokampa poddanych hipoksji. Natomiast DIM traci swój neuroprotekcyny potencjał w komórkach z wyciszoną ekspresją *Ahr* i *Arnt*. Co więcej, równoczesne wyciszenie ekspresji *Esr1* i *Pparg* osłabia neuroprotekcyny potencjał raloksifenu w komórkach kory mózgu poddanych hipoksji.

Badania wchodzące w skład pracy doktorskiej po raz pierwszy dowiodły, że raloksifen i DIM wykazują silny neuroprotekcyny potencjał wobec uszkodzeń wywołanych hipoksją. Z przeprowadzonych przez mnie badań wynika, że mechanizm ochronnego działania raloksifenu wiąże się z hamowaniem niezależnych od kaspazy-3 procesów apoptotycznych, procesów nekrotycznych, jak również aktywacją szlaków receptora estrogenowego ER α (kora mózgu, hipokamp) i receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów PPAR- γ (kora mózgu). Przełomowe było również odkrycie, że DIM chroni komórki nerwowe poddane hipoksji poprzez hamowanie zależnych od kaspazy-3 procesów apoptotycznych, procesów nekrotycznych, a także szlaku receptora węglowodorów aromatycznych AhR/ARNT/CYP1A1.

Poznanie mechanizmów neuroprotekcynnego działania raloksifenu i 3,3'-diindolometanu umożliwiło identyfikację nowych ścieżek przekazywania sygnału, które mogą w przyszłości stanowić punkt uchwytu dla nowych leków oddziałujących na receptory ER α , AhR i PPAR- γ i służyć poprawie farmakoterapii niedotlenienia mózgu.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Hypoxia occurs under different circumstances such as stroke, perinatal asphyxia, obstructive sleep apnea, acute mountain sickness or chronic obstructive pulmonary disease. Every year, as many as 70,000 Poles suffer from stroke, while perinatal asphyxia occurs in 2-4 newborns per 1000 births. The only available therapy for the treatment of acute ischemic stroke is intravenous administration of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA). For perinatal asphyxia, resuscitation and hypothermia are used. Since these therapies are characterized by low efficiency, narrow therapeutic window and a number of contraindications to their use, there is an exigence to find new drugs which could target complex processes that are associated with hypoxia and reoxygenation.

Numerous experimental data indicate the protective potential of estrogens in cellular and animal models of stroke. Despite strong neuroprotective properties, the use of estrogen in the treatment of stroke is not recommended. This is related to endocrine actions of estrogens on peripheral tissues and the increased risks of venous thrombosis and cancerogenesis. The starting point for the research presented in the dissertation was the assumption that Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) could be a relatively safe alternative to estrogen in the treatment or prevention of brain hypoxia. SERMs are substances that act as agonists or antagonists of estrogen receptors in a tissue-specific manner, therefore their side effects are minimized. The SERMs representative, which is currently used for the treatment of osteoporosis, is raloxifene. Its neuroprotective properties have been studied in various models of brain damage and dysfunction, including neuroinflammation and neurodegeneration. However, there is no comprehensive data on the neuroprotective potential of raloxifene in models of brain hypoxia.

Clinical and experimental data suggest that estrogen receptors are essential for brain development and their deficiency may be responsible for various disorders observed both during ontogenesis and in neurodegenerative diseases or ischemia. Recently, estrogen receptors (ERs) have been shown to interact with peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ). The cross-talk of estrogen receptors with aryl hydrocarbon receptor (AhR) is also well documented. Moreover, it has recently been demonstrated that stroke is accompanied by increased expression of AhR and its nuclear translocator ARNT. Due to the above mentioned

evidences, the use of Selective Aryl Hydrocarbon Receptor Modulators (SAhRMs) in the clinic has been postulated. One of the compounds with SAhRM properties is 3,3'-diindolomethane (DIM). DIM is currently tested in clinical trials for the treatment of prostate cancer, breast cancer, cervical dysplasia, and laryngeal papillomatosis. There are only few data on protective effects of DIM on neuronal cells in the models of Parkinson's disease and brain inflammation. However, there is no study on the neuroprotective potential of DIM in brain subjected to hypoxia. There are also no data on the mechanisms of action of raloxifene and DIM in neuronal cells undergoing hypoxia.

Therefore, the aim of my dissertation was to develop and characterize the *in vitro* model of cerebral hypoxia, and then to evaluate the effects of raloxifene and DIM in mouse neuronal cells subjected to hypoxia, with particular focus on the interactions with estrogen receptors ER α , ER β and GPR30, as well as the receptors AhR and PPAR- γ . This study has shown that 18-h hypoxia induced cell damages in the neuronal cultures in 2, 7 and 12 days *in vitro* (DIV), with the strongest effects observed in 7 DIV. At this 7 DIV stage of development, hypoxia induced apoptosis that was accompanied by a decrease in ATPase activity, increased LDH release, and neuronal cell death. The model of hypoxia *in vitro* that was developed in the present study was featured by an increase in the expression of *Hif1 α* mRNA, that was accompanied by changes in mRNA and protein expression levels of estrogen receptors and ARNT.

Raloxifene and DIM inhibited hypoxia-induced effects i.e., they partially normalized the decrease in mitochondrial membrane potential, inhibited apoptotic fragmentation of cell nuclei, LDH release, and cell death. In addition, DIM decreased caspase-3 activity. Neuroprotective capacity of raloxifene was revealed at various stages of neuronal development, with the most profound effect observed in 7 DIV. In mouse neuronal cells undergoing hypoxia, raloxifene stimulated the expression of ER α and PPAR- γ receptors. On the other hand, DIM decreased expression of AhR and its nuclear translocator ARNT. The silencing of *Esr1* with the use of specific siRNA abrogated the neuroprotective effect of raloxifene in hippocampal cells subjected to hypoxia. DIM lost its neuroprotective potential in neuronal cells with silenced expression of *Ahr* and *Arnt*. Furthermore, the double silencing of the *Esr1* and *Pparg* receptors attenuated the neuroprotective capacity of raloxifene in the cells undergoing hypoxia.

These studies have shown for the first time that raloxifene and DIM exhibit strong neuroprotective potential against hypoxia-induced cell damage. Moreover, they have

demonstrated that the mechanism of protective actions of raloxifene is associated with the inhibition of caspase-3-independent apoptosis, and necrosis as well as the activation of the ER α (cerebral cortex, hippocampus) and PPAR- γ (cerebral cortex) receptor pathways. The breakthrough was also the discovery that DIM protects neuronal cells undergoing hypoxia by inhibiting: caspase-3-dependent apoptosis, necrosis, and AhR / ARNT / CYP1A1 signaling.

Recognition of the mechanisms of neuroprotective actions of raloxifene and 3,3'-diindolylmethane gives prospects for the development of new therapeutic strategies that by targeting ER α , AhR and/or PPAR- γ may improve pharmacotherapy of cerebral hypoxia.