

**mgr inż. Patrycja Pańczyszyn-Trzewik**

Zakład Neurobiologii, Pracownia Neurobiologii Pierwiastków Śladowych

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: **prof. dr hab. Gabriel Nowak**

Promotor pomocniczy: **dr hab. Magdalena Sowa-Kućma**

Tytuł pracy doktorskiej:

***Znaczenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w patogenezie depresji - badanie roli nuklearnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2***

## **STRESZCZENIE:**

Depresja stanowi zespół zaburzeń psychicznych dotyczących nastroju, o skomplikowanej i wciąż słabo wyjaśnionej etiologii. Niepokojącym są również wyniki badań epidemiologiczno-klinicznych ukazujących depresję jako istotny czynnik zwiększający ryzyko wystąpienia zachowań samobójczych.

Coraz więcej badań (przedklinicznych, klinicznych oraz *post mortem*) wskazuje na znaczącą rolę współwystępowania stanu zapalnego z zaburzoną homeostazą pro- i antyoksydacyjną. Sugeruje się, że współzależność wskazanych procesów wydają się być kluczowym mechanizmem patofizjologii depresji. Za regulację procesów zapalnych oraz oksydacyjnych odpowiedzialnych jest wiele czynników transkrypcyjnych/białek. Spośród nich, coraz częściej rozpatrywanym w kontekście depresji jest czynnik transkrypcyjny Nrf2. Regulacja biologicznej aktywności Nrf2 jako mediatora procesów oksydacyjnych i zapalnych może stanowić nowy cel farmakoterapii depresji.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena znaczenia i regulacji aktywności Nrf2 (i powiązanych z nią procesów zapalnych i oksydacyjnych) w patogenezie zachowań samobójczych oraz depresji. Badania przeprowadzono na tkance ludzkiej *post mortem* ofiar samobójstw oraz z wykorzystaniem zwierzęcego modelu depresji, który stanowiła procedura obustronnego usunięcia opuszek węchowych u myszy.

Podjęte w pracy badania *post mortem* wskazały wzrost poziomu IL-1 $\alpha$  w korze czołowej i IL-1 $\beta$  w hipokampie ofiar samobójstw. Jednocześnie w tkance mózgowej ofiar samobójstw odnotowano nasilenie stresu oksydacyjnego manifestowane podwyższonym poziomem produktów peroksydacji lipidów oraz białek karbonylowanych. Wzmocnionej

aktywacji układu immunologicznego i zaburzonej homeostazie oksydacyjnej w strukturach mózgu ofiar samobójstw towarzyszyły zmiany w poziomie białka Nrf2. W korze czołowej (frakcji jądrowej) w grupie ofiar samobójstw, wykazano istotnie obniżony poziom białka Nrf2 oraz podwyższony poziom białka NFκB-p65.

W drugiej części badań podjęto próbę określenia potencjalnego efektu przeciwdepresyjnego (R,S)-Sulforafanu stanowiącego aktywator czynnika Nrf2 w modelu usunięcia opuszek węchowych. W zakresie przeprowadzonych badań behawioralnych odnotowano, że zabieg usunięcia opuszek węchowych u myszy spowodował wzrost aktywności lokomotorycznej (hiperaktywność) obserwowaną w teście wolnego pola. Co więcej, procedura usunięcia opuszek węchowych indukowała znamienne skrócenie czasu przebywania zwierząt w centrum oświetlonej planszy. Wielokrotne podania (R,S)-Sulforafanu w dawce 10 mg/kg powodowały odwrócenie tych efektów podobnie jak zastosowana kontrolnie amitryptylina (10 mg/kg). Z kolei ocena zachowań motywacyjnych („*Splash Test*”) wykazała u zwierząt poddanych procedurze usunięcia opuszek węchowych istotne wydłużenie czasu latencji, skrócenie oraz obniżenie liczby podejmowanych czynności pielęgnacyjnych. (R,S)-Sulforafan w dawce 10 mg/kg najefektywniej modulował zachowania pasywne u zwierząt bulbektomizowanych.

Końcowym etapem badań była analiza biochemiczna mająca na celu zdefiniowanie potencjalnego molekularnego mechanizmu przeciwdepresyjnego działania (R,S)-Sulforafanu. Wykazano, iż wielokrotne podania (R,S)-Sulforafanu (10 mg/kg) (podobnie jak i amitryptyliny) normalizowały wywołane zabiegiem OB wzrosty poziomu TNF-α zarówno w korze czołowej jak i hipokampie myszy. Ponadto (R,S)-Sulforafan obniżał poziom IL-10 w korze czołowej myszy grupy OB. Wykazano także potencjalny efekt antyoksydacyjny (R,S)-Sulforafanu, który związany był ze wzrostem całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (TAC) w korze czołowej i surowicy myszy poddanych zabiegowi usunięcia opuszek węchowych. W hipokampie (R,S)-Sulforafan wpływał w sposób istotny na wzrost poziomu białek Nrf2, CREB oraz p-S133-CREB, z kolei w korze czołowej odnotowano obniżenie poziomu białka i ekspresji genu dla podjednostki GluN2B receptora NMDA indukowane wielokrotnymi podaniami tego związku.

Przeprowadzone badania sugerują na potencjalne zaangażowanie wewnątrzkomórkowego szlaku sygnalizacyjnego zależnego od czynnika Nrf2 w regulacji procesów zapalnych i oksydacyjnych ważnych w neurobiologii zachowań samobójczych a także zaburzeń depresyjnych. Co więcej nasze wyniki po raz pierwszy z wykorzystaniem modelu usunięcia opuszek węchowych u myszy, umożliwiły określenie roli czynnika

transkrypcyjnego Nrf2 oraz jego aktywatora (R,S)-Sulforafanu w indukcji efektu przeciwdepresyjnego (zarówno na poziomie behawioralnym jak i molekularnym).

## **ABSTRACT:**

Depression is common mental disorder that causes people to experience low mood or persistent feeling of sadness. The etiology of these disorders is complex and still poorly understood. There is evidence for association between suicidal behavior and depression. Moreover, depression is the most notorious vulnerability factors to suicidal behavior.

Increasing number of evidence have revealed that chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of several diseases. Molecular signs of inflammation and oxidative stress linked to depression have been identified in clinical, *post mortem* and animal studies. Synergism between activated inflammatory and oxidative stress process may be significant for pathophysiology of depression. Inflammatory and oxidative stress system are regulated by different factors/proteins, in which the nuclear factor Nrf2 have important relevance to development of depression. The Nrf2 as well its activators has been proposed as a novel pharmacological target for disorders associated with oxidative stress and inflammation including depression.

The present study investigated the role of regulation the Nrf2 activity (and related inflammatory and oxidative stress processes) in the pathogenesis of suicidal behavior and depression. The research was carried out on *post mortem* human tissue of suicide victims and bilateral olfactory bulbectomy (OB), a well-validated animal model of depression.

Increased level of IL-1 $\alpha$  in frontal cortex and IL-1 $\beta$  in hippocampus was found in suicide victims. At the same time, our data indicate a significant increase TBARS concentration and carbonylated proteins level in the suicides compared to the matched controls, both in frontal cortex and hippocampus. These alterations were associated with statistically decrease in Nrf2 and increase NF $\kappa$ B-p65 protein levels in the frontal cortex (nuclear fraction) of suicide victims.

In the second part of this study, we investigated the potential antidepressant effect of (R,S)-Sulforaphane (SFN) (an activator of Nrf2) in the olfactory bulbectomy model of depression in mice. OB procedure induced the hyperactivity of mice and decrease the time spent in central zone of open field test (OFT). Chronic (R,S)-Sulforaphane (10 mg/kg) treatment significantly reduced the hyperactivity and effectively increased the time spent in the OFT central zone. Analysis of motivational behavior in splash test, showed that OB

procedure increased latency and decreased time and number of grooming (R,S)-Sulforaphane (10 mg/kg) and amitriptyline reversed these effects in OB mice.

The final stage of the research process was associated with assessment of changes in the levels of selected biochemical parameters (in frontal cortex and hippocampus of mice) after (R,S)-Sulforaphane administration. Chronic (R,S)-Sulforaphane (10 mg/kg) and amitriptyline treatment decreased level of TNF- $\alpha$  both in frontal cortex and hippocampus of mice subjected to OB procedure. (R,S)-Sulforaphane (10 mg/kg) induced decreased level of IL-10 in hippocampus and increased total antioxidant capacity in frontal cortex and serum of OB mice. Moreover this Nrf2 activator, increased Nrf2, CREB and p-S133-CREB protein levels in mice hippocampus compared to sham (control) group. In frontal cortex we noticed effects of (R,S)-Sulforaphane administration on decreased GluN2B protein level and *Grin2b* gene expression.

Our findings indicate that Nrf2 can be essential for maintaining coordinated responses to inflammatory and oxidative stress process, which role in the neurobiology of suicidal behavior and depression has been proven. Moreover, obtained results demonstrated for the first time that (R,S)-Sulforaphane at a dose of 10mg/kg has antidepressant-like effect in OB animal model of depression, which is comparable to the classic antidepressant –amitriptyline.