

О.А. Костюченко
Г.Г. Скибо
І.В. Лушнікова

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ,
Україна




Надійшла: 02.10.2022

Прийнята: 21.10.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.3.153-157>

УДК 612.822.5+576.54

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ГЛУТАМАТНОЇ ЕКСАЙТОТОКСИЧНОСТІ *IN VITRO* ТА ДІЇ α -КЕТОГЛУТАРАТУ

Kostiuchenko O.A. , Skibo G.G. , Lushnikova I.V.  Morphofunctional characteristics of hippocampal neurons in glutamate excitotoxicity *in vitro* model and after α -ketoglutarate administration. *Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine.*

ABSTRACT. Background. The study of cellular mechanisms associated with damage to brain cells as a result of glutamate excitotoxicity, as well as the identification of endogenous neuroprotective factors for the development of effective therapeutic strategies is still relevant. **Objective.** To study morphofunctional changes of neurons in the context of neuroprotection by α -ketoglutarate in glutamate excitotoxicity *in vitro* model, as well as to reveal the relationship between α -ketoglutarate/mTOR-mediated mechanisms. **Methods.** The research was conducted using hippocampal cell cultures. Cell viability and immunoreactivity of synaptogenesis and autophagy markers were evaluated. To analyze α -ketoglutarate/mTOR-mediated signaling pathways under conditions of glutamate excitotoxicity, glutamate, α -ketoglutarate and the mTOR inhibitor - rapamycin were used. **Results.** Glutamate administration had a deleterious effect on neuronal viability and synaptogenesis in culture, which was reduced by the addition of α -ketoglutarate and rapamycin. Increased LC3+ immunoreactivity induced by α -ketoglutarate and rapamycin indicates activation of autophagy, which can be attributed to the protective factors in this model. **Conclusion.** The unidirectional action of α -ketoglutarate and rapamycin implies the involvement and interaction of α -ketoglutarate- and mTOR-mediated signaling pathways in endogenous neuroprotection. Thus, the results indicate a significant potential of α -ketoglutarate in mTOR modulation for the purpose of neuroprotection in glutamate excitotoxicity conditions.


Key words: glutamate excitotoxicity, neuroprotection, α -ketoglutarate, mTOR.


Citation:

Kostiuchenko OA, Skibo GG, Lushnikova IV. [Morphofunctional characteristics of hippocampal neurons in glutamate excitotoxicity *in vitro* model and after α -ketoglutarate administration]. *Morphologia*. 2022;16(3):153-7. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.3.153-157>

 Kostiuchenko O.A. 0000-0002-5379-4233

 Skibo G.G. 0000-0003-2187-6178

 Lushnikova I.V. 0000-0001-6428-8646

✉ kostiuchenko.olha@biph.kiev.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Глутамат як головний збуджуючий нейромедіатор у мозку хребетних відіграє життєво важливу роль у фізіологічних і патологічних процесах нейронів. Вважається, що глутаматергічна передача сигналів через проникні для кальцію (Ca^{2+}) іонотропні рецептори глутамату, має вирішальне значення для процесів навчання та пам'яті [1]. Однак, надмірне вивільнення глутамату та його пролонгована дія – так звана глу-

таматна ексайтотоксичність, що часто спостерігається при ішемії та черепно-мозкових травмах, а також при різних нейродегенеративних станах, викликає порушення клітинного метаболізму, іонний дисбаланс, дисрегульований апоптоз та аутофагію, що призводить до ушкодження та загибелі клітин [2,3]. Ексайтотоксичність глутамату виникає, коли гомеостатичний баланс нейромедіатора порушується і його рівень у позаклітинному середовищі підви-

щується. Численні дослідження спрямовані на пошук засобів запобігання пошкодження нейронів, що є наслідком їх гіперактивації надміром глутамату [4,5]. Актуальним залишається вивчення внутрішньоклітинних молекулярних механізмів, пов'язаних з розвитком нейродегенерації в результаті глутаматної ексайтотоксичності, а також виявлення ендogenous факторів нейропротекції, що може бути основою для підвищення ефективності терапевтичних стратегій у протидії церебральним патологіям.

Одним із перспективних захисних агентів для протидії нейродегенерації є багатофункціональна молекула α -кетоглутарату (АКГ). Завдяки своїм плейотропним захисним функціям АКГ вже використовується в терапії, включаючи його використання для покращення функціонування мозку [6]. Було показано, що АКГ відіграє ключову роль у підтримці енергетичного балансу клітини, утилізації активних форм кисню (АФК), метаболізмі амінокислот і гомеостазі аміаку, а також у виживанні клітин під час гіпоксії [7]. Виявлено, що існують взаємозв'язки між сигнальними шляхами, опосередкованими mTOR і АКГ. У дослідженнях з нематодами *Caenorhabditis elegans* та плодовими мушками *Drosophila melanogaster* показано, що споживання АКГ сприяє подовженню тривалості життя та призводить до зниження співвідношення АТФ/АДФ, тим самим підвищуючи рівень аутофагії [8,9]. Відомо, що сигнальний шлях mTOR (mammalian target of rapamycin - мішень рапаміцину у ссавців) є ключовим регулятором багатьох аспектів клітинного метаболізму ссавців, а його дисбаланс пов'язаний з церебральними захворюваннями [10]. У контексті нейродегенеративних/нейропротективних механізмів роль mTOR-модульованої аутофагії стала предметом кількох останніх досліджень. Повідомляється, що в умовах ішемічного ушкодження мозку певна активація аутофагії має протективний ефект на виживання клітин і клітинний гомеостаз, тоді як надмірна активація викликає некроз і/або апоптоз нейронів [3,11]. З огляду на це, модуляцію mTOR-опосередкованої аутофагії варто розглядати у контексті нейропротекції. Відомо, що сигнальні шляхи mTOR і АКГ перекриваються, проте дані про їх взаємозв'язки у нервовій системі обмежені.

Метою роботи було дослідити морфологічні та функціональні зміни нейронів у контексті нейропротекції за участі АКГ при моделюванні глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*, а також виявити опосередковані mTOR нейропротекторні механізми за цих умов.

Матеріали та методи

Процедури, пов'язані з тваринами, проводилися відповідно положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших науко-

вих цілей (Страсбург, 1985), Закону України No 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» і були схвалені Комітетом з етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Дослідження були проведені з використанням культивованих клітин гіпокампа. Для отримання культур в стерильних умовах виділяли гіпокамп новонароджених щурят з подальшою трипсинізацією, механічною дисоціацією, центрифугуванням та посадкою у плашки з поживним середовищем. Культивування гіпокампальних клітин здійснювали у рідкому поживному середовищі Neurobasal A з додаванням 2 % B27-supplement, 0,3 % BSA, 20 ммоль/л Hepes та 0,5 ммоль/л Glutamax (всі складові від Invitrogen, SigmaAldrich, США) та 100 од/мл стептоміцину/пеніциліну при 37 °C в атмосфері 5% CO₂. Після 12-14 діб стан культивованих клітин гіпокампа стабілізувався і надалі вони використовувалися при проведенні експериментів.

Для моделювання глутаматної ексайтотоксичності гіпокампальні культури протягом 5 хвилин обробляли розчином глутамату (SigmaAldrich) з концентрацією 100 мкМ. Потім культуральне середовище змінювали для відновлення фізіологічних умов. Для дослідження α -кетоглутарат/mTOR-опосередкованих сигнальних шляхів у відповідні лунки з культурами додавали розчин α -кетоглутарату (SigmaAldrich, K1128) з кінцевою концентрацією 2 мМ та/або інгібітор mTOR - рапаміцин (Tocris, 53123-88-9) з кінцевою концентрацією 20 нМ та інкубували протягом 4 годин.

Життєздатність культивованих клітин оцінювали спектрофотометрично аналізуючи кількість цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі (набір G1780, Promega, Німеччина). Цитозольний фермент лактатдегідрогеназа при пошкодженні клітинної мембрани вивільняється у середовище та обернено пропорційно вказує на ступінь ушкодження клітин.

Для морфологічної оцінки культури фіксували у 4% розчині формальдегіду і проводили подальший імуногістохімічний аналіз. Після відмивання розчином PBS культури обробляли 0,3% розчином H₂O₂ протягом 30 хвилин. Далі проводили блокування з розчином 0,5% козячої сироватки та 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну в PBS протягом 1 години та наносили первинні антитіла для подальшої інкубації протягом ночі (mouse anti-LC3, 1:460, rabbit anti-PSD95, 1:200; SigmaAldrich). На наступний день наносили відповідні вторинні антитіла (SigmaAldrich) anti-mouse-HRP (1:200), anti-rabbit-HRP (1:200) на PBS. Як субстрат-хромоген використовували 3,3'-діамінобензидин тетрагідрохлорид (ДАБ). Негативний контроль проводили з інкубаціями без додавання первинних або

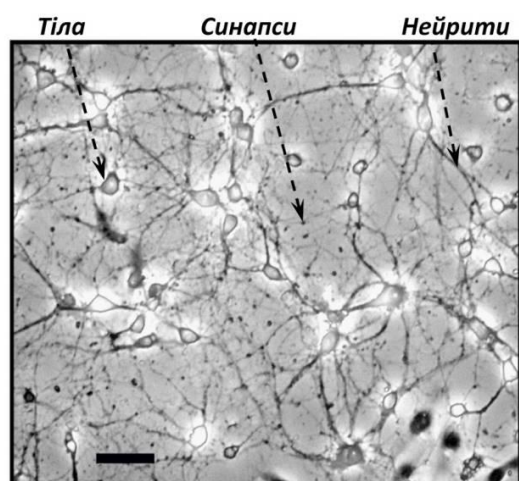
вторинних антитіл. Візуалізацію результатів імуногістохімічної реакції проводили за допомогою світлооптичного мікроскопа Zeiss Telaval 31 при збільшенні $\times 200$. Інтенсивністю імуногістохімічної реакції в тілах і відростках нейронів оцінювали за допомогою програми ImageJ (Національний інститут здоров'я, Бетесда, штат Меріленд, США).

Статистичні аналізи виконано за допомогою GraphPad Prism 8.01 (Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Дані представлені як середнє значення (M) \pm стандартні похибки середнього (m) і аналізувалися за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу, після чого виконується

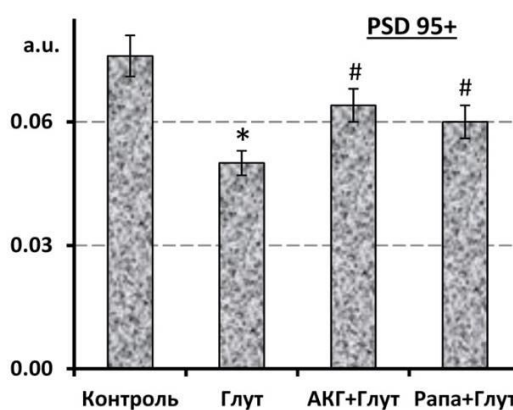
тест Тьюки для багаторазових порівнянь між групами. Гіпотезу про нормальність розподілу досліджуваних показників перевіряли з використанням критерію Шапіро-Вілка. Статистично значущими вважали відмінності між порівнюваними значеннями при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

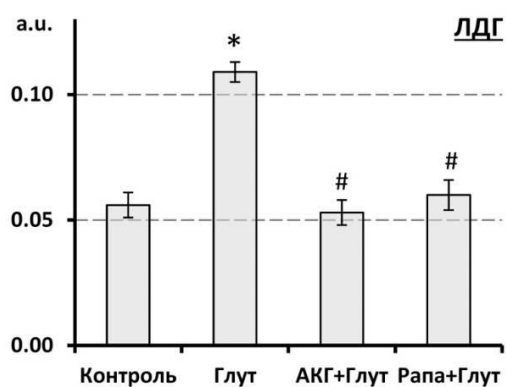
Морфологічна оцінка до експериментальних впливів засвідчила, що на 12 добу культури складалися виключно з клітин, що мали структурні ознаки, характерні для нейронів, які утворювали характерну мережу відростків та міжклітинні контакти (рис. 1А).



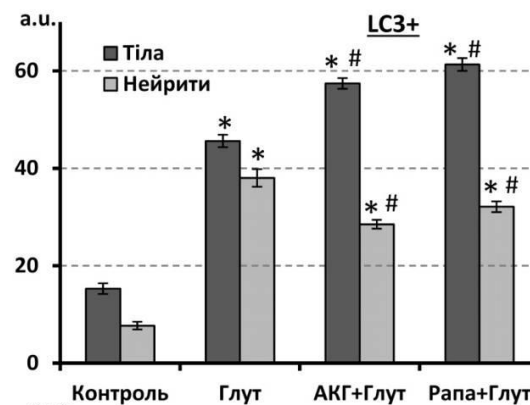
(А)



(В)



(Б)



(Г)

Рис. 1. Морфо-функціональна оцінка культивованих клітин гіпокампа.

(А) Фазово-контрастне зображення культур дисоційованих гіпокампальних клітин на 12 день культивування; масштабна лінія – 200 мкм; (Б) Рівень цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ, $n=3$) в культуральному середовищі; (В) Морфометрична оцінка імунореактивності маркера постсинаптичної щільності PSD95 та (Г) маркера аутофагії LC3. $p < 0,05$, * - відносно Контролю; # - відносно Глут; (морфометрія, $n=20$).

За експериментальних умов дія глутамату справляла ушкоджуючий ефект на життєздатність нейронів у культурі, про що свідчив підвищений рівень лактатдегідрогенази у культуральному середовищі через 4 години після дії глутамату. Додавання АКГ і інгібітора mTOR

рапаміцину, при моделюванні глутаматної ексайтотоксичності сприяло підвищенню життєздатності клітин, таким чином нівелюючи ушкоджуючий ефект глутамату. Кількість цитозольного ферменту в даних групах була значно меншою у порівнянні з групою з додаванням

глутамату. За нормальних умов після додавання АКГ та рапаміцину статистично значущих ефектів, порівняно з контролем, щодо життєздатності культивованих клітин не було виявлено (рис. 1Б). За допомогою імуногістохімічного аналізу нами показано, що після впливу глутамату зменшується рівень експресії специфічного маркера постсинаптичної щільності PSD95 у зонах перетину нейритів у гіпокампальній культурі. Це опосередковано вказує на порушення процесів синаптогенезу при дії глутамату (рис. 1В). Тоді як вплив АКГ та рапаміцину в умовах моделювання глутаматної ексайтотоксичності запобігав ушкодуючій дії глутамату.

Проведена імуногістохімічна оцінка експресії специфічного маркера аутофагії LC3, вказує на активацію аутофагії в області тіл нейронів. Після дії АКГ чи рапаміцину рівень LC3 у нейрональній сомах був вищим у порівнянні з групою глутамату, в той же час у нейритах він дещо знижувався (рис. 1Г). Одже, дія АКГ щодо активації аутофагії проявлялася на рівні нейрональної соми та була аналогічною до дії рапаміцину.

Відомо, що між активністю mTOR і процесом аутофагії існує зворотній причинно-наслідковий зв'язок [10]. Однак роль mTOR у пошкодженні та загибелі нейронів у наслідок ексайтотоксичності глутамату остаточно не визначена. За наших експериментальних умов, супресія mTOR призводила до активації LC3-опосередкованої аутофагії, що у значній мірі запобігало пошкодженню гіпокампальних нейронів після дії глутамату. Аналізуючи ре-

зультати, що представлені у літературних джерелах на теперішній час, показовою є спільність певних елементів АКГ- і mTOR-опосередкованих сигнальних шляхів, передбачаючи взаємозв'язки між ними [8,9]. Односпрямованість ефектів АКГ і інгібітора mTOR рапаміцину у проведених нами експериментах, передбачає, що АКГ залучений до модуляції функцій mTOR за умов глутаматної ексайтотоксичності.

Підсумок

Таким чином, за умов нашого експерименту через 4 год після впливу глутамату спостерігалася активація процесу mTOR-опосередкованої аутофагії. Активація аутофагії у присутності АКГ та інгібітора mTOR співвідноситься з підвищенням життєздатності культивованих клітин гіпокампа та підвищенням рівнем маркера синапсів PSD95 за умов ексайтотоксичності глутамату. Отримані дані передбачають участь та взаємозв'язок АКГ- і mTOR-обумовлених сигнальних шляхів у процесі ендогенної нейропротекції. Отримані результати вказують на значний потенціал АКГ у модуляції mTOR з метою нейропротекції.

Перспективи подальших розробок

Передбачається підготовка обґрунтування та рекомендацій щодо використання АКГ як нейропротекторного засоба при нейродегенеративних захворюваннях.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Hussan MT, Sakai A, Matsui H. Glutamate-glycine pathways in the brains of turtles: A comparative perspective among reptiles, birds, and mammals. *Front Neuroanat.* 2022;16:937504. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.937504>.
2. Polster BM, Mark KA, Arze R, Hudson D. Calpain-independent intracellular protease activity is elevated in excitotoxic cortical neurons prior to delayed calcium deregulation and mitochondrial dysfunction. *Biomolecules.* 2022;12:1004. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12071004>.
3. Hwang J-Y, Gertner M, Pontarelli F, Court-Vazquez B, Bennett MVL, Ofengeim D. Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die. *Cell Death Differ.* 2017;24:317–329. DOI: <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.140>.
4. Jia M, Njapo SAN, Rastogi V, Hedna VS. Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs.*

- 2015;29:153–162. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0225-3>.
5. Belov Kirdajova D, Kriska J, Tureckova J, Anderova M. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:51. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00051>.
6. Pierzynowski S. Compositions for improvement of brain function. U.S. Patent No: US9592211B2 2017. Available from: <https://patents.google.com/patent/US9592211B2/no>.
7. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alpha-ketoglutarate: physiological functions and applications. *Biomol Ther.* 2016;24:1–8. DOI: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.078>.
8. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature.* 2014;510:397–401. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13264>.
9. Su Y, Wang T, Wu N, Li D, Fan X, Xu Z.

Alpha-ketoglutarate extends *Drosophila* lifespan by inhibiting mTOR and activating AMPK. *Aging*. 2019;11:4183–4197. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.102045>.

10. Bockaert J, Marin P. mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiol Rev*. 2015;95:1157–1187. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00038>.

2014.

11. Zhang X, Wei M, Fan J, Yan W, Zha X, Song H. Ischemia-induced upregulation of autophagy preludes dysfunctional lysosomal storage and associated synaptic impairments in neurons. *Autophagy*. 2021;17:1519–1

Костюченко О.А., Скибо Г.Г., Лушнікова І.В. Морфофункціональна характеристика нейронів гіпокампа за умов моделювання глутаматної ексайтотоксичності *in vitro* та дії α -кетоглутарату.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Дослідження клітинних механізмів, що пов'язані з пошкодженням мозкових клітин у результаті глутаматної ексайтотоксичності, а також виявлення ендogenous факторів нейропротекції для розробки ефективних терапевтичних стратегій досі залишається актуальним. **Мета.** Дослідити морфофункціональні зміни нейронів у контексті нейропротекції за участі α -кетоглутарату при моделюванні глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*, а також виявити взаємозв'язок α -кетоглутарат/mTOR-опосередкованих механізмів. **Методи.** Дослідження проведені з використанням культивованих клітин гіпокампа. Було оцінено життєздатність клітин та імунореактивність маркерів синаптогенезу та аутофагії. Для аналізу α -кетоглутарат/mTOR-опосередкованих сигнальних шляхів за умов глутаматної ексайтотоксичності застосовано глутамат, α -кетоглутарат та інгібітор mTOR – рапаміцин. **Результати.** Дія глутамату мала ушкоджуючий вплив на життєздатність нейронів та процеси синаптогенезу у культурі, що зменшувався з додаванням α -кетоглутарату та рапаміцину. Підвищена імунореактивність LC3+, викликана дією α -кетоглутарату та рапаміцину вказує на активацію аутофагії, яку можна віднести до факторів захисту в цій моделі. **Підсумок.** Односпрямована дія α -кетоглутарату та рапаміцину передбачає участь та взаємозв'язок α -кетоглутарат- і mTOR-обумовлених сигнальних шляхів у процесі ендogenous нейропротекції. Отримані результати вказують на значний потенціал α -кетоглутарату в модуляції mTOR з метою нейропротекції при глутаматній ексайтотоксичності.

Ключові слова: глутаматна ексайтотоксичність, нейропротекція, α -кетоглутарат, mTOR.