


Miyostatinin SH-SY5Y Hücre Hattında Glutamat Eksitotoksitesisi Üzerine Etkisi

The Effect of Myostatin on Glutamate Excitotoxicity Induced in SH-SY5Y Cell Line

 Hicran FELEK¹

 Tunahan ÇATAL¹

 Fatih YULAK²

 Ahmet Kemal FİLİZ²

 Sebahattin KARABULUT³

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas, Türkiye

²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

³Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sivas, Türkiye

Corresponding author:

Sebahattin KARABULUT, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sivas, Türkiye

E-mail:

sbkarabulut@cumhuriyet.edu.tr

Received/Accepted: May 2024

Conflict of interest: There is not a conflict of interest.

How to Cite

Felek, H., Çatal T., Yulak F., Filiz A. K., Karabulut S. (2024). Miyostatinin SH-SY5Y Hücre Hattında Glutamat Eksitotoksitesisi Üzerine Etkisi. *Health Sciences Student Journal*, 4(1), 1-6.

ÖZET

Amaç: Eksitotoksitesite glutamatın aşırı konsantrasyonlarının yol açtığı patolojik bir durumdur. Miyostatin iskelet kaslarının ekspres ettiği bir miyokin olup, beyindeki etkisi hakkında bilgiler azdır. Bu çalışmada, miyostatin tedavisinin SH-SY5Y hücrelerinde glutamat eksitotoksitesisine karşı hücreyel canlılık, oksidan-antioksidan durum ve apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır.

Yöntem: SH-SY5Y hücreleri kültüre edildikten sonra; 1.Kontrol grubu, 2.Glutamat grubu, 3. Miyostatin grubu, 4. Miyostatine + Glutamat grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Belirlenen tedaviler uygulandıktan sonra XTT yöntemiyle hücreyel sağ kalım, hücreyel oksidan durum Total oksidatif stres (TOS), Total antioksidatif stres (TAS) ve kaspaz-3 düzeyleri belirlendi.

Bulgular: Glutamat hücre sağ kalımını ve TAS düzeylerini azaltırken, TOS ve kaspaz-3 seviyelerini artırdı. Miyostatin tedavisi tek başına antioksidan düzeyi kısmen artırsa da glutamatla birlikte uygulandığında anlamlı bir etkiye yol açmadı.

Sonuç: Bu sonuçlar glutamat eksitotoksitesisinin yol açtığı hücreyel hasarlara karşı miyostatinin iyileştirici etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Glutamat, Miyostatin, SH-SY5Y.

ABSTRACT

Aim: Excitotoxicity is a pathological condition caused by excessive concentrations of glutamate. Myostatin is a myokine expressed by skeletal muscles and little is known about its effects in the brain. In this study, we investigated the effect of myostatin treatment on cellular viability, oxidant-antioxidant status and apoptosis against glutamate excitotoxicity in SH-SY5Y cells.

Method: SH-SY5Y cells were cultured and divided into 4 groups as 1. control group, 2. glutamate group, 3. myostatin group, 4. myostatin + glutamate group. After the treatments were applied, cellular survival was determined by XTT method, Total oxidative stress (TOS), Total antioxidative stress (TAS) and caspase-3 levels were determined.

Results: Glutamate decreased cell survival and TAS levels, but increased TOS and caspase-3 levels. Although myostatin treatment alone partially increased antioxidant levels, it had no significant effect when co-treated with glutamate.

Conclusion: These results suggest that myostatin has no ameliorative effect against cellular damage caused by glutamate excitotoxicity.

Keywords: Glutamate, Myostatin, SH-SY5Y.

GİRİŞ

Glutamat eksitotoksitesisi, aşırı glutamatın nöronal disfonksiyona ve dejenerasyona neden olduğunu öne süren bir hipotezdir.¹ Glutamat normalde beyinin ana uyarıcı nörotransmitteri olup öğrenme, bellek, kognisyon gibi yüksek beyin fonksiyonlarına aracılık etmektedir. Glutamat nöronların hücre zarında bulunan spesifik reseptörlerine (NMDA, AMPA ve Kainat reseptörleri) bağlanarak etki gösterir. Normalde sinaptik iletim gerçekleştikten sonra ortamdaki glutamat, glutamat taşıyıcıları adı verilen geri alım sistemleri tarafından uzaklaştırılır ve böylece aşırı reseptör aktivasyonu önlenmiş olur.² Bununla birlikte, aşırı sekresyon ve/veya klirens yetersizliği gibi nedenlerle glutamatın beyinde fazla miktarda birikmesi “eksitotoksitesite” adı verilen bir patolojik olayla sonuçlanabilir. Bu durumda glutamat reseptörlerinin sürekli aktivasyonu ile aşırı kalsiyum (Ca^{2+}) yüklenmesi, oksidatif stres, mitokondriyal bozulma ve enerji metabolizmasında yetersizlikle birlikte eksitotoksik hücre hasarı oluşur.³ Eksitotoksitesitenin epilepsi, amiotrofik lateral skleroz, iskemik inme, Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi çok sayıda nörodejeneratif hastalıkta yer aldığı bilinmektedir.⁴⁻⁷ Dolayısıyla, beyinde nöronal aşırı glutamat düzeyinin kontrol edilmesinin bu tür nörolojik hastalıkların tedavisinde bir seçenek olabileceği düşünülmektedir.

Miyostatin iskelet kası kütlesini sınırlamada rol alan bir dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesinin üyesidir. Miyostatin aktif formu oluşumundan önce proteolitik işleme maruz kalacak bir öncü protein olarak sentezlenir.⁸ Embriyogenez sırasında miyotomdaki hücreler tarafından üretilen miyostatin toplam kas lifi miktarını düzenlerken, yetişkinlerde iskelet kası tarafından salgılanarak kana karışır ve kas lifi büyümesini engeller. Kas homeostazını sürdürmedeki rolüne ek olarak, miyostatinin sistemik metabolik ve glikoz homeostazının

düzenlenmesinde etkileri olduğu gösterilmiştir.⁹ Miyostatinin kardiyak büyüme, glikoz metabolizması ve adipogenezde önemli roller oynadığı bilinse de yetişkin merkezi sinir sistemindeki işlevi hakkındaki bilgiler azdır. Bununla birlikte, miyostatinin merkezi sinir sisteminde yüksek oranda eksprese edilmesi, onun beyinde de önemli roller oynadığı fikrine yol açmıştır.¹⁰ Ayrıca, Lin ve arkadaşları Alzheimer fare modelinde miyostatin tedavisinin bellek bozukluğunu azalttığını rapor etmişlerdir.¹¹ Bunun yanında başka bir çalışmada, miyostatinin içerisinde yer aldığı TGF- β protein ailesi ile ilişkili bir sinyal yolağının nöronları glutamat nörotoksitesine karşı koruduğu gösterilmiştir.¹² Ancak miyostatinin doğrudan glutamat eksitotoksitesisi üzerine etkisi ile ilgili henüz bir çalışma yapılmamıştır. Bu yüzden, bu çalışmada miyostatin tedavisinin SH-SY5Y hücre hattında glutamat nörotoksitesine karşı hücreyel sağ kalım, oksidan-antioksidan düzeyler ve apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan SH-SY5Y (CRL-2266™) hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)’den temin edilmiştir. SH-SY5Y hücreleri %10 fetal sıgır serumu (FBS) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), % 0,1 penisilin-streptomisin (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) içeren DMEM besiyeri (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) içinde 37°C’de %5 CO₂ içeren ortamda kültür edilmiştir. Hücreler %90 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmış ve 96’lı plate içerisine her kuyucukta 1x10⁴ yoğunlukta hücre olacak şekilde ekilmiştir.

Çalışma Grupları ve Deneysel Protokol

SH-SY5Y hücrelerden; Kontrol (herhangi bir tedavi almayan grup); Glutamat (10 mM Glutamat uygulanan grup); Miyostatin + Glutamat (miyostatin ön tedavisinden 24 saat sonra 10 mM glutamat uygulanan grup) ve Miyostatin (miyostatin uygulanan grup) olmak

üzere 4 grup oluşturulmuştur. Miyostatinin ön tedavi dozları 10, 25, 50, 100 ng/ml olarak belirlenmiştir. İlaç uygulamaları belirtildiği şekilde uygulandıktan ve inkübasyondan sonra hücre canlılığı XTT testi (Roche Diagnostic, MA, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunun için 96'lı plate kuyucukları PBS ile yıkandıktan sonra tüm kuyucuklara fenol kırmızısı içermeyen 100 µL DMEM ve 50 µL XTT solüsyonu ilave edilerek 4 saat 37 °C'de bekletilmiştir. Örneklere ait absorbanlar 450 nm'de bir ELISA mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) ile belirlenmiştir. Kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilerek, % Hücre canlılığı = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplanmıştır.

TAS ve TOS Düzeylerinin Ölçülmesi

Miyostatin ve glutamat tedavilerin hücrel oksidatif stres üzerine etkisinin değerlendirilmesinde total anti oksidan (TAS) ve total oksidatif stres (TOS) düzeyleri ölçülmüştür. TAS ölçümü serbest radikallerin reaksiyon hızını izlemek için Fenton reaksiyonunda hidroksil radikallerinin oluşmasıyla başlayan, serbest radikallerin reaksiyonu sırasında boyanmış dianisidiylin emilmesinin gözlenmesine dayanmaktadır.¹³ Örneklere bulunan antioksidanların seviyeleri ile orantılı olarak renklenmeyi baskılamaları beklenir. TOS analizi ise ortamda yeterli oksidan mevcut olduğunda demir iyonunun ferrik iyonla oksitlenmesine ve ksilenol oranj kullanılarak ferrik iyonların hücrel seviyelerinin ölçümüne dayanmaktadır.¹⁴ TAS ve TOS düzeylerinin belirlenmesinde izlenen protokol üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir (Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd, Gaziantep, Türkiye).

İstatiksel Analiz

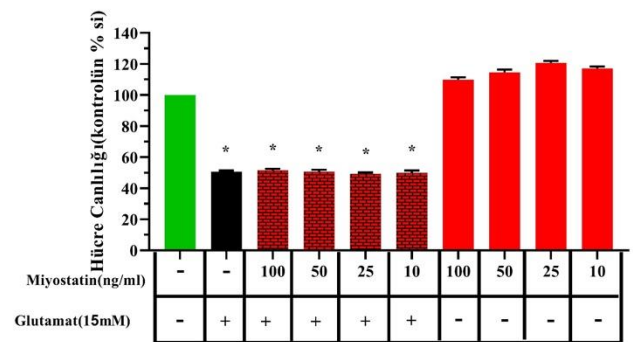
Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS 22.0 for Windows (IBM, Armonk, NY, USA) paket programı kullanılmıştır. Veriler ortalama ± SH olarak sunulmuştur. Sonuçların

değerlendirilmesi normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü ANOVA Varyans Analizi Testi ve normal dağılım göstermeyen veriler için ise non-parametrik testler olan Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlardan p<0.05 olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Aşırı glutamatın ve buna bağlı olarak membran reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun neden olduğu eksitotoksisite nöronal hasara yol açmakta ve bu durum nörolojik hastalıkların patofizyolojisinde yaygın bir durum olarak görülmektedir.

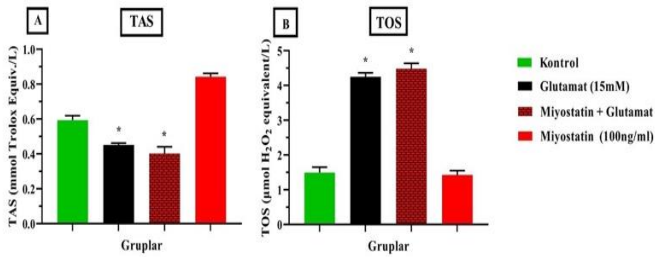
Çalışmamızda SH-SY5Y hücreleri üzerinde miyostatinin glutamatın indüklediği eksitotoksisiteye karşı koruyucu etkinliği XTT hücre canlılığı testi kullanılarak değerlendirilmiştir. XTT testi sonuçları miyostatin farklı dozlarda uygulandıktan sonra glutamat maruziyetinin hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığını göstermiştir (p<0.05) (Şekil 1). Miyostatinin tek başına uygulandığı gruplarda hücre sayılarının artması dikkat çekici bir sonuç olarak gözlenmiştir (p>0.05).



Şekil 1. Miyostatinin ön tedavisinin glutamat toksisitesi sonrası SH-SY5Y hücrelerinde sağ kalım üzerine etkisi. Veriler ortalama ± SH olarak ifade edilmiştir. *p<0.05,

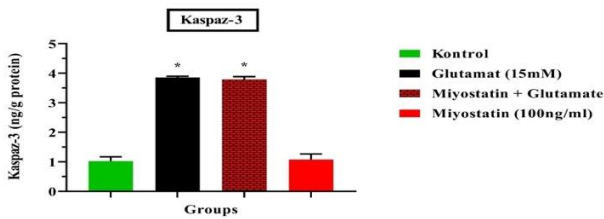
Oksidatif stres belirteçleri açısından miyostatinin glutamat toksisitesine olan olası etkisinin belirlenmesi için hücrel oksidan (TOS) ve antioksidan (TAS) seviyeleri analiz edilmiştir.

Glutamata maruziyetin yol açtığı TOS düzeyindeki artış, miyostatin uygulanan grupta da benzer düzeylerde gözlenmiştir ($p<0.05$). Glutamatin yol açtığı TAS seviyelerindeki azalma miyostatin ön tedavisi alan grupta da benzer şekildeydi ($p<0.05$). Bununla birlikte, miyostatinin tek başına uygulandığı grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da TAS düzeylerinde bir artış gözlenmiştir ($p>0.05$). (Şekil 2).



Şekil 2. Miyostatinin ön tedavisinin glutamat toksisitesi sonrası SH-SY5Y hücrelerinde TAS ve TOS düzeylerine etkisi. Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edilmiştir * $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Miyostatinin glutamat eksitotoksitesine maruz kalmış hücrelerde apoptoz sürecine etkisi olan kaspaz-3 ekspresyonu üzerinden değerlendirilmiştir. Hem glutamata maruz kalmış hücrelerde hem de glutamatla birlikte miyostatin tedavisi alan hücrelerde kaspaz-3 düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Miyostatinin ön tedavisinin glutamat toksisitesi sonrası SH-SY5Y hücrelerinde kaspaz-3 düzeylerine etkisi. Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edilmiştir. * $p<0.05$,

TARTIŞMA

Bu çalışmada miyostatin ön tedavisinin SH-SY5Y hücrelerinde glutamat toksisitesine karşı olası nöroprotektif etkisi bazı oksidatif stres ve apoptoz belirteçlerine olan etkisi üzerinden değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız miyostatinin

tek başına uygulandığında sağ kalımı teşvik ederken, aşırı glutamata maruz kalan hücrelerde sağ kalım üzerine etkisi olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde miyostatin tek başına uygulandığında antioksidan düzeyini artırırken, glutamat toksisitesinin olduğu hücrelerde bu etki görülmemiştir. Yine, glutamatin yol açtığı apoptoz üzerine miyostatin tedavisinin anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.

Eksitotoksiste, aşırı glutamat salınımının ve ardından NMDA gibi ilgili plazma zarı reseptörlerinin aktivasyonunun neden olduğu nöronal hasar olarak tanımlanmaktadır.¹ Eksitotoksiste, birçok nörodejeneratif hastalıklarda yaygın olarak yer almakta olup, iskemik inme gibi akut nöropatolojik koşullarda hücre ölümünün birincil nedeni olarak kabul edilmektedir.¹⁵ Aşırı glutamat nöronlarda oksidatif streste artışla birlikte apoptotik olayları başlatabilir. Çalışmamızda da glutamat uygulanan hücrelerde sağ kalımın azaldığı görülmüştür. Miyostatin tek başına hücrelerde çoğalmayı uyarsa da glutamata maruziyetin neden olduğu nöronal hücre ölümünü tersine çevirememiştir.

Eksitotoksiste serbest radikallerin aşırı üretimine ve oksidatif streste artışa yol açar.¹⁶ Bu serbest radikaller proteinler, lipitler ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek ve mitokondriyal solunum zinciri enzimlerini inhibe ederek nöronal ölüme yol açar.¹⁷ Ayrıca glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu sonucu kalsiyum birikimi mitokondride reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve hücre ölümüne yol açabilir.¹⁸ Bununla paralel olarak, çalışmamızda glutamat uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stresi artırdığı gözlemlendi. Miyostatin ön tedavisi tek başına antioksidan düzeyi artırsa da glutamatin indüklediği oksidatif stres üzerinde bir etki gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, glutamat eksitotoksitesinin başlamış olduğu hücrelerde yıkım sürecinin irreversible hale geldiği, en azından miyostatin tedavisinin bu süreci tersine

çevirmede yetersiz kaldığı şeklinde yorumlanmıştır.

Eksitotoksisite sırasında hücrelerdeki aşırı Ca^{2+} akışı en sonunda nöronlarda apoptozla sonuçlanan programlanmış hücre ölümü yollarını aktive etmektedir.¹⁹ Kaspaz-3 hücre ölümü belirteci olarak yaygın olarak çalışılan pro-apoptotik bir proteindir. Glutamat eksitotoksisitesinin nöronlarda apoptozla yol açtığı iyi bilinmektedir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da glutamat uygulamasının hücre sayısını azalttığı, aynı zamanda apoptoz belirteci olan kaspaz-3 miktarını arttığı gözlenmiştir. Miyostatin uygulaması hücresel büyümeyi teşvik etse de glutamatın yol açtığı apoptozla bir etkisi olmamıştır.

SONUÇ

Miyostatin tek başına hücre büyümesini ve antioksidan düzeyini artırsa da glutamatın yol açtığı hücresel yıkımın önlenmesinde etkisiz kalmıştır. Bununla birlikte miyostatinin olası nöroprotektif etkisi için farklı in-vitro hücresel hasar ve ölüm modelleri üzerinde araştırma yapılması gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 2020 yılı 2. dönem kapsamında 1919B012003793 numaralı başvurusuyla destek almaya hak kazanmıştır.

KAYNAKÇA

1. Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., & Brown, G. C. (2018). Neuronal Cell Death. *Physiological reviews*, 98(2), 813–880.
2. Lehre, K. P., & Danbolt, N. C. (1998). The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(21), 8751–8757.
3. Lau, A., & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 460(2), 525–542.

4. Behrens, P. F., Franz, P., Woodman, B., Lindenberg, K. S., & Landwehrmeyer, G. B. (2002). Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain : a journal of neurology*, 125(Pt 8), 1908–1922. <https://doi.org/10.1093/brain/awf180>
5. Cho C. H. (2013). New mechanism for glutamate hypothesis in epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 127. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00127>
6. Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P. F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., & Meininger, V. (2002). Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *Journal of the neurological sciences*, 193(2), 73–78. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(01\)00661-x](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(01)00661-x)
7. Zhang, Z., Zhang, S., Fu, P., Zhang, Z., Lin, K., Ko, J. K., & Yung, K. K. (2019). Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4391. <https://doi.org/10.3390/ijms20184391>
8. McPherron, A. C., Lawler, A. M., Lee, S. J. 1997. "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member". *Nature* 1997 387:6628, 387(6628), 83–90.
9. Guo, T., Jou, W., Chanturiya, T., Portas, J., Gavrilo, O., McPherron, A. C. 2009. "Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity". *PLoS one*, 4(3).
10. Hayashi, Y., Mikawa, S., Ogawa, C., Masumoto, K., Katou, F., Sato, K. 2018. "Myostatin expression in the adult rat central nervous system". *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 94, 125–138.
11. Lin, Y. S., Lin, F. Y., Hsiao, Y. H. 2019. "Myostatin Is Associated With Cognitive Decline in an Animal Model of Alzheimer's Disease". *Molecular neurobiology*, 56(3), 1984–1991.
12. Katsuno, M., Adachi, H., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F., Sobue, G. 2011. "Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases". *Current molecular medicine*, 11(1), 48–56.
13. Erel O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37(2), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014>
14. Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
15. Tehse, J., & Taghibiglou, C. (2019). The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries. *The European journal of neuroscience*, 49(9), 1157–1170.
16. Rueda, C. B., Llorente-Folch, I., Traba, J., Amigo, I., Gonzalez-Sanchez, P., Contreras, L., Juaristi, I., Martinez-Valero, P., Pardo, B., Del Arco, A., & Satrustegui, J. (2016). Glutamate excitotoxicity and Ca^{2+} -regulation of respiration: Role of the Ca^{2+} activated mitochondrial

transporters (CaMCs). *Biochimica et biophysica acta*, 1857(8), 1158–1166.

17. Parfenova, H., Basuroy, S., Bhattacharya, S., Tcheranova, D., Qu, Y., Regan, R. F., & Leffler, C. W. (2006). Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *American journal of*

physiology. Cell physiology, 290(5), C1399–C1410. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2005>

18. Duchen M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology*, 529 Pt 1(Pt 1), 57–68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x>

19. Hengartner M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770–776.