



The Protective Effect of FGF-18 on Glutamate Excitotoxicity in SH-SY5Y Cell Line

Talha YILDIZ^{1,a}, Melike BOLAT¹, Melike YALÇINKAYA¹, Sebahattin KARABULUT^{2,b,*}

¹ Faculty of Medicine, Grade 3, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, Turkey

² Department of Medical Services and Techniques, Vocational School of Health Services, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, Turkey

*Corresponding author

Research Article

History

Received: 14.04.2023

Accepted: 26.04.2023

ABSTRACT

In this study, we investigated the possible neuroprotective effect of FGF-18 against cellular damage caused by excessive glutamate and whether the improvement in oxidant-antioxidant balance plays a role in this effect. Glutamate, the main excitatory neurotransmitter utilized by approximately 90% of neurons in the brain, is critical for the normal functioning of numerous neuronal processes such as learning, memory, and cognition. In the human brain, 6-7 $\mu\text{mol/g}$ glutamate is, along with glutamine, the most abundant free amino acid in the central nervous system. Glutamate excitotoxicity is defined as damage to nerve cells by excess glutamate and is caused by abnormal activation of ionotropic glutamate receptors (iGluR). Excitotoxicity can lead to neuronal cell death. Fibroblast growth factors (FGFs) are signaling molecules responsible for many cellular functions including cell proliferation, survival, and migration. FGF-18 is a growth factor encoded by the FGF-18 gene in humans. In this study, we investigated the possible neuroprotective effect of FGF-18 and the role of oxidative stress in this effect, considering that glutamate excitotoxicity is involved in the physiopathology of many neurodegenerative diseases. In the experiment, the effect of FGF-18 treatment on cell survival in the SH-SY5Y cell line exposed to glutamate excitotoxicity was evaluated by the XTT method. In addition, total antioxidant (TAS) and total oxidant (TOS) levels were measured by the ELISA method to evaluate the effect of FGF-18 on oxidative stress. The results showed that although FGF-18 had no direct effect on glutamate excitotoxicity, it increased survival and had a positive effect on oxidative stress.

Keywords: FGF-18, Glutamate, Excitotoxicity, SH-SY5Y cell line

FGF-18'in SH-SY5Y Hücre Hattında Glutamat Eksitotoksitesisi Üzerine Koruyucu Etkisi

Süreç

Geliş: 14.04.2023

Kabul: 26.04.2023

Öz

Bu çalışmada, aşırı glutamatın neden olduğu hücre hasara karşı FGF-18'in olası nöroprotektif etkisi ve oksidan-antioksidan dengesindeki iyileşmenin bu etkide rol oynayıp oynamadığı araştırıldı. Beyindeki nöronların yaklaşık %90'ı tarafından kullanılan ana uyarıcı nörotransmitter olan glutamat, öğrenme, hafıza ve biliş gibi çok sayıda nöronal sürecin normal işleyişi için kritik öneme sahiptir. İnsan beyinde 6-7 $\mu\text{mol/g}$ glutamat, glutamin ile birlikte merkezi sinir sisteminde en bol bulunan serbest amino asittir. Glutamat eksitotoksitesisi, aşırı glutamatın sinir hücrelerine verdiği zarar olarak tanımlanır ve iyonotropik glutamat reseptörlerinin (iGluR) anormal aktivasyonundan kaynaklanır. Eksitotoksitesite nöronal hücre ölümüne yol açabilir. Fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler) hücre çoğalması, hayatta kalma ve göç dahil olmak üzere birçok hücre işlevden sorumlu sinyal molekülleridir. FGF-18, insanlarda FGF-18 geni tarafından kodlanan bir büyüme faktörüdür. Bu çalışmada, glutamat eksitotoksitesisinin birçok nörodejeneratif hastalığın fizyopatolojisinde yer aldığını göz önünde bulundurarak, FGF-18'in olası nöroprotektif etkisini ve bu etkide oksidatif stresin rolünü araştırdık. Deneyle, glutamat eksitotoksitesisine maruz bırakılan SH-SY5Y hücre hattında FGF-18 tedavisinin hücre sağ kalımı üzerindeki etkisi XTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, FGF-18'in oksidatif stres üzerindeki etkisini değerlendirmek için ELISA yöntemi ile total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlar, FGF-18'in glutamat eksitotoksitesisi üzerinde doğrudan bir etkisi olmamasına rağmen, sağ kalımı artırdığını ve oksidatif stres üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: FGF-18, Glutamat, Eksitotoksitesite, SH-SY5Y hücre hattı

Copyright



This work is licensed under
Creative Commons Attribution 4.0
International License

^a talhayildiz.med3866@gmail.com @gmail.com ORCID: 0009-0009-4876-7538

^b sbkarabulut@cumhuriyet.edu.tr ORCID: 0000-0002-3261-4125

How to Cite: Yıldız T et al. (2023) The Protective Effect of FGF-18 on Glutamate Excitotoxicity in SH-SY5Y Cell Line. Health Services Research Journal, 1(1): 31-34

Giriş

Beyinde nöronların yaklaşık olarak % 90'ı tarafından kullanılan ana uyarıcı nörotansmitter glutamat öğrenme, bellek ve kognisyon gibi çok sayıda nöronal sürecin normal şekilde yürütülmesinde kritik öneme sahiptir. İnsan beynindeki 6-7 µmol/g glutamat, glutaminle birlikte merkezi sinir sisteminde en çok bulunan serbest amino asittir (Lewerenz ve Maher, 2015). Presinaptik zarın depolarize olmasıyla glutamat sinaptik aralığa salınır ve postsinaptik zardaki iyonotropik glutamat reseptörlerine (iGluR) bağlanır. iGluR'lere ek olarak, G-protein-bağlı reseptörler ailesine ait glutamat reseptörleri genelde ikinci haberci sistemler aracılığıyla fonksiyon gören sekiz metabotropik glutamat reseptörü izoformundan (mGluR) oluşur (Spooren vd., 2010). Sinaptik aktivite, sinaptik aralıkta glutamat konsantrasyonunda artışa yol açsa da, glutamat taşıyıcıları tarafından glutamatın geri alınımı ile ekstraselüler glutamat konsantrasyonu korunmaktadır (Maragakis ve Rothstein, 2001).

Eksitotoksikite terimi ilk olarak Olney tarafından glutamatın sinir hücrelerini öldürme yeteneğini tanımlamak için kullanılmıştır. Eksitotoksikite iGluR'lerin aşırı aktivasyonundan kaynaklanır ve böylece dendritler ve hücre gövdeleri dahil olmak üzere postsinaptik yapıların kaybıyla sonuçlanır. Akut eksitotoksik sinir hücresi ölümünün serebral iskemide, travmatik beyin hasarı, hipoglisemi ve status epileptikus gibi olaylara yanıt olarak meydana geldiği düşünülmektedir (Meldrum ve Garthwaite, 1990). Bunun yanında, kronik glutamat eksitotoksitesinin Alzheimer, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Huntington hastalığı gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde yer aldığı bilinmektedir (Lewerenz ve Maher, 2015).

SH-SY5Y, SK-N-SH adı verilen orijinal nöroblastom hücre hattından türetilmiştir. Nöroblastomlu dört yaşında bir kadından alınan bir kemik iliği biyopsisinden izole edilen bu hat, nörodejeneratif bozukluklar için bir model görevi görmektedir.

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) hücre proliferasyonu, sağ kalım ve migrasyon dâhil olmak üzere birçok hücre fonksiyonundan sorumlu olan sinyal molekülleridir. FGF reseptörleri (FGFR) yoluyla işlev gören FGF'ler erken embriyonik dönemde mezoderm patening gibi olayları çoklu organ sistemlerinin geliştirilmesine yönlendirerek temel gelişim yollarını düzenler. FGF sinyalizasyonu anjiyogenez ve yara onarımının düzenlenmesi de dahil olmak üzere yetişkin organizmadaki birçok fizyolojik olayda görev alır (Turner ve Grose, 2010). FGF-18, insanlarda FGF-18 geni tarafından kodlanan bir büyüme faktörüdür. FGF-18 mitojenik, kemotaktik, anjiyojenik özellikleriyle embriyonik gelişim sırasında rol alan temel moleküllerden birisidir. Aynı zamanda FGF-18 akciğer, böbrek, kalp, testis, dalak, iskelet kası ve beyin dâhil olmak üzere epitel hücrelerinin çoğalmasında uyarıcı pleiotropik bir büyüme faktörüdür. Ayrıca, Parkinson hastalığının in-vitro bir modelinde FGF-18, 6-OHDA'nın indüklediği

nörotoksititeye karşı nöronlarda koruyucu etki göstermiştir (Guo vd., 2017). Literatür araştırması sonucunda FGF-18'in glutamat eksitotoksitesini üzerine etkisi hakkında herhangi bir çalışma yapılmadığı görülmüştür. Glutamat eksitotoksitesinin birçok nörodejeneratif hastalığın fizyopatolojisinde yer aldığını göz önünde bulundurarak FGF-18'in bu sürece etkisini görmeyi amaçladık. Bu çalışmamızda, FGF-18 tedavisinin olası nöroprotektif etkisi, oksidan-antioksidan dengeyi değiştirebilmesi açısından araştırıldı.

Materyal ve Yöntem

Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

SH-SY5Y (CRL-2266™) (American Type Culture Collection (ATCC)) hücre hattı, penisilin/streptomisin (10,000U/mL), DMEM/Besleyici Karışımı F-12 Ham (1:1 karışım), Fetal Sığır Serum (FBS), Tripsin-EDTA çözeltisi, FGF-18 (Genscript, New Jersey, USA) ve hücre kültürü için gerekli diğer sarf malzemeleri kullanılmıştır.

Hücre Kültürü

ATCC' den temin edilmiş olan SH SY5Y hücreleri steril koşullar altında 37°C ve %5 CO₂'li ortamda, 25 cm²'lik flasklarda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sığır serumu içeren DMEM: F12 (1:1) hücre kültür besisi yerinde çoğaltılmıştır. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasaj yapılmış ve üçüncü pasajın ardından çalışmalara başlanmıştır. SH-SY5Y hücre hattı nöron ölümü ile ilişkili oksidatif stres ve anti-oksidan kapasitesinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir modeldir.

XTT Hücre Canlılık Testi

FGF-18'in glutamat toksitesini sonrası hücre canlılığı üzerine etkisi XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) testi ile araştırılmıştır. Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır.

TAS ve TOS düzeylerinin Ölçümü

FGF-18 tedavisinin sağ kalımı en çok artırdığı doz (200 ng/ml) seçilerek hücre oksidatif stres üzerine etkisinin değerlendirilmesinde total anti oksidan (TAS) ve total oksidatif stres (TOS) ölçümleri gerçekleştirildi. TAS ölçümü serbest radikallerin reaksiyon hızını izlemek için Fenton reaksiyonunda hidroksil radikallerinin oluşmasıyla başlayan, serbest radikallerin reaksiyonu sırasında boyanmış dianisidiylin emilmesinin gözlenmesine dayanmaktadır (Erel, 2004). Örneklerde bulunan antioksidanların seviyeleri ile orantılı olarak renklenmeyi baskılamaları beklenir. TOS analizi ise ortamda yeterli oksidan mevcut olduğunda demir iyonunun ferrik iyon oksitlenmesine ve ksilenol oran kullanılarak ferrik iyonların hücresel seviyelerinin ölçümüne dayanmaktadır (Erel 2005). Ölçüm sırasında izlenen protokol üretici

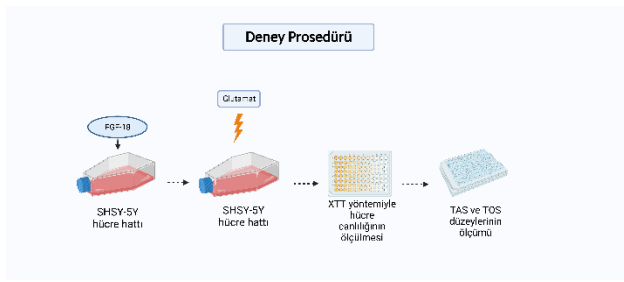
firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. Yapılan çalışmanın deneysel protokolü Şekil 1’de gösterilmiştir.

Verilerin Analizi

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS 22.0 for Windows (IBM, Armonk, NY, USA) paket programı kullanıldı. Veriler ortalama \pm SEM olarak sunuldu ve tek yönlü bir varyans analizi (tek yönlü ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Anlamlı farklılıklar elde edildiğinde post-hoc Tukey testi kullanılarak karşılaştırmalar yapıldı. Sonuçlardan $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Şekil 1. Deneysel Protokol

Figure 1. Experimental Protocol

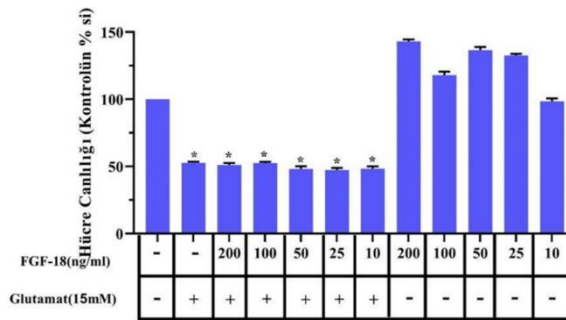


Bulgular ve Tartışma

XTT hücre canlılık testi ile elde edilen sonuçlarımız mevcut dozlarda FGF-18’in glutamat eksitotoksitesine karşı nöronlar üzerinde koruyucu etkisi olmadığına işaret etse de, tek başına uygulandığı gruplarda sağ kalımı desteklediğini göstermektedir (Şekil 2).

Şekil 2. XTT hücre sağ kalım sonuçları

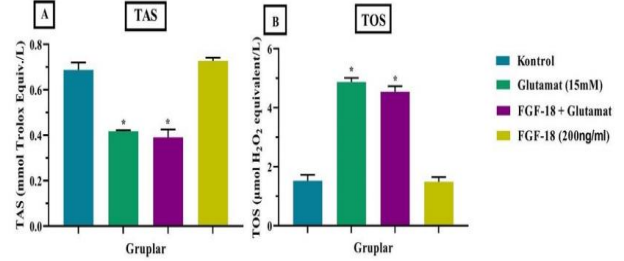
Figure 2. XTT cell viability results



FGF-18’in glutamat eksitotoksitesine maruz kalmış hücrelerde antioksidan düzeyine katkı sağlamadığı, ancak tek başına uygulandığında antioksidan seviyede anlamlı bir artışa yol açtığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, FGF-18’in tek başına uygulandığı hücrelerde oksidatif stres düzeylerinde anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Glutamat eksitotoksitesine maruz kalmış hücrelerde FGF-18 oksidatif stresi azaltsa da, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3).

Şekil 3. TAS ve TOS sonuçları

Figure 3. TAS and TOS results



Merkezi sinir sisteminin ana uyarıcı nörotransmitteri olan glutamat, beyinde öğrenme ve bellek gibi önemli bilişsel fonksiyonlara aracılık ederken, suprafizyolojik konsantrasyonlarda “glutamat eksitotoksitesi” olarak adlandırılan ve hücre ölümüyle sonuçlanan patolojik olaylarla ilişkilidir (Zhou ve Danbolt, 2014). Glutamat eksitotoksitesinin epilepsi, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde yer aldığı bilinmektedir (Lewerenz ve Maher, 2015). Aşırı glutamat nöronlarda sitozolik kalsiyum artışı, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif hasarla birlikte geri dönüşü olmayan apoptotik süreçleri başlatabilir. Bununla uyumlu olarak çalışmamızda glutamat tedavisi alan hücrelerde sağ kalımın kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığını bulduk. Bu sonuç glutamat toksitesinin SH-SY5Y hücrelerinde apoptoza yol açtığına işaret etmektedir.

Oksidatif stres çok sayıda nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisinde yer alan bir süreç olup, glutamat nörotoksitesinde de önde gelen patofizyolojik mekanizmalardan birisidir (Kim ve ark., 2014). Nöronlarda iyonotropik glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu sonucu yoğun kalsiyum girişi mitokondride ROS oluşumuna ve hücre ölümüne yol açar (Duchen, 2000). Benzer şekilde, çalışmamızda glutamat uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stresi artırdığı gözlemlendi. Diğer taraftan tek başına FGF-18 ön tedavisinin glutamatın indüklediği oksidatif stresi azalttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, FGF-18’in tek başına uygulandığı hücrelerde oksidatif stres düzeylerinde anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Glutamat eksitotoksitesine maruz kalmış hücrelerde FGF-18 oksidatif stresi azaltsa da, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

FGF-18 ile ilgili daha önceki in vitro çalışmalar, FGF18’in nörit büyümesini uyardığını ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) kaynaklı nörotoksitesiteye karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Ohbayashi ve ark, 1998; Guo ve ark., 2017). Ayrıca, hayvan modelleri FGF18’in iskemik hasara ve parkinson nörodejenerasyonuna karşı nöroprotektif bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Ellsworth ve ark., 2003; Guo ve

ark., 2007). Dikkat çekici bir şekilde, Cavallaro ve ark. eksojen FGF18 tedavisinin sıçanların uzamsal öğrenme yeteneklerini geliştirdiğini bildirmiştir (Cavallaro ve ark., 2002). Tüm bu çalışmalar FGF-18'in nörodejeneratif süreçlerde olumlu etkilere sahip olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, FGF-18 ön tedavisinin SH-SY5Y hücrelerinde glutamat nörotoksitesine karşı sağ kalıma bir etki olmadığı gözlemlense de, tek başına uygulanması antioksidan düzeyi artırdığı bulunmuştur. Bununla birlikte, FGF-18'in olası oksidatif stress üzerine olumlu etkisini destekleyen daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Kaynaklar

- Cavallaro S, D'Agata V, Manickam P, et al (2002) Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16279–16284.
- Duchen M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology*, 529 Pt 1(Pt 1), 57–68.
- Ellsworth JL, Garcia R, Yu J, Kindy MS (2003) Fibroblast growth factor-18 reduced infarct volumes and behavioral deficits after transient occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke* 34:1507–1512.
- Erel O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37(2), 112–119.
- Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103–1111.
- Guo, X., Liu, T., Zhao, D., Wang, X., Liu, D., He, Y., ... Liu, J. 2017. "FGF18 protects against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal damage in a rat model of Parkinson's disease". *Neuroscience*, 356, 229–241.
- Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* 2012;45:439-48.
- Lewerenz, J., Maher, P. 2015. "Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence?". *Frontiers in Neuroscience*, 9(DEC), 469.
- Maragakis, N. J., Rothstein, J. D. 2001. "Glutamate transporters in neurologic disease". *Archives of Neurology*.
- Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., Kimura, S., Yamasaki, M., Fukui, S., Itoh, N. 1998. "Structure and Expression of the mRNA Encoding a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-18". *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18161–18164.
- Spooren, W., Lesage, A., Lavreysen, H., Gasparini, F., Steckler, T. 2010. "Metabotropic Glutamate Receptors: Their Therapeutic Potential in Anxiety". *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 2, 391–413.
- Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 2008;53:9-13.
- Turner, N., Grose, R. 2010. "Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer". *Nature Reviews Cancer* 2010 10:2, 10(2), 116–129.
- Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 121(8), 799–817.