КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доц. Нипорко О. Ю.
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____20__ р.

РОЛЬ СИГНАЛЬНИХ МЕХАНІЗМІВ, ОПОСЕРЕДКОВАНИХ МОЛЕКУЛАМИ mTOR ТА АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТ, У НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ НА МОДЕЛІ ГЛУТАМАТНОЇ ЕКСАЙТОТОКСИЧНОСТІ *IN VITRO*

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки спеціальності 091 Біологія
ОП “Біологія (високі технології)”
Заболотньої Марини Василівни

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к.б.н. **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана у відділі цитології
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України
під керівництвом д.б.н. **Лушнікової Ірини Василівни**

Оцінка захисту роботи

_____

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Заболотня М. В. Роль сигнальних механізмів, опосередкованих молекулами mTOR та альфа-кетоглутарат, у нейропротекції на моделі глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП “Біологія (високі технології)”.

У даній роботі було узагальнено основні механізми регуляції, функції та взаємозв’язки сигнальних шляхів, опосередкованих молекулами mTOR та альфа-кетоглутарат (AKG), а також зроблено оцінку нейропротекторних ефектів AKG на довгострокову культуру гіпокампальних клітин у моделі глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*. Встановлено, що життєздатність культивованих клітин гіпокампа підвищується під впливом AKG у порівнянні з ушкоджуючою дією глутамату. Це супроводжується посиленням mTOR-опосередкованої аутофагії, зростанням синаптогенезу та мітохондріальної активності гіпокампальних клітин у культурі. Наведені результати можуть свідчити про нейропротекторний потенціал AKG, який реалізується в тому числі через модуляцію активності сигнального шляху mTOR.

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

ABSTRACT

This study summarized the main mechanisms of regulation, functions and interrelationships of signaling pathways mediated by mTOR and alpha-ketoglutarate (AKG) molecules, and evaluated the neuroprotective effects of AKG on long-term culture of hippocampal cells in an *in vitro* model of glutamate excitotoxicity. It was found that the viability of cultured hippocampal cells is increased under the influence of AKG compared to the damaging effect of glutamate. This is accompanied by an increase in mTOR-mediated autophagy, synaptogenesis and mitochondrial activity of hippocampal cells in culture. These results may indicate the neuroprotective potential of AKG, which is realized, among other things, through the modulation of the mTOR signaling pathway.

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....5

ВСТУП.....6

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....8

1.1. Сигнальний шлях mTOR у мозку.....8

1.1.1. Структура та особливості функціонування mTOR у мозку.....8

1.1.2. Регуляція сигнального шляху mTOR.....9

1.1.3. Функції mTOR у мозку.....11

1.1.4. Нейропатології, що пов’язані з mTOR.....12

1.1.5. mTOR-опосередкована аутофагія.....12

1.2. Роль AKG у клітинному метаболізмі та нейропротекції.....14

1.2.1. Біохімічні та фізіологічні особливості AKG.....14

1.2.2. AKG та нейропротекція.....15

1.3. Взаємозв’язки сигнальних шляхів, що опосередковані AKG та mTOR.....17

РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....19

2.1. Виділення тканин та отримання культур.....19

2.2. Оцінка життєздатності культур.....20

2.3. Оцінка мітохондріальної активності культур.....21

2.4. Імуногістохімічний аналіз культур.....21

2.5. Статистичний аналіз.....22

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень.....23

РОЗДІЛ 4. Обговорення результатів.....28

ВИСНОВКИ.....31

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....32

ДОДАТКИ. Додаток А.....37

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AKG – (*англ*. α-ketoglutarate) альфа-кетоглутарат

Akt – PI3K-протеїнкіназа B

AMPK – (*англ.* AMP-activated protein kinase) 5'-АМФ-активована протеїнкіназа

GTP – (*англ.* guanosine-5'-triphosphate) гуанозинтрифосфат

HIF-1 – (*англ.* hypoxia-inducible factor 1) гіпоксія-індукований фактор 1

LDH – (*англ.* lactate dehydrogenase) лактатдегідрогеназа

mTOR – (*англ.* mechanistic target of rapamycin) механістична мішень рапаміцину

mTORC1 – (*англ.* mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1) комплекс mTOR 1

mTORC2 – (*англ.* mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2) комплекс mTOR 2

PI3K – (*англ.* phosphoinositide 3-kinase) фосфатидилінозитол-3-кіназа

Raptor – (*англ.* regulatory-associated protein of mTOR) регуляторно-асоційований білок з mTOR

Rheb – (*англ.* ras homolog enriched in brain) гомолог білка Ras збагачений в мозку

Rictor – (англ. rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin) нечутливий до рапаміцину компаньйон/партнер mTOR

TSC – (*англ.* tuberous sclerosis complex) туберозний склерозний комплекс

АФК – активні форми кисню

ВСТУП

Актуальність. Не дивлячись на значний науковий прогрес, нейродегенеративні розлади, які включають хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона та інші, продовжують залишатись значною проблемою, викликаючи у пацієнтів значні когнітивні порушення, що погіршують соціальні та професійні функції, і, як наслідок, якість життя [1]. Саме тому і є актуальними для досліджень потенційні шляхи нейропротекції та створення результативних стратегій у лікуванні неврологічних порушень.

Нейромедіатор глутамат (глутамінова кислота) важливий у забезпеченні нормального функціонування нейронів, але його надмірне пролонговане вивільнення, викликане травмою або як наслідок нейропатологій мозку, може спричиняти глутаматну ексайтотоксичність, що тягне за собою дисфункції в клітинному метаболізмі та аутофагії [2,3]. Ідентифікація внутрішніх нейропротекторних факторів за умов ексайтотоксичності може слугувати коренем у покращенні терапії при боротьбі з нейропатологіями.

Сигнальний шлях mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) задіяний у регуляції багатьох метаболічних функцій, а порушення в ньому відіграють вагому роль у захворюваннях мозку [4]. З цієї перспективи цікавими для досліджень є варіанти модуляції даної сигналізації з метою нейропротекції.

Альфа-кетоглутарат (AKG) може бути використаний як потенційний інструмент захисту від нейродегенеративних захворювань, адже це багатофункціональна молекула, що відіграє значну роль у клітинному метаболізмі, виживанні клітин у стані стресу, а також у подовженні тривалості життя та активації аутофагії [5-7].

З огляду на те, що сигнальні шляхи mTOR та AKG у мозку можуть взаємодіяти в контексті регуляції метаболічних функцій, а також у процесах старіння [4-7], важливо зрозуміти молекулярні механізми даної взаємодії та оцінити потенціал використання AKG як нейропротекторного засобу.

Метою дослідження було проаналізувати роль сигнальних механізмів, що опосередковані молекулами mTOR та альфа-кетоглутарат (AKG), у нейропротекції на моделі глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*.

Відповідно до встановленої мети були визначені такі **завдання**:

- виділити тканину гіпокампа та отримати культуру гіпокампальних нейронів
- змоделювати глутамат-опосередковану ексайтотоксичність культури гіпокампальних нейронів *in vitro*
- оцінити вплив AKG на життєздатність, мітохондріальну активність, синаптогенез та аутофагію нейронів у культурі в умовах глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*
- проаналізувати деякі механізми регуляції, функції, взаємозв'язки сигнальних шляхів, що опосередковані mTOR та AKG, а також їх вплив на нейропротекцію
- провести статистичний аналіз та обробку результатів експерименту.

Об'єкт дослідження – сигнальні механізми, опосередковані молекулами mTOR та AKG.

Предмет дослідження – оцінка впливу сигнальних механізмів, опосередкованих mTOR та AKG, на життєздатність, мітохондріальну активність, синаптогенез та аутофагію гіпокампальних нейронів в умовах моделювання глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*.

РОЗДІЛ 1.
Огляд літератури

1.1. Сигнальний шлях mTOR у мозку

1.1.1. Структура та особливості функціонування mTOR у мозку

mTOR – це серин-треонінова протеїнкіназа з молекулярною масою 289 кДа, яка входить до сімейства фосфатидилінозитол-3-кіназ (PI3K) та експресується в багатьох тканинах організму, у тому числі і в нервових клітинах. mTOR є мішенню для макролідної антибіотичної речовини рапаміцин, яка виробляється бактерією *Streptomyces hygroscopicus* [4]. Білок здатний збирати два різних комплекси: чутливий до рапаміцину комплекс mTOR 1 (mTORC1) і комплекс mTOR 2 (mTORC2), що, як вважалося раніше, не пригнічується даною речовиною [8], хоча зараз дослідження вказують на те, що довготривалий вплив рапаміцину на mTORC2 все таки пригнічує функціональність комплексу [9].

Молекула mTOR у мозку відповідає за основні функції клітин, що включають синтез білка, енергетичний обмін, проліферацію, міграцію, ліпідний обмін, аутофагію, біогенез мітохондрій і лізосом. Він також контролює низку більш специфічних процесів: ріст дендритів, проростання аксонів, регенерацію аксонів і мієлінізацію, експресію іонних та рецепторних каналів. Як ключовий елемент сигнальних шляхів у нейронах і гліальних клітинах, mTOR відіграє важливу роль у вищих функціях нервової системи, таких як збудливість, синаптична пластичність, пам’ять, пізнання, харчування та контроль циркадного ритму. Тому порушення в регуляції mTOR та mTOR-опосередкованих сигнальних шляхах можуть потенційно спричиняти захворювання мозку [10].

До складу білка mTOR входить N-кінцевий домен HEAT з багатьма повторами (Huntingtin, elongation factor 3, A subunit of PP2A, TOR1);

FAT-домен (FKBP12-рапаміцин зв’язуючий домен); FKBP12 рапаміцин-зв'язуючий домен (FRB); С-кінцевий кіназний домен; С-карбокситермінальний FAT-домен (FATC). Проте важливою є саме асоціація білкового комплексу з Raptor (регуляторно асоційований партнер mTOR) або Rictor (нечутливий до рапаміцину партнер mTOR [11]), що визначає компонентом mTORC1 чи mTORC2 є mTOR відповідно. Обидва комплекси містять деякі ідентичні компоненти: власне білок mTOR, mLST8 (летальний для ссавців білок SEC13 8) та Deptor (DEP домен, що містить mTOR-взаємодіючий білок) [12]. Унікальними складовими для mTORC1 є білок Raptor та PRAS40 (багатий на пролін субстрат Akt 40 кДа), а для mTORC2 – регуляторна субодиниця Protor 1/2, білки Rictor та mSIN1 [13].

Активність mTORC1 модулюється шляхами, що пов’язані з поживними речовинами (особливо з амінокислотами та глюкозою), факторами росту, киснем, рівнем енергії, гормонами та стресом; тоді як для mTORC2 ключову роль в цьому відіграють фактори росту [8,12].

Активний mTORC1 регулює клітинний ріст, активуючи синтез білків, ліпідів та нуклеотидів, рибосомальний біогенезис, а також інгібуючи аутофагію, він має особливе значення у контролі вищих функцій мозку, що включають пам’ять, синаптичну пластичність, навчання та соціалізацію. Знань про регуляцію mTORC2 бракує, проте в кількох дослідженнях було показано, що він відіграє ключову роль у полімеризації актину та поляризації клітин, тобто бере участь у підтриманні цитоскелету клітин, а також регулює метаболізм клітин, їх проліферацію та виживання шляхом фосфорилювання PI3K-протеїнкінази B (Akt) [10-12,14,15].

1.1.2. Регуляція сигнального шляху mTOR

Комплекси mTOR є залученими в низку сигнальних шляхів, серед яких PI3K/Akt і TSC1/TSC2/Rheb (туберозний склерозний комплекс 1/туберозний склерозний комплекс 2/гомолог білка Ras збагачений в мозку) тощо.

Зв’язування факторів росту з відповідними рецепторами на мембрані клітини призводить до активації PI3K, що також запускає процес фосфорилювання субстрату кінази PIP2 з утворенням PIP3, та подальшої активації Akt, що в свою чергу інгібує активність TSC. TSC-гетеродимер є одним з найважливіших модуляторів активності mTOR, слугуючи гуанозинтрифосфат (GTP) активуючим білком (GAP) для Rheb. Активна GTP-форма Rheb безпосередньо взаємодіє з mTORC1, підвищуючи активність комплексу. Таким чином, TSC слугує негативним регулятором mTORC1, переводячи Rheb в неактивний GDP-стан [16].

Щодо mTORC2, то достеменно відомо, що фактори росту збільшують фосфорилювання Akt та активність комплексу. Деякі дослідження також вказують, що mTORC2, у свою чергу, здатен фосфорилювати Akt [16-18].

За відсутності дефіциту енергії, коли співвідношення АТФ/АДФ високе, відбувається інгібування 5'-АМФ-активованої протеїнкінази (AMPK), яка в свою чергу здатна інгібувати активність mTORC1 через фосфорилювання TSC2 або Raptor [16,19].

У стані гіпоксії та стресу інгібування mTORC1 може відбуватися шляхом зниження співвідношення АТФ/АДФ та активації AMPK або активацією гетеродимеру TSC1/TSC2. Більше того, при гіпоксії активується гіпоксія-індукований фактор 1 (HIF-1), який збільшує експресію білка, що регулює розвиток та відповідь на пошкодження ДНК 1 (REDD1), і який, у свою чергу, може активувати комплекс TSC1/TSC2 [20].

Амінокислоти слугують позитивними регуляторами mTORC1, які здійснюють свій вплив на комплекс через Ras-пов’язані GTP-зв’язуючі (Rag) GTP-ази, які у ссавців існують в чотирьох формах: Rag A, Rag B, Rag C, Rag D. За наявності доступних амінокислот Rag GTP-ази приймають активну конформацію – це GTP-зв’язана форма для Rag A/B та GDP-зв’язана форма для Rag C/D (Рисунок 1.1. [Додаток А]) [21].

1.1.3. Функції mTOR у мозку

Основними функціями, що виконують комплекси mTOR в клітинах, є метаболізм глюкози, ліпідів та мітохондрій, синтез протеїнів та нуклеотидів, а також аутофагія та регуляція цитоскелету [8].

Активний mTORC1 фосфорилює дві важливі ефекторні молекули: інгібуючи 4E (eIF4E)-зв'язуючий білок 1 (4E-BP1) та активуючи p70 рибосомальну S6-кіназу 1 і 2 (p70 S6K1/2), які безпосередньо пов’язані з біосинтезом протеїнів. S6K1 фосфорилює декілька субстратів, серед яких eIF4B, PDCD4, eIF3, тим самим запускаючи біогенез мРНК та процеси ініціації та елонгації. Фосфорильований 4E-BP1 не здатний зв’язатися з білком eIF4E, який формує eIF4F комплекс, що необхідний для cap-залежної трансляції [4,8].

Для клітин в процесі проліферації важливим є наявність ліпідів, що беруть участь в утворенні біомембран, та нуклеотидів, які є основою для нуклеїнових кислот. Обмін ліпідів може регулюватись mTORC1 через білки, що зв’язують регуляторні елементи стеролу 1 і 2 (SREBP1/2), які відіграють роль у синтезі холестеролу та жирних кислот. Стимуляція адипогенезу може також відбуватись шляхом активації проліфератер-активованого рецептора γ (PPAR-γ) [4,22]. Основний субстрат для синтезу нуклеотидів – рибозо-5-фосфат, утворюється в процесі пентозофосфатного шляху (PPP), який модулюється mTORC1 та mTORC2 через регуляцію активності ферментів, що беруть в ньому участь [8].

Аутофагія виступає однією з найважливіших клітинних функцій, адже внаслідок цього процесу клітина позбувається старих чи пошкоджених органел, а також має здатність пристосуватися в умовах голоду. mTORC1 слугує негативним регулятором аутофагії в клітинах, інгібуючи шляхом фосфорилювання комплекс ULK1/Atg13/FIP200 (unc-51-подібна кіназа 1/пов'язаний з аутофагією ссавців ген 13/білок, що взаємодіє з сімейством

кіназ фокальної адгезії 200 кДа), який є необхідним для запуску аутофагії [4,23].

Відома роль mTORC2 у ремоделюванні цитоскелету через контроль активності різних протеїнкіназ, включаючи Akt, серин/треонін-протеїнкінази 1 (SGK1) та протеїнкінази Cα (PKCα) (Рисунок 1.2. [Додаток А]) [15].

1.1.4. Нейропатології, що пов’язані з mTOR

Оскільки сигналізація mTOR пов’язана з багатьма клітинними функціями, включаючи гомеостаз та клітинний метаболізм, то її дисрегуляція може призводити до ряду неврологічних та психічних порушень у роботі нервової системи, серед яких хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Хантінгтона, епілепсія, інсульт, пухлини, депресія, когнітивні розлади, шизофренія та інші [10,24].

Загалом, більшість нейропатологій пов’язані саме з підвищенням активності комплексів mTOR, адже це в свою чергу блокує аутофагію. Проте неконтрольована аутофагія також є небезпечною, адже призводить до накопичення токсичних для клітин аутофагосом [10].

Експериментальні дані свідчать про те, що хронічне лікування рапаміцином, який інгібує активність mTOR, може мати потенційний терапевтичний ефект при захворюваннях мозку. Зокрема, на тваринних моделях підтверджена ефективність лікування низькими дозами рапаміцину при гострому ішемічному інсульті [25]. Однак, опосередкована стимуляція активності mTORC1 може залишатися корисною при депресії та хворобі Паркінсона, а також мати позитивний вплив на збереження пам’яті [10].

1.1.5. mTOR-опосередкована аутофагія

Аутофагія – це катаболічний процес, що активується в умовах голодування клітини або для деградації старих чи пошкоджених

органел/ділянок клітини, внаслідок чого такі фрагменти в клітині оточуються мембраною, формуючи аутофагосому, яка зливається з лізосомою для подальшого ферментативного розщеплення [26,27]. Аутофагія є своєрідним захисним механізмом клітини від загибелі, адже дозволяє позбутися дефектних частин клітини без активації апоптозу.

Коли mTORC1 активний, то він пригнічує аутофагію в клітинах шляхом фосфорилювання комплексу ULK1/Atg13/FIP200, який є необхідним для її запуску [26]. mTORC1 також здатний регулювати активність асоційованого зі смертю білку 1 (DAP1), який інгібує аутофагію [24]. Більше того, mTORC1 може пригнічувати аутофагію опосередковано, інгібуючи біогенез лізосом шляхом регуляції активності транскрипційного фактору ЕВ (TFEB), який задіяний у контролі функції лізосом [27].

Порушення аутофагії при нейродегенеративних захворюваннях може асоціюватися з накопиченням токсичних білкових агрегатів, що призводить до оксидативного стресу, функціональних порушень у роботі органел, некрозу та апоптозу [28]. Таким чином, аутофагія відіграє ключову роль у забезпеченні нормальної роботи нейронів, позбуваючись неправильно згорнутих або мутантних білків та попереджаючи їх агрегацію.

У випадку індукованої ішемії, активність mTOR у нейронах гіпокампа зменшується, що посилює аутофагію – основний механізм захисту нейронів від ішемії, та попереджає їх загибель, сприяючи нейропротекції [29]. Дослідження також вказують, що активація аутофагії шляхом інгібування mTORC1 може мати потенціал у терапії захворювань головного мозку [30].

1.2. Роль AKG у клітинному метаболізмі та нейропротекції

1.2.1. Біохімічні та фізіологічні особливості AKG

AKG (також 2-кетоглутарова кислота, 2-оксоглутарова кислота, за IUPAC 2-оксопентандіова кислота) слугує проміжним продуктом у циклі трикарбонових кислот (ЦТК) та відіграє важливу роль у роботі клітинного метаболізму. Це багатофункціональна речовина, і як джерело глутаміну та глутамату, вона здатна регулювати синтез протеїнів та колагену, модуляцію різноманітних сигнальних шляхів, антиоксидантний захист та імуномодуляцію. AKG також задіяний у синтезі жирних кислот і вуглеводів та в енергетичному обміні. Як універсальний клітинний метаболіт, AKG зазвичай локалізується в мітохондріях і цитоплазмі клітин, але може також бути знайдений у кровотоці [5,31,32].

У ЦТК AKG синтезується з ізоцитрату шляхом окисного декарбоксилювання, яке каталізуться ізоцитрат-дегідрогеназою (IDH), після чого під впливом AKG-дегідрогенази він перетворюється на сукциніл-КоА та NADH [5]. Крім того, глутамат-дегідрогеназа (GDH) може каталізувати реакцію утворення AKG з глутамату шляхом окисного дезамінування [32].

Ендогенний AKG слугує проміжним продуктом у біосинтезі двох життєво важливих амінокислот глутамату та глутаміну [33]. Більше того, ряд досліджень показав, що екзогенний AKG у вигляді солей Na, Ca і орнітину також засвоюється організмом і може слугувати прекурсором глутаміну, глутамату та інших амінокислот [34,35]. Глутамін та глутамат відіграють ключову роль у численних метаболічних шляхах, зокрема, і для нормального функціонування нейронів, що робить AKG цікавим предметом для досліджень у контексті нейропротекції.

Антиоксидантні властивості AKG характеризуються його здатністю до нейтралізації вільних радикалів (активних форм кисню, АФК), які у великій кількості здатні викликати пошкодження клітинних структур та функцій [5].

Різні дослідження вказують, що додавання AKG знижує рівень пероксиду в клітинних культурах *in vitro* [36], а на мишачій моделі *in vitro* та *in vivo* запобігає перекисному окисненню ліпідів та зменшує судоми, індуковані пошкодженням мітохондріальної ДНК у мозку нейротоксичною каїновою кислотою [37]. Крім того, у дослідженні на новонароджених щурах *in vivo* AKG продемонстрував захисний ефект проти виникнення катаракти, викликаної окислювальним стресом під впливом селеніту натрію [38].

Як субстрат гідроксилаз, що регулюють стабільність HIF-1, які є основними транскрипційними факторами, що реагують на гіпоксію, AKG також певним чином може бути пов’язаний з напругою кисню та регуляцією кисневого голодування [5,39].

1.2.2. AKG та нейропротекція

Беручи до уваги той факт, що головний мозок є надзвичайно енергоємним органом, дисфункції енергетичного метаболізму значною мірою пов’язані з розвитком нейродегенеративних станів [40].

Метаболічні властивості AKG сприяють його позитивному впливу на функціонування головного мозку, що може говорити про потенціал використання AKG як нейропротекторного засобу. Дослідження на піщанках показали, що застосування AKG в умовах ішемії запобігало загибелі нейронів та реактивному астрогліозу, сприяючи тим самим виживанню нервових клітин [41].

Нейродегенеративні розлади часто можна пов’язати з високим рівнем АФК, які здатні пошкоджувати клітини. У цьому випадку важливу нейропротекторну роль відіграють антиоксидантні властивості AKG. Дослідження вказують, що під впливом пероксиду водню та алюмінію в астроцитах, які важливі для підтримання рівня АТФ у мозку, спостерігається підвищений рівень AKG, який у свою чергу сприяє детоксикації вільних радикалів. Також AKG задіяний у синтезі вітаміноподібної речовини

L-карнітину, яка пов’язана з транспортом ліпідів до мітохондрій. AKG слугує кофактором фермента бутиробетаїн-діоксигенази (BBDOX), пригнічення активності якого під впливом АФК призводить до зменшення кількості L-карнітину та порушення ліпідного гомеостазу [42]. Таким чином, функції AKG, що включають антиоксидантну активність, живлення мітохондрій та синтез L-карнітину, відіграють роль у підтримці продукування АТФ та запобігають виникненню хвороби Альцгеймера.

Було також доведено, що AKG може покращувати функціонування дофамінергічних нейронів та запобігати накопиченню α-синуклеїну, який пов’язаний з утворенням патологічних білкових агрегатів у мозку при хворобі Паркінсона [43]. На основі наведених результатів можна припустити терапевтичний потенціал AKG для лікування хвороби Паркінсона.

Дослідження на мишах та клітинній лінії SH-SY5Y показали, що застосування AKG у моделі церебральної ішемії/реперфузії (відновлення кровотоку) та киснево-глюкозної депривації (КГД)/реперфузії перешкоджало загибелі нейронів та покращувало неврологічну оцінку *in vivo*. Тим часом у дослідах *in vitro* AKG зменшував запалення та ліквідував АФК, запобігаючи оксидативному стресу [44]. Отже, у випадку індукованої церебральної ішемії та КГД спостерігалися нейропротекторні ефекти AKG на нервові клітини.

Цікавим також є те, що інгібування mTOR рапаміцином полегшує перебіг синдрому Лі, мітохондріального захворювання, яке викликають дефекти в субодиниці NDUFS4 комплексу I мітохондріального електрон-транспортного ланцюга. Дане дослідження показало, що вплив рапаміцину сприяє зростанню доступності AKG, який у свою чергу продовжує виступати субстратом мітохондріального комплексу I та забезпечує метаболізм нейромедіаторів [45].

1.3. Взаємозв'язки сигнальних шляхів, що опосередковані AKG та mTOR

Обидві речовини, як mTOR, так і AKG, пов'язані з регуляцією клітинного метаболізму, тому викликає зацікавленість можливість перетину опосередкованих даними сполуками сигнальних шляхів та вплив цієї взаємодії на метаболічну регуляцію. Безпосередньо AKG та mTOR не взаємодіють, але AKG може регулювати активність шляху mTOR шляхом інгібування АТФ-синтази, зниження співвідношення АТФ/АДФ та активації AMPK, сприяючи при цьому аутофагії [7].

Цілий ряд досліджень вказує на те, що AKG може пригнічувати активність сигнального шляху mTOR, що залучений у процеси старіння, та діяти як антивіковий агент [6,7,46]. Так, експерименти на мушках *Drosophila melanogaster* показали, що вплив AKG знижує рівні транскрипції генів HIF-1-α, PGC, SREBP, mTORC1 і PI3K, тим самим пригнічуючи діяльність шляху mTOR. У той же час зростали рівні мРНК, пов'язаних з аутофагією, та кількість аутофагосом, що свідчить про активацію аутофагії при додаванні AKG [6]. Такі результати можуть вказувати на те, що шляхом інгібування активності АТФ-синтази, сигнальний шлях AKG може опосередковано модулювати активність сигнального шляху mTOR, знижуючи співвідношення АТФ/АДФ та активуючи AMPK (Рисунок 1.3. [Додаток А]).

Однак у дослідженнях на молодих свинях, уражених ліпополісахаридами (ЛПС), AKG виступив як активатор сигналізації mTOR. У той час як ЛПС пригнічували активність сигнального шляху mTOR, додавання AKG сприяло фосфорилюванню (активації) mTOR та p70 S6K у скелетних м'язах та кишечнику тварин, посилюючи тим самим біосинтез білків [47]. Крім того, було показано, що через глутамін, який здатний активувати шлях mTOR, добавка AKG може посилювати синтез білків та збільшувати рівень фосфорильованих форм білків mTOR, p70 S6K1 та 4E-BP1 [48]. Утворений внаслідок глутамінолізу AKG також може активувати

сигнальний шлях mTOR, збільшуючи навантаження GTP-аз на Rag B [49]. Дані дослідження вказують на зв’язок сигнальних шляхів mTOR та AKG через метаболізм амінокислот.

Очевидно, що взаємозв’язки між сигнальними шляхами AKG та mTOR стосуються не лише клітинного метаболізму, а й сигнальних функцій AKG, серед яких його антиоксидантні властивості, участь в метилюванні ДНК, модифікаціях хроматину та регулюванні реакції клітин на запальні процеси та гіпоксію [5]. Важливо також зазначити, що вплив AKG на сигналізацію mTOR не є однозначним і варіює в залежності від типу тканин та експериментальних моделей, і, таким чином, у різних типах клітин може сприяти як активації, так і інгібуванню активності mTOR. У той же час механізми взаємодії AKG та mTOR залишаються недостатньо вивченими в нервових клітинах.

Нейропротекторні ефекти AKG при нейродегенеративних розладах можна пояснити тим, що він здатний активувати аутофагію та біосинтез білків. Оскільки механізми взаємозв’язку сигнальних шляхів, опосередкованих AKG та mTOR, ще остаточно не з’ясовані, а AKG може виявляти нейропротекторні властивості, важливо продовжувати дослідження в даному напрямі з метою виявлення нових терапевтичних стратегій у лікуванні неврологічних порушень.

РОЗДІЛ 2.
Матеріали та методи досліджень

2.1. Виділення тканин та отримання культур

Усі експерименти проводилися відповідно до міжнародних принципів "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" (Європейська конвенція, Страсбург, 1986), статті 26 Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (21.02.2006) та з дотриманням усіх норм біоетики та біологічної безпеки.

Забір тканинного матеріалу для отримання культур і подальші експериментальні процедури з їх використанням проводилися з дотриманням правил роботи в асептичних умовах.

Для досліджень використовували довгострокову культуру дисоційованих клітин гіпокампа новонароджених щурів, отриману за методом Maar et al. [50]. Виділену гіпокампальну тканину подрібнювали, трипсинізували протягом 10 хв, ресуспендували за допомогою піпетки Пастера і відокремлювали від лізованих клітин центрифугуванням (200 g) у розчині Кребса, що містив 20 ммоль Hepes і 0,3 % BSA. Після чого клітини вносили у 8-лункові скляні або пластикові планшети (15000-20000 клітин/см^2), оброблені полі-L-лізином, та інкубували при 37 °C в атмосфері 5 % CO_2.

Середовище культивування для клітин (СК-2) включало (Invitrogen, Sigma, США): 100 % DMEM; 2 % B27; 20 ммоль/л HEPES; 0,5 ммоль/л Glumax; 100 од./мл пеніциліну та 100 мг/мл стрептоміцину. pH середовища становив 7,2. Середовище культивування змінювали на 2-й день інкубації, а надалі двічі на тиждень. Нейрони в культурі залишали стабілізувалися протягом 12-ти днів.

Моделювання глутамат-опосередкованої ексайтотоксичності здійснювали обробляючи культури гіпокампа 100 мкМ розчином глутамату (SigmaAldrich) протягом 5 хв, після чого середовище змінювали й відновлювали фізіологічні умови. Зв’язок сигнальних шляхів, опосередкованих mTOR і AKG, вивчали за допомогою розчину AKG концентрацією 2 мМ (SigmaAldrich, K1128) та інгібітора mTOR рапаміцину концентрацією 20 нМ (Tocris, 53123-88-9) інкубуванням протягом 4 год.

2.2. Оцінка життєздатності культур

Життєздатність культур оцінювали вимірюванням відносної кількості ферменту лактатдегідрогенази (LDH) у середовищі культивування. У нормі LDH міститься у цитоплазмі клітини і виділяється у зовнішнє середовище при пошкодженні клітинної оболонки. Тому кількість LDH визначена у позаклітинному середовищі була обернено пропорційна життєздатності культур [51].

Зміни відносної кількості LDH у культуральному середовищі вимірювали колориметричним методом за допомогою набору G1780 (Promega, США). Під час тесту у присутності LDH тетразолієва сіль (йоднітротетразолієвий фіолетовий; INT) відновлювалася й перетворювалася на червоний формазан, а насиченість забарвлення була прямо пропорційна кількості лізованих клітин [52].

Після виконання експерименту з різними варіантами впливу з кожної лунки планшета відбирали 50 мкл або 200 мкл культурального середовища, додавали рівний об'єм субстрату для вимірювання LDH і інкубували протягом 30 хв за кімнатної температури в темряві. Потім, щоб зупинити реакцію, додавали 0,1 % розчин оцтової кислоти.

Оптичну густину зразків вимірювали при 492 нм за допомогою EIA Microplate Reader (Sigma) або спектрофотометра uniSPEC 2 (LLG, Німеччина). Контролі були наступними: 1 – культуральне середовище з лунок

без органотипових культур гіпокампа; 2 – культуральне середовище з лунок, що містять необроблені глутаматом культури.

Зміни відносної кількості LDH у культурі виражали в умовних одиницях, що відповідають одиницям оптичної густини розчину, або у відсотках від максимального пошкодження клітин в органотипових культурах гіпокампа. Для вимірювання максимального пошкодження клітини з культивованих зрізів гіпокампа лізували протягом 10 хв у чашці Петрі, що містила 1 мл лізату, який входить до набору G1780. Для дослідження відбирали 50 мкл культурального середовища. Для вимірювання концентрації LDH усі зразки відбирали в двох екземплярах і визначали середнє.

2.3. Оцінка мітохондріальної активності культур

Оцінку мітохондріальної активності проводили за допомогою тетразолієвої солі MTS, яка відновлюється до водорозчинного пурпурного продукту формазану під дією мітохондріальних ферментів, а отже MTS-тест (Promega, Німеччина) можна використовувати для виявлення метаболічної активності клітин протягом життя та оцінки функції мітохондрій [53].

При виконанні тесту культуральне середовище промивали фізіологічним фосфат-сольовим розчином (HBSS, Sigma, Японія) та інкубували з реагентом MTS (40 мкл/200 мкл культурального середовища) при 37 °C протягом 40 хв, а оптичну густину розчину вимірювали за довжини хвилі 450 нм. Кількість формазанового продукту була прямо пропорційна мітохондріальній активності в культурі гіпокампа. Результати виражені в умовних одиницях, що відповідають оптичній густині розчину.

2.4. Імуногістохімічний аналіз культур

Для проведення імуногістохімічного аналізу рівнів експресії специфічного маркера аутофагії LC3 та специфічного маркера

постсинаптичної щільності PSD95 культури гіпокампа фіксували в 4 % розчині формальдегіду. Далі відмивали культури розчином PBS та обробляли 0,3 % розчином пероксиду 30 хв. Потім протягом 1 год культури блокували в розчині PBS з 0,5 % козячої сироватки та 1 % BSA та інкубували протягом ночі з первинними антитілами (моноклональні мишачі-анти-LC3, 1:460, поліклональні кролячі-анти-PSD95, 1:200; SigmaAldrich). Наступного дня в PBS додавали відповідні вторинні антитіла (SigmaAldrich): анти-мишачі-HRP (1:200) та анти-кролячі-HRP (1:200). 3,3´-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) використовували як хромогенний субстрат. Негативні контролі інкубували без антитіл. Результати реакцій візуалізували за допомогою оптичного мікроскопа Zeiss Telaval 31 при 200-кратному збільшенні, а їх інтенсивність у тілах і відростках нейронів оцінювали з використанням програмного забезпечення ImageJ і виражали в умовних одиницях, що відповідають площі імунопозитивного забарвлення на мм^2 загальної площі зображення.

2.5. Статистичний аналіз

Статистичну обробку та представлення результатів виконано з використанням електронних таблиць Excel. Дані перевіряли на нормальний розподіл за допомогою критерію Шапіро-Уілка. Результати характеризуються нормальним розподілом. Цифрові дані представлені як середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього арифметичного (SEM). Вибірки порівнювали за допомогою дисперсійного аналізу Tuckey (ANOVA) або t-критерію Стьюдента і вважали відмінності достовірними при $p < 0,05$. Значущі зміни позначені на рисунках.

РОЗДІЛ 3.
Результати досліджень

На 12-й день культивування за морфологічною оцінкою клітини мали характерні структурні особливості, притаманні нейронам, і формували мережу відростків та міжклітинних контактів (Рисунок 3.1.). Модель глутаматної ексайтотоксичності була налаштована емпірично з використанням довгострокової культури дисоційованих клітин гіпокампа та імітувала відтерміновані ефекти глутамату у великій концентрації. Результати впливу глутамату у концентрації 100 мкМ на клітини вимірювали через 4 год.

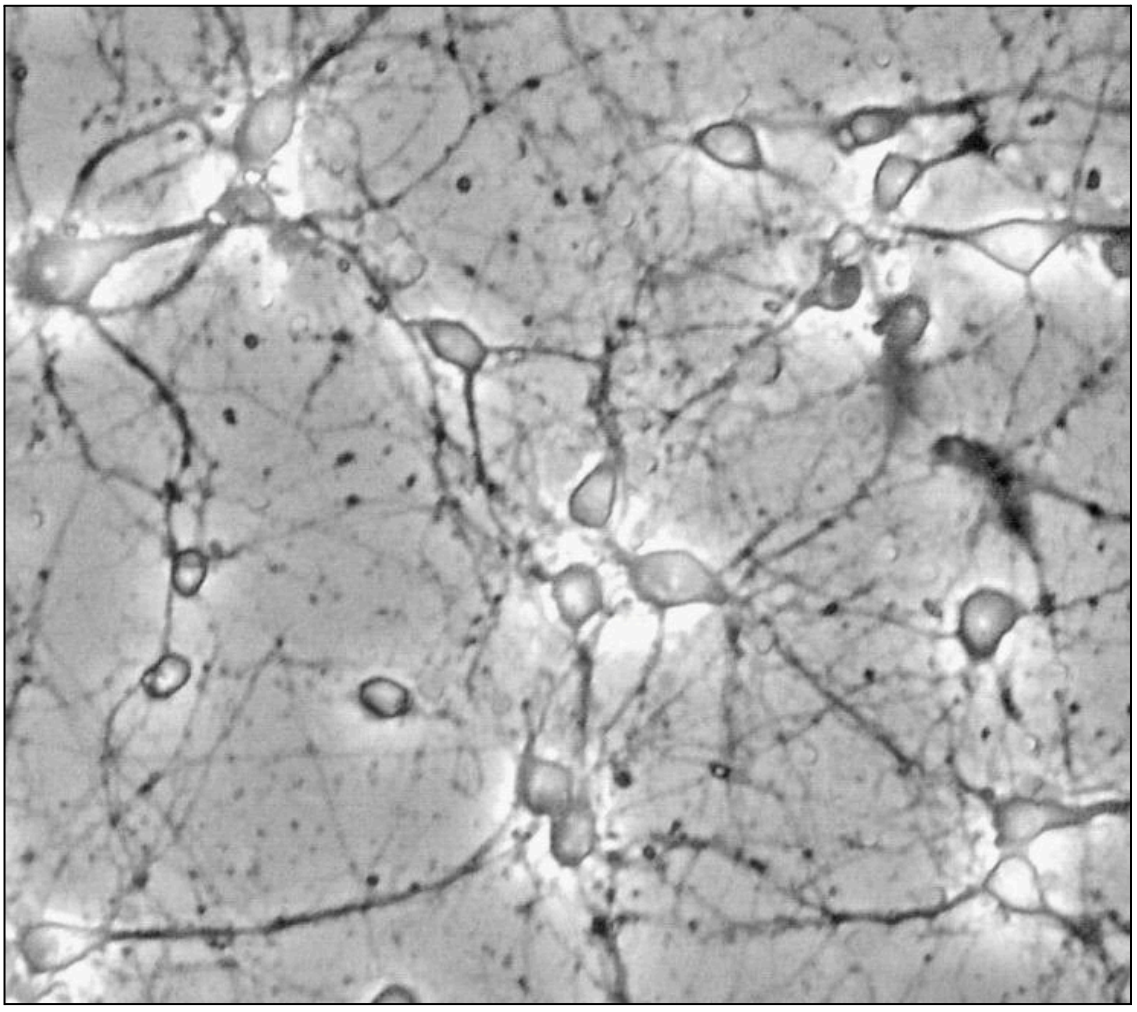

Рисунок 3.1. – Фазово-контрастне зображення культур дисоційованих клітин гіпокампа на 12-й день культивування.

Було показано, що рівень LDH у культуральному середовищі після впливу глутамату підвищується (Рисунок 3.2.), що сигналізує про зниження життєздатності клітин у культурі. Це свідчить про негативний вплив використаної дози глутамату на виживання гіпокампальних клітин, якщо порівнювати з контролем. Додавання AKG та рапаміцину підвищувало життєздатність клітин, про що свідчить знижений рівень LDH у цих групах порівняно з групою глутамату (Рисунок 3.2.).

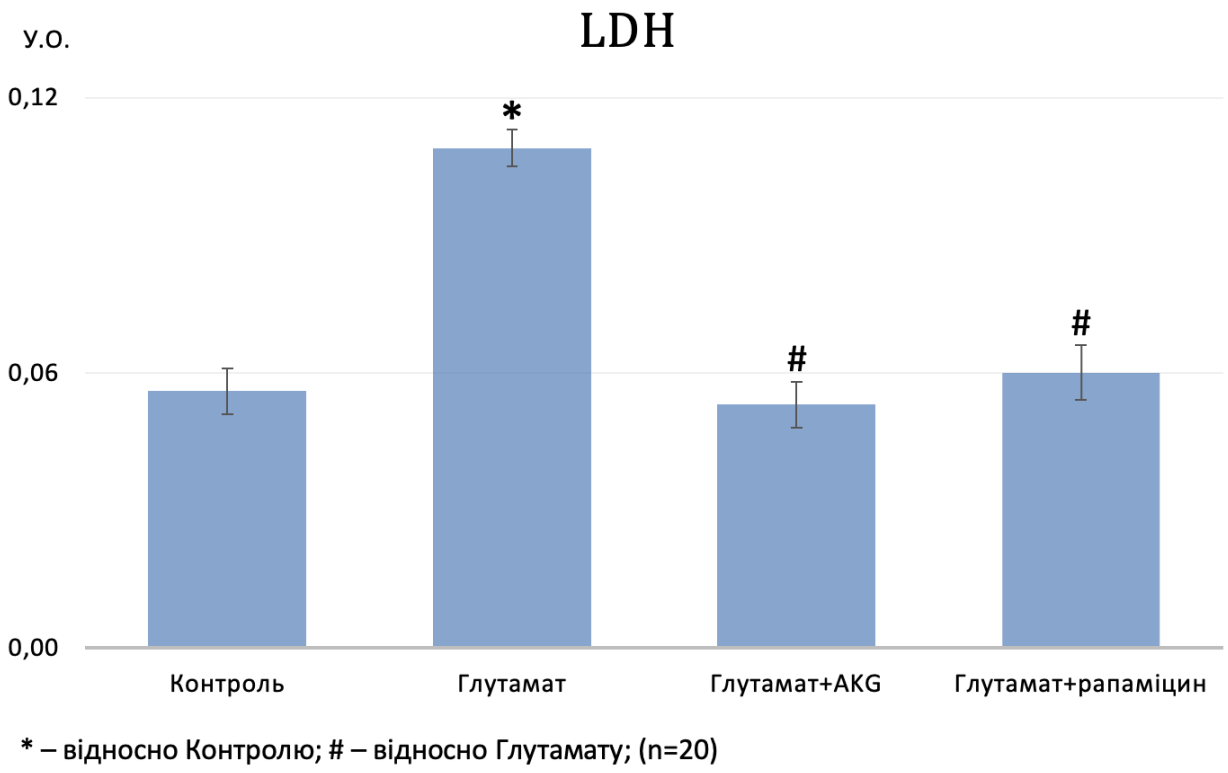

Рисунок 3.2. – Відносна кількість LDH у середовищі культивування. Оцінка життєздатності нейронів у культурі гіпокампа.

Результати MTS-тесту показали, що при впливі на гіпокампальну культуру глутамату, рівень мітохондріальної активності знижувався у порівнянні з контрольною групою. Додавання AKG та рапаміцину в моделі глутаматної ексайтотоксичності мало позитивний ефект і посилювало метаболічну активність, при цьому AKG збільшував цей показник дещо активніше, ніж рапаміцин (Рисунок 3.3.).

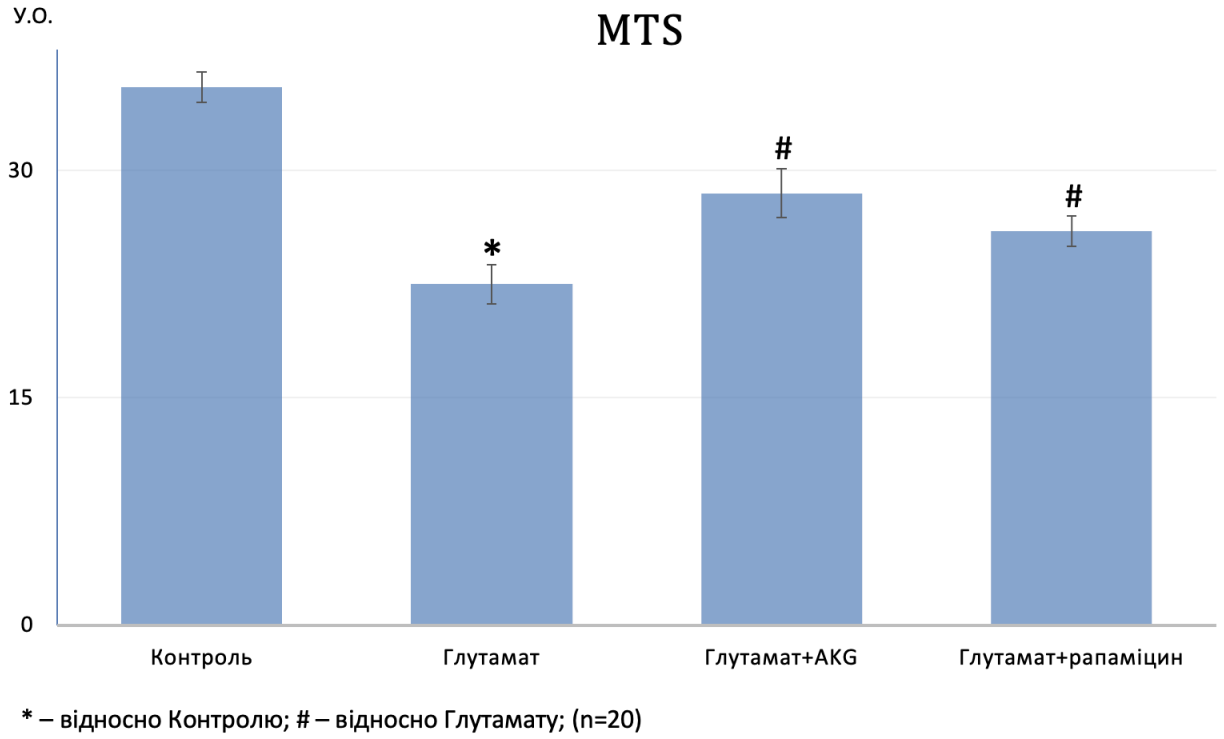

Рисунок 3.3. – Рівень мітохондріальної активності в середовищі культивування, визначений за допомогою MTS-тесту.

Аналіз рівня експресії PSD95, специфічного маркера постсинаптичної щільності, показав спад експресії цього білку при додаванні глутамату, що може призводити до інгібування синаптогенезу і свідчити про нейротоксичність. На противагу цьому, додавання AKG та рапаміцину запобігало ушкоджуючій дії глутамату, крім того AKG мав у певній мірі вищий за рапаміцин нейропротекторний ефект (Рисунок 3.4.).

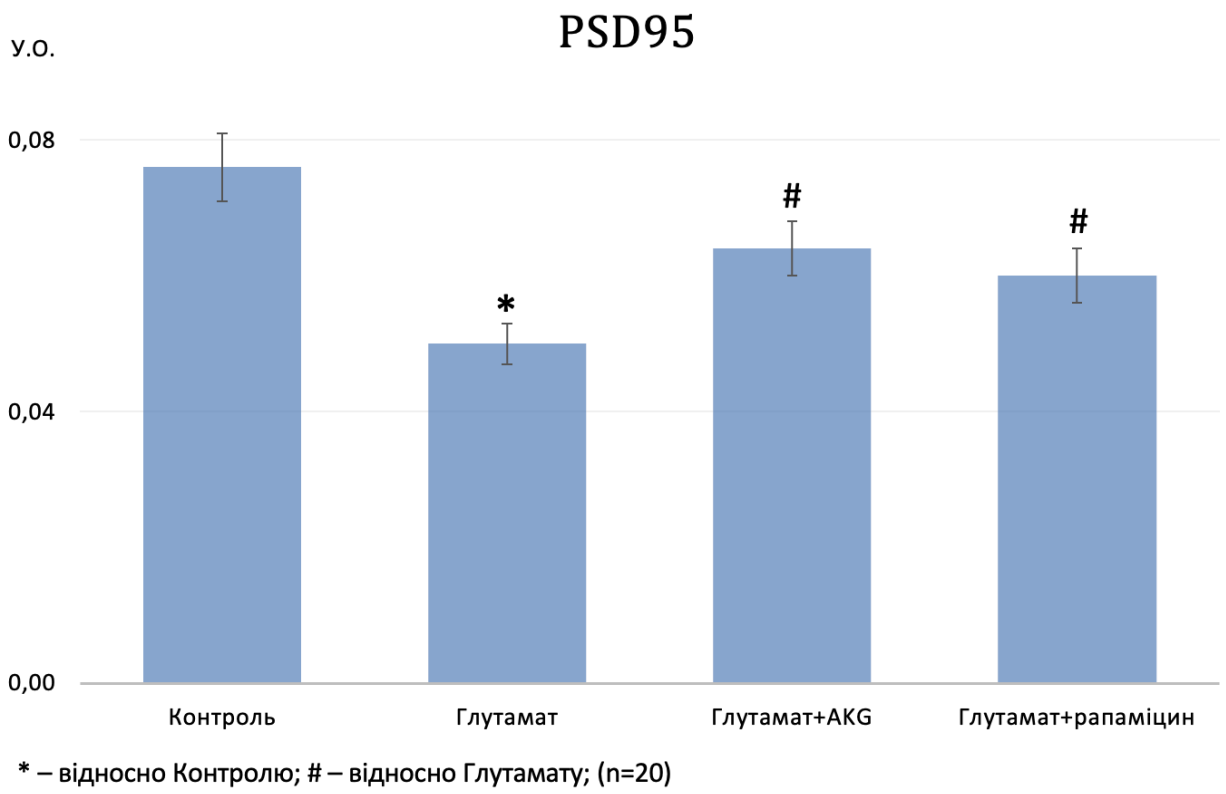

Рисунок 3.4. – Рівень експресії специфічного маркера постсинаптичної щільності PSD95 у середовищі культивування.

Аналіз рівня експресії LC3, специфічного маркера аутофагії, показав, що в контрольній групі аутофагія була активнішою в ділянці тіл нейронів. В умовах моделі глутаматної ексайтотоксичності аутофагія посилювалась як на рівні тіл, так і відростків нейронів. Додавання AKG та рапаміцину послаблювало аутофагію у відростках порівняно з групою глутамату, у той час коли в тілах нейронів рівень LC3 підвищувався, тобто активація аутофагії під впливом AKG та рапаміцину відбувалася саме у тілах гіпокампальних нейронів (Рисунок 3.5.).

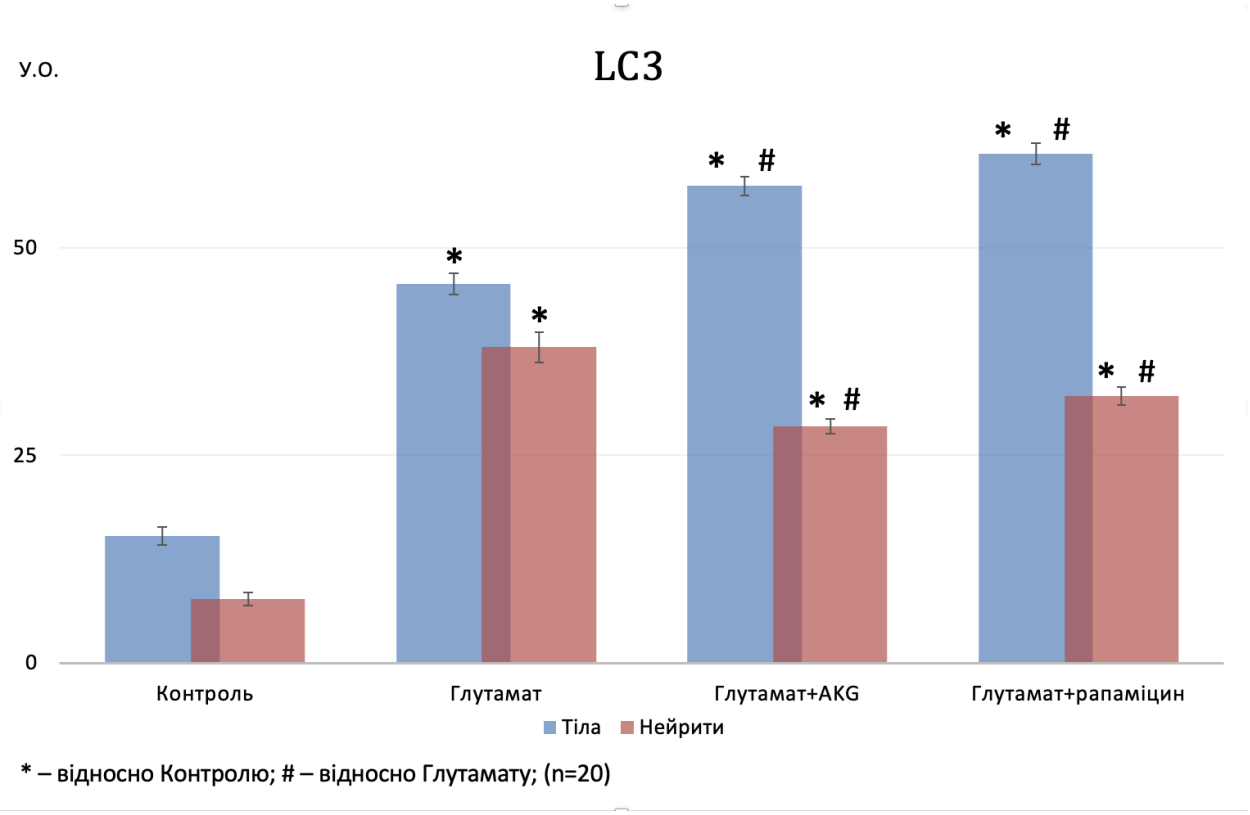

Рисунок 3.5. – Рівень експресії специфічного маркера аутофагії LC3 у тілах і нейритах нейронів у середовищі культивування.

РОЗДІЛ 4.
Обговорення результатів

Будучи одним з ключових збудливих нейромедіаторів, глутамат займає важливе місце в забезпеченні нормального функціонування нейронів, а також у навчанні та пам'яті шляхом модуляції Na^+, Ca^{2+} та K^+ каналів [2]. Разом з тим, надмірна пролонгована дія глутамату, викликана черепно-мозковою травмою, або як наслідок нейропатологій мозку, серед яких хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Хантінгтона та ішемія, може спричиняти глутаматну ексайтотоксичність – механізм загибелі клітин, що тягне за собою метаболічні порушення, дисрегуляцію апоптозу та аутофагії [3]. Тому важливо зрозуміти внутрішньомолекулярні механізми, які призводять до неврологічних порушень під впливом глутаматної ексайтотоксичності, а також ідентифікувати внутрішні нейропротекторні фактори, адже це слугуватиме коренем у покращенні терапії при боротьбі з нейропатологіями.

Хоча й відомо, що активний mTOR пригнічує аутофагію шляхом інгібування комплексу ULK1/Atg13/FIP200 [26], проте достеменно не зрозуміло, яку саме роль він відіграє за умов глутаматної ексайтотоксичності. Інгібування mTOR рапаміцином в умовах нашого експерименту збільшувало експресію маркера аутофагії LC3 у тілах нейронів гіпокампа, що індукувало аутофагію, захищаючи таким чином клітини від пошкодження за надмірного впливу глутамату.

З аналізу літератури можна припустити зв'язок між сигнальними шляхами, опосередкованими mTOR і AKG [6,7], а схожа дія AKG та рапаміцину у наших експериментах допускає, що в умовах глутамат-опосередкованої ексайтотоксичності AKG може пригнічувати активність mTOR.

AKG як багатофункціональна молекула, що відіграє значну роль у метаболізмі білків, вуглеводів, жирних кислот та аміаку, підтриманні

клітинного енергетичного балансу та виживанні клітин у стані гіпоксії, а також у подовженні тривалості життя та активації аутофагії, може застосовуватися у якості потенційного засобу для захисту від нейродегенеративних процесів [5-7]. Сигналізація mTOR важлива в регуляції багатьох метаболічних функцій, а її порушення мають вагому роль у захворюваннях мозку [4]. З цієї перспективи mTOR-опосередкована аутофагія є цікавою для досліджень її нейропротекторних впливів. Так, дослідження Hwang, Jee-Yeon et al. [30] показали, що ішемічне пошкодження пригнічує діяльність mTOR, тим самим активуючи аутофагію в нейронах та проявляючи певний нейропротекторний ефект для виживання клітин. Саме тому, вивчення перетину сигнальних шляхів, опосередкованих AKG і mTOR важливе для покращення розуміння їх взаємодії в мозку та розробки працюючих стратегій лікування церебральних захворювань.

Результати наших експериментів вказують на посилення опосередкованої сигнальним шляхом mTOR аутофагії під впливом AKG та інгібітора mTOR рапаміцину в умовах глутаматної ексайтотоксичності, що також корелює з покращенням життєздатності, зростанням мітохондріальної активності та активацією синаптогенезу клітин в культурі гіпокампа.

Наведені результати можуть свідчити про перетин індукуючих нейропротекцію сигнальних шляхів, що опосередковані mTOR та AKG, у моделі ексайтотоксичності глутамату. Крім того, AKG може слугувати потенційним модулятором активності сигнального шляху mTOR задля забезпечення нейропротекторних функцій шляхом активації аутофагії.

Оскільки mTOR-опосередкований сигнальний шлях є важливим у контролі метаболічного гомеостазу клітин мозку, порушення даної сигналізації несуть за собою тяжкі неврологічні захворювання. Саме тому доцільно розглядати регуляцію активності даного сигнального шляху як варіант для лікування нейродегенеративних розладів.

AKG, який відіграє вагому роль у забезпеченні функцій клітинного метаболізму, виживанні клітин у стані стресу та активації аутофагії, може

потенційно використовуватись у терапії як нейропротектор, у тому числі і як модулятор сигнального шляху, опосередкованого mTOR.

Механізми взаємозв’язку сигнальних шляхів AKG і mTOR у головному мозку ще остаточно не зрозумілі, тому актуальним залишається продовження досліджень у даному напрямі з метою визначення, яким саме чином AKG здатний регулювати активність mTOR і якою мірою ця регуляція може характеризувати його нейропротекторні властивості.

ВИСНОВКИ

1. Виходячи з результатів LDH- та MTS-тестів, можна вважати, що використана експериментальна модель глутаматної ексайтотоксичності *in vitro* є адекватною для дослідження механізмів, опосередкованих AKG і mTOR, які залучені у нейродегенеративні та нейропротекторні процеси.
2. Виявлено, що в умовах глутаматної ексайтотоксичності ушкодження клітин супроводжується зменшенням імунореактивності маркера постсинаптичної щільності PSD95 та збільшенням експресії маркеру аутофагії LC3 у тілах нейронів, що свідчить про пригнічення синаптогенезу й активацію аутофагії відповідно.
3. Показано, що за умов дії глутамату AKG та інгібітор mTOR рапаміцин сприяють підвищенню життєздатності клітин та нормалізації показників стану синапсів, а також активації процесів аутофагії.
4. Отримані дані вказують на залучення і взаємозв’язки опосередкованих mTOR та AKG сигнальних шляхів у ендогенних нейропротекторних механізмах.
5. Результати дослідження демонструють вагомий потенціал використання AKG у модуляції сигнального шляху, опосередкованого mTOR, для забезпечення нейропротекції за умов ексайтотоксичності глутамату.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Choonara, Y. E., Pillay, V., Du Toit, L. C., Modi, G., Naidoo, D., Ndesendo, V. M. K., & Sibambo, S. R. (2009). Trends in the molecular pathogenesis and clinical therapeutics of common neurodegenerative disorders. *International journal of molecular sciences*, *10*(6), 2510–2557.
2. Xiong, Y., Zhou, D., Zheng, K., Bi, W., & Dong, Y. (2022). Extracellular Adenosine Triphosphate Binding to P2Y1 Receptors Prevents Glutamate-Induced Excitotoxicity: Involvement of Erk1/2 Signaling Pathway to Suppress Autophagy. *Frontiers in neuroscience*, *16*, 901688.
3. Belov Kirdajova, D., Kriska, J., Tureckova, J., & Anderova, M. (2020). Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, *14*, 51.
4. R.A. Saxton, D.M. Sabatini (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease, *Cell*, *168*, 960–976.
5. Zdzisińska, B., Żurek, A., & Kandefer-Szerszeń, M. (2017). Alpha-Ketoglutarate as a Molecule with Pleiotropic Activity: Well-Known and Novel Possibilities of Therapeutic Use. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *65*(1), 21–36.
6. Su, Y., Wang, T., Wu, N., Li, D., Fan, X., Xu, Z., Mishra, S. K., & Yang, M. (2019). Alpha-ketoglutarate extends Drosophila lifespan by inhibiting mTOR and activating AMPK. *Aging, 11*(12), 4183–4197.
7. Chin, R. M., Fu, X., Pai, M. Y., Vergnes, L., Hwang, H., Deng, G., Diep, S., Lomenick, B., Meli, V. S., Monsalve, G. C., Hu, E., Whelan, S. A., Wang, J. X., Jung, G., Solis, G. M., Fazlollahi, F., Kaweeteerawat, C., Quach, A., Nili, M., Krall, A. S., … Huang, J. (2014). The metabolite α-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature, 510*(7505), 397–401.
8. Angelia Szwed, Eugene Kim, Estela Jacinto (2021). Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2, *Physiological Reviews* 101:3, 1371-1426.
9. D.D. Sarbassov, S.M. Ali, S. Sengupta, J.-H. Sheen, P.P. Hsu, A.F. Bagley, A.L. Markhard, D.M. Sabatini (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB, *Molecular cell*, *22*(2), 159–168.
10. J.Bockaert, P.Marin (2015). mTOR in brain physiology and pathologies, *Physiological reviews*, *95*(4), 1157–1187.
11. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a

novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology : CB*, *14*(14), 1296–1302.

12. Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *12*(1), 21–35.
13. Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., & Pavletich, N. P. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, *497*(7448), 217–223.
14. Kim, S. G., Buel, G. R., & Blenis, J. (2013). Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway. *Molecules and cells*, *35*(6), 463–473.
15. Melanis, K., Stefanou, M. I., Themistoklis, K. M., & Papasilekas, T. (2023). mTOR pathway - a potential therapeutic target in stroke. *Therapeutic advances in neurological disorders*, *16*, 17562864231187770.
16. Carnero, A., & Paramio, J. M. (2014). The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. *Frontiers in oncology*, *4*, 252.
17. Baffi, T. R., Lordén, G., Wozniak, J. M., Feichtner, A., Yeung, W., Kornev, A. P., King, C. C., Del Rio, J. C., Limaye, A. J., Bogomolovas, J., Gould, C. M., Chen, J., Kennedy, E. J., Kannan, N., Gonzalez, D. J., Stefan, E., Taylor, S. S., & Newton, A. C. (2021). mTORC2 controls the activity of PKC and Akt by phosphorylating a conserved TOR interaction motif. *Science signaling*, *14*(678), eabe4509.
18. Sun, Y., Wang, H., Qu, T., Luo, J., An, P., Ren, F., Luo, Y., & Li, Y. (2023). mTORC2: a multifaceted regulator of autophagy. *Cell communication and signaling : CCS, 21*(1), 4.
19. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*, *30*(2), 214–226.
20. M. Castellanos, C. Gubern, E. Kadar (2016). Chapter 7 - mTOR: exploring a new potential therapeutic target for stroke. K. Maiese (Ed.), *Molecules to Medicine with mTOR*, Academic Press, 105-122.
21. Takahara, T., Amemiya, Y., Sugiyama, R., Maki, M., & Shibata, H. (2020). Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *Journal of biomedical science*, *27*(1), 87.
22. Lamming, D. W., & Sabatini, D. M. (2013). A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell metabolism*, *18*(4), 465–469.
23. Dunlop, E. A., & Tee, A. R. (2014). mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Seminars in cell & developmental biology*, *36*, 121–129.

24. Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, *149*(2), 274–293.
25. Beard, D. J., Hadley, G., Thurley, N., Howells, D. W., Sutherland, B. A., & Buchan, A. M. (2019). The effect of rapamycin treatment on cerebral ischemia: A systematic review and meta-analysis of animal model studies. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*, *14*(2), 137–145.
26. Dunlop, E. A., & Tee, A. R. (2014). mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Seminars in cell & developmental biology*, *36*, 121–129.
27. Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., & Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal*, *31*(5), 1095–1108.
28. Sarkar S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society transactions*, *41*(5), 1103–1130.
29. Hwang, J. Y., Gertner, M., Pontarelli, F., Court-Vazquez, B., Bennett, M. V., Ofengeim, D., & Zukin, R. S. (2017). Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die. *Cell death and differentiation*, *24*(2), 317–329.
30. Roscic, A., Baldo, B., Crochemore, C., Marcellin, D., & Paganetti, P. (2011). Induction of autophagy with catalytic mTOR inhibitors reduces huntingtin aggregates in a neuronal cell model. *Journal of neurochemistry*, *119*(2), 398–407.
31. Meng, X., Liu, H., Peng, L., He, W., & Li, S. (2022). Potential clinical applications of alpha-ketoglutaric acid in diseases (Review). *Molecular medicine reports*, *25*(5), 151.
32. Wu, N., Yang, M., Gaur, U., Xu, H., Yao, Y., & Li, D. (2016). Alpha-Ketoglutarate: Physiological Functions and Applications. *Biomolecules & therapeutics*, *24*(1), 1–8.
33. Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M. M., Pithon-Curi, T. C., & Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell biochemistry and function*, *21*(1), 1–9.
34. Dabek, M., Kruszewska, D., Filip, R., Hotowy, A., Pierzynowski, L., Wojtasz-Pajak, A., Szymanczyk, S., Valverde Piedra, J. L., Werpachowska,

E., & Pierzynowski, S. G. (2005). alpha-Ketoglutarate (AKG) absorption from pig intestine and plasma pharmacokinetics. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, *89*(11-12), 419–426.

35. Filip, R., & Pierzynowski, S. G. (2008). The absorption, tissue distribution and excretion of enteraly administered alpha-ketoglutarate in rats. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, *92*(2), 182–189.
36. Long, L. H., & Halliwell, B. (2011). Artefacts in cell culture: α-Ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochemical and biophysical research communications*, *406*(1), 20–24.
37. Yamamoto, H. A., & Mohanan, P. V. (2003). Effect of alpha-ketoglutarate and oxaloacetate on brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. *Toxicology letters*, *143*(2), 115–122.
38. Varma, S. D., & Hegde, K. R. (2004). Effect of alpha-ketoglutarate against selenite cataract formation. *Experimental eye research*, *79*(6), 913–918.
39. Hansen, G. E., & Gibson, G. E. (2022). The α-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex as a Hub of Plasticity in Neurodegeneration and Regeneration. *International journal of molecular sciences*, *23*(20), 12403.
40. Kapogiannis D. (2015). Energy metabolism and the brain: a bidirectional relationship. *Ageing research reviews*, *20*, 35–36.
41. Kovalenko, T. N., Ushakova, G. A., Osadchenko, I., Skibo, G. G., & Pierzynowski, S. G. (2011). The neuroprotective effect of 2-oxoglutarate in the experimental ischemia of hippocampus. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, *62*(2), 239–246.
42. Thomas, S. C., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Auger, C., & Appanna, V. D. (2015). Brain metabolism and Alzheimer's disease: the prospect of a metabolite-based therapy. *The journal of nutrition, health & aging*, *19*(1), 58–63.
43. Zhang, W., Ding, L., Zhang, M., Zheng, S., Ma, R., Gong, J., Mao, H., Xu, H., Xu, P., & Zhang, Y. (2023). Dietary intake of α-ketoglutarate ameliorates α-synuclein pathology in mouse models of Parkinson's disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *80*(6), 155.
44. Hua, W., Zhang, X., Tang, H., Li, C., Han, N., Li, H., Ma, H., Liu, P., Zhou, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Zhang, L., Li, Z., Shen, H., Xing, P., Yu, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Yang, P., & Liu, J. (2022). AKG Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury through c-Fos/IL-10/Stat3 Signaling Pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2022*, 6839385.

45. Johnson, S. C., Kayser, E. B., Bornstein, R., Stokes, J., Bitto, A., Park, K. Y., Pan, A., Sun, G., Raftery, D., Kaeberlein, M., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2020). Regional metabolic signatures in the Ndufs4(KO) mouse brain implicate defective glutamate/α-ketoglutarate metabolism in mitochondrial disease. *Molecular genetics and metabolism*, *130*(2), 118–132.
46. Asadi Shahmirzadi, A., Edgar, D., Liao, C. Y., Hsu, Y. M., Lucanic, M., Asadi Shahmirzadi, A., Wiley, C. D., Gan, G., Kim, D. E., Kasler, H. G., Kuehnemann, C., Kaplowitz, B., Bhaumik, D., Riley, R. R., Kennedy, B. K., & Lithgow, G. J. (2020). Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Metabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. *Cell metabolism*, *32*(3), 447–456.e6.
47. Wang, L., Yi, D., Hou, Y., Ding, B., Li, K., Li, B., Zhu, H., Liu, Y., & Wu, G. (2016). Dietary Supplementation with α-Ketoglutarate Activates mTOR Signaling and Enhances Energy Status in Skeletal Muscle of Lipopolysaccharide-Challenged Piglets. *The Journal of nutrition*, *146*(8), 1514–1520.
48. Yao, K., Yin, Y., Li, X., Xi, P., Wang, J., Lei, J., Hou, Y., & Wu, G. (2012). Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells. *Amino acids*, *42*(6), 2491–2500.
49. Bodineau, C., Tomé, M., Courtois, S., Costa, A. S. H., Sciacovelli, M., Rousseau, B., Richard, E., Vacher, P., Parejo-Pérez, C., Bessede, E., Varon, C., Soubeyran, P., Frezza, C., Murdoch, P. D. S., Villar, V. H., & Durán, R. V. (2021). Two parallel pathways connect glutamine metabolism and mTORC1 activity to regulate glutamoptosis. *Nature communications*, *12*(1), 4814.
50. Maar, T. E., Rønn, L. C., Bock, E., Berezin, V., Moran, J., Pasantes-Morales, H., & Schousboe, A. (1997). Characterization of microwell cultures of dissociated brain tissue for studies of cell-cell interactions. *Journal of neuroscience research*, *47*(2), 163–172.
51. Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of immunological methods*, *115*(1), 61–69.
52. Nachlas, M.M. *et al.* (1960) The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.* 1, 317–26.
53. Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., & Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications*, *3*(7), 207–212.

ДОДАТКИ

Додаток А

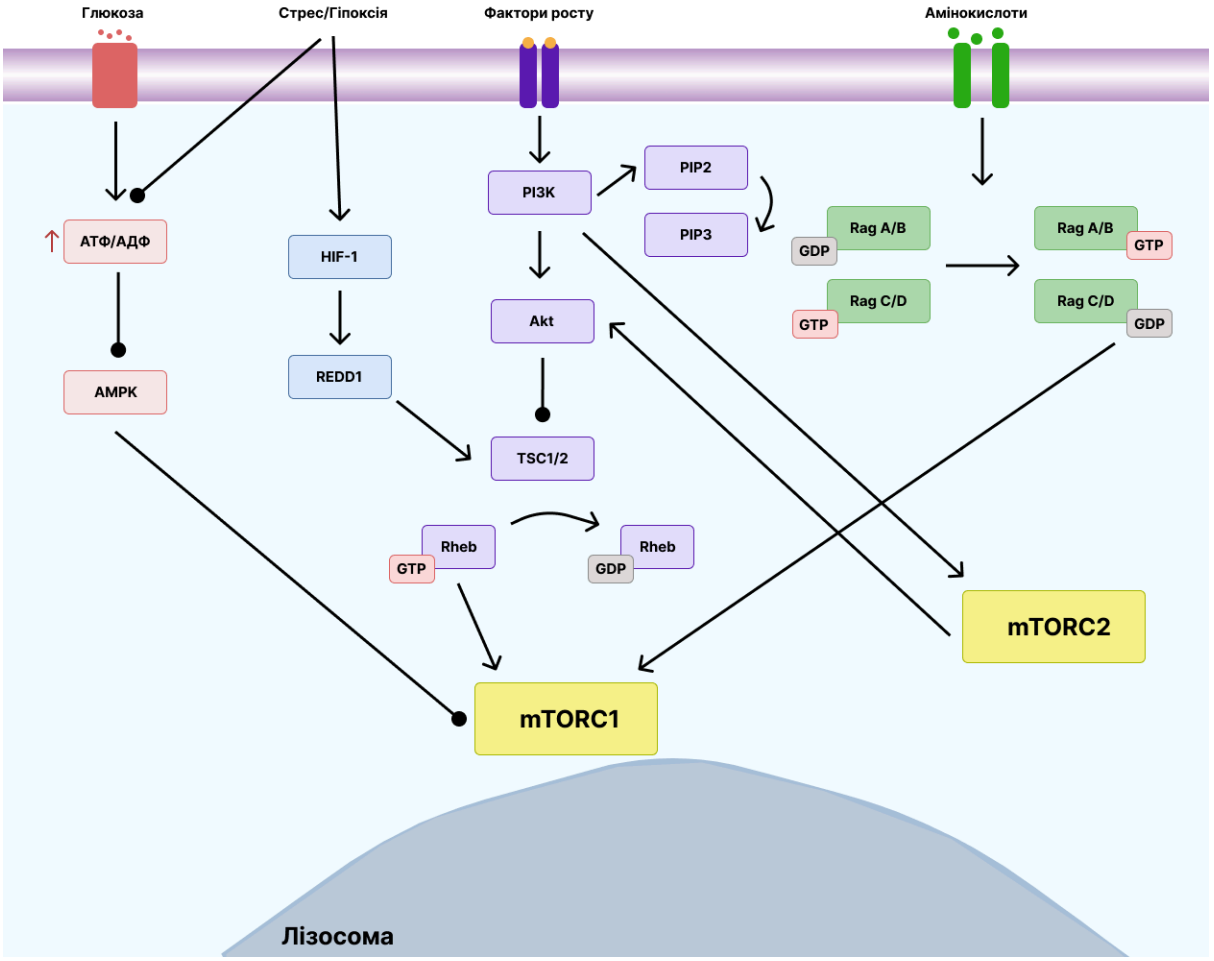

Рисунок 1.1. – Схематичне зображення шляхів регуляції mTOR. Фактори росту активують PI3K. PI3K фосфорилює PIP2, який перетворюється на PIP3, що активує Akt та mTORC2. Akt інгібує гетеродимер TSC, який спричиняє перехід Rheb в неактивний стан GDP. GTP-зв'язаний Rheb активує mTORC1. AMPK слугує сенсором співвідношень АТФ/АДФ, і інгібує активність mTORC1. Нестача кисню знижує співвідношення АТФ/АДФ та індукує зростання експресії REDD1, який контролюється транскрипційним фактором HIF-1. REDD1 може активувати TSC1/2, спричиняючи тим самим інгібування mTORC1. Доступ вільних амінокислот дає можливість Rag переходити в активну конформацію та таким чином активувати mTORC1. mTORC2, у свою чергу, здатен фосфорилювати Akt.

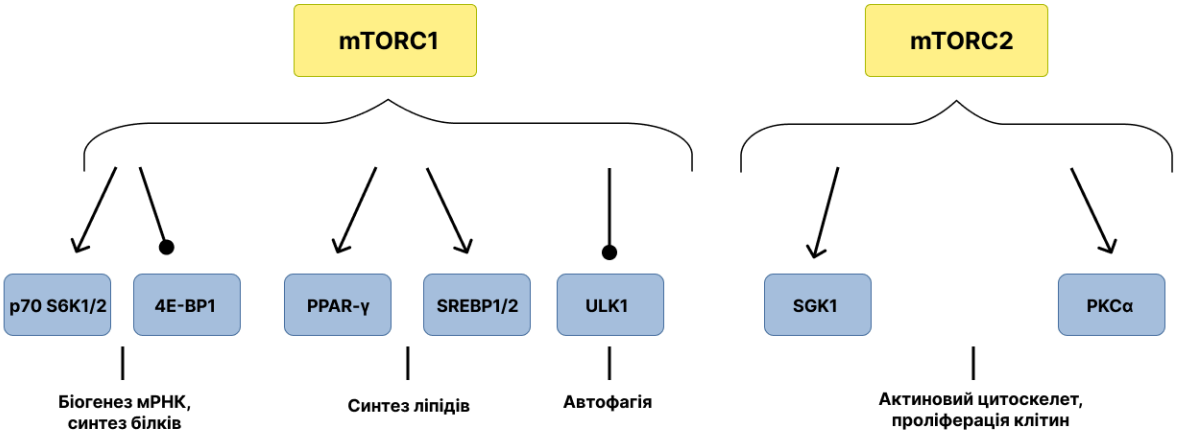

Рисунок 1.2. – Механізми регуляції клітинних функцій, опосередкованих mTOR. Шляхом активації p70 S6K1/2 та інгібування 4E-BP1 mTORC1 контролює біогенез мРНК та синтез білків. Активація PPAR-γ та SREBP1/2 індукує синтез ліпідів, а пригнічення аутофагії здійснюється за допомогою інгібування комплексу ULK1. mTORC2 бере участь у ремоделюванні актинового цитоскелету та проліферації клітин шляхом активації SGK1 та PKCα.

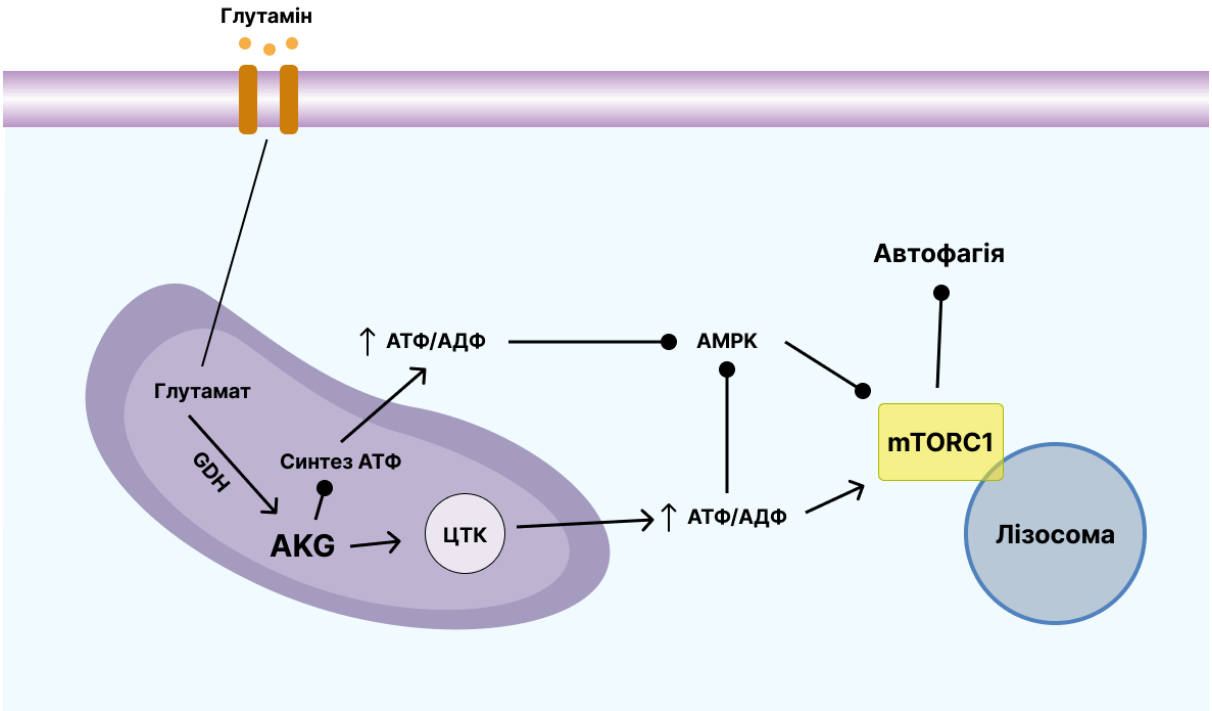

Рисунок 1.3. – Ілюстрація взаємозв'язку сигнальних шляхів AKG та mTOR. AKG може утворюватися з глутамату шляхом його окисного дезамінування за участі фермента глутаматдегідрогенази (GDH). AKG безпосередньо інгібує АТФ-синтазу, знижуючи співвідношення АТФ/АДФ, із подальшою активацією AMPK, що пригнічує mTOR та стимулює аутофагію. AKG також може слугувати альтернативним джерелом енергії в ЦТК в умовах дефіциту енергії, сприяючи додатковому синтезу АТФ, запускаючи таким чином активацію сигнального шляху mTOR.