

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623467>

Роль киназы RIPK1 в адаптации нейронально-глиальных сетей в условиях гипоксии

М.М. Логинова^{1, 2*}, Р.С. Ярков, М.В. Ведунова¹, Е.В. Митрошина¹¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Российская Федерация;² Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Гипоксия головного мозга характеризуется снижением снабжения кислородом тканей и имеет решающее значение для патогенеза множества нейродегенеративных заболеваний. При гипоксии запускаются внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к запуску различных форм гибели нервных клеток. Известно, что киназа RIPK1 в условиях гипоксии регулирует запуск некроптоза, а её блокада потенциально может оказывать нейропротекторный эффект в ответ на гипоксическое повреждение [1–3]. Однако исследований, изучающих влияние блокады киназы RIPK1 на функционирование нейрон-глиальных сетей, в настоящее время нет, следовательно, данная киназа является перспективной мишенью для дальнейшего изучения.

Цель работы. Изучение роли киназы RIPK1 в адаптации нейрон-глиальных сетей в условиях гипоксии.

Объектом исследования стали первичные культуры нервных клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мыши линии C57Bl/6. Моделирование гипоксии *in vitro* осуществлялось на 14 день культивирования первичных культур нервных клеток. Аппликация ингибитора киназы RIPK1 происходила за 20 минут до, во время и после моделирования гипоксии. Через 7 суток после моделирования стресс-фактора оценивались кальциевая и биоэлектрическая активность нейрон-глиальных сетей. Анализ кальциевой активности проводили с применением красителя Oregon Green 488 BAPTA-1, AM (Thermo Fisher Scientific, США) на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 800 (Carl Zeiss, Германия). Оценивались такие параметры, как общий процент осциллирующих клеток в культуре, частота и длительность кальциевых событий. Анализ биоэлектрической активности осуществлялся с применением мультиэлектродных матриц MEA 60 (Multichannel systems, Германия), на которых культивировались первичные культуры нервных клеток. Зарегистрированный сигнал с матриц подвергался обработке с применением алгоритмов MEAMAN в программе MATLAB (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2012611190). Оценивалось среднее количество малых сетевых пачек и среднее количество спайков в сетевой пачке.

В физиологических условиях к 21 суткам развития нейрон-глиальных сетей в клеточной культуре наблюдается спонтанная кальциевая активность: процент клеток, проявляющих кальциевые события составляет $60,64 \pm 3,68\%$, частота кальциевых осцилляций — $1,52 \pm 0,22$ осц/мин, а длительность $9,63 \pm 0,75$ с. При моделировании гипоксии наблюдается снижение числа клеток, проявляющих кальциевые события, до $34,77 \pm 4,08\%$ и частоты кальциевых осцилляций до $0,64 \pm 0,08$ осц/мин. Ингибирование киназы RIPK1 позволяет сохранить процент клеток, проявляющих кальциевые события, на уровне интактных культур и составляет $60,38 \pm 3,4\%$.

Также к 21 суткам культивирования первичных культур нервных клеток в физиологических условиях формируется спонтанная биоэлектрическая активность, о чём свидетельствуют такие параметры, как среднее количество малых сетевых пачек и среднее количество спайков. Моделирование гипоксии отрицательно влияет на развитие спонтанной биоэлектрической активности (среднее количество малых сетевых пачек в «интактной» культуре составляет $36,12 \pm 4,27$ пачек/10 мин, а в культуре клеток с гипоксией — $15,87 \pm 3,03$ пачек/10 мин; среднее количество спайков в «интактной» культуре — $90,22 \pm 12,32$, а в культуре клеток с гипоксией — $11,58 \pm 4,7$). Однако блокада киназы RIPK1 в условиях гипоксии способствовала сохранению среднего количества малых сетевых пачек ($23,49 \pm 2,14$ пачек/10 мин).

Следовательно, ингибирование киназы RIPK1 в условиях гипоксии приводит к сохранению доли клеток, проявляющих спонтанные кальциевые события, и к частичному сохранению спонтанной биоэлектрической активности.

Ключевые слова: RIPK1; гипоксия; нейрон-глиальные сети.

Как цитировать:

Логинова М.М., Ярков Р.С., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Роль киназы RIPK1 в адаптации нейронально-глиальных сетей в условиях гипоксии // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 508–511. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623467>

Рукопись получена: 17.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Newton K., Dugger D.L., Maltzman A., et al. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury // *Cell Death & Differentiation*. 2016. Vol. 23, N 9. P. 1565–1576. doi: 10.1038/cdd.2016.46
2. Cruz S.A., Qin Z., Stewart A.F.R., Chen H.H. Dabrafenib, an inhibitor of RIP3 kinase-dependent necroptosis, reduces ischemic brain injury // *Neural Regeneration Research*. 2018. Vol. 13, N 2. P. 252–256. doi: 10.4103/1673-5374.226394
3. Zhang Y.-Y., Liu W.-N., Li Y.-Q., et al. Ligustroflavone reduces necroptosis in rat brain after ischemic stroke through targeting RIPK1/RIPK3/MLKL pathway // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2019. Vol. 392, N 9. P. 1085–1095. doi: 10.1007/s00210-019-01656-9

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* М.М. Логинова; адрес: Российская Федерация, 603022, Нижний Новгород, пр-т Гагарина, д. 23; e-mail: pandaagron@ya.ru

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623467>

Role of RIPK1 kinase in neuronal-glia network adaptation under hypoxic conditions

M.M. Loginova^{1, 2*}, R.S. Yarkov, M.V. Vedunova¹, E.V. Mitroshina¹¹ National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;² Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

ABSTRACT

Cerebral hypoxia is a condition characterized by a reduced oxygen supply to tissues that plays a crucial role in the pathogenesis of numerous neurodegenerative diseases. In hypoxia, intracellular signaling cascades are activated, ultimately leading to various forms of nerve cell death. The initiation of necroptosis under hypoxic conditions is governed by PIPK1 kinase, and its inhibition could potentially offer neuroprotection against hypoxic damage [1–3]. Studies investigating the effects of blocking RIPK1 kinase on the activity of neuronal-glia networks are currently lacking. Consequently, RIPK1 kinase constitutes a promising objective for further exploration. Thus, the aim of this work is to examine the part played by RIPK1 kinase in the adjustment of neuronal-glia networks amid hypoxia.

The study focused on primary cultures of nerve cells in the hippocampus of mouse embryos belonging to the C57Bl/6 line. Hypoxia was induced *in vitro* on the 14th day of culturing the nerve cells. The RIPK1 kinase inhibitor was administered 20 minutes prior to, during, and after the hypoxia intervention. After 7 days of the stress induction, the calcium and bioelectrical activity of the neuron-glia networks were evaluated. Calcium activity was assessed via the Oregon Green 488 BAPTA-1, AM (Thermo Fisher Scientific, USA) using a Zeiss LSM 800 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany). The experiments assessed total percentage of oscillating cells in culture, the frequency, and duration of calcium events. The analysis of bioelectrical activity was conducted using the MEA 60 multi-electrode arrays from Multichannel Systems. The registered signal from the arrays was processed through the MEAMAN algorithms in MATLAB (Certificate of State Registration of Computer Program No. 2012611190). The average number of small network packages and spikes was estimated.

Under physiological conditions, spontaneous calcium activity is observed by the 21st day of neuron-glia network development. The percentage of cells exhibiting calcium events is $60.64 \pm 3.68\%$, the frequency of calcium oscillations is 1.52 ± 0.22 osc/min, and the duration is 9.63 ± 0.75 s. During hypoxia modeling, the percentage of cells exhibiting calcium events decreased to $34.77 \pm 4.08\%$, and the frequency of calcium oscillations decreased to 0.64 ± 0.08 osc/min. The inhibition of RIPK1 kinase maintains the percentage of cells exhibiting calcium events at the level of intact cultures, which is $60.38 \pm 3.4\%$.

By the 21st day of culturing primary nerve cell cultures under physiological conditions, spontaneous bioelectrical activity forms. This is indicated by parameters such as the average number of small network clusters and spikes. Hypoxia modeling has a negative impact on the development of spontaneous bioelectrical activity. In the "Intact" group, the average number of small network packs was 36.12 ± 4.27 packs per 10 minutes, while in the cell culture with hypoxia, it was 15.87 ± 3.03 packs per 10 minutes. Additionally, the "Intact" group had an average of 90.22 ± 12.32 spikes, while the cell culture with hypoxia had only 11.58 ± 4.7 spikes. However, blocking RIPK1 kinase during hypoxia preserved the average number of small network packs (23.49 ± 2.14 packs/10 min).

Thus, inhibiting RIPK1 kinase under hypoxic conditions preserves the proportion of cells that exhibit spontaneous calcium events and partially preserves spontaneous bioelectrical activity.

Keywords: RIPK1; hypoxia; neuron-glia networks.

To cite this article:

Loginova MM, Yarkov RS, Vedunova MV, Mitroshina EV. Role of RIPK1 kinase in neuronal-glia network adaptation under hypoxic conditions. *Genes & Cells*. 2023;18(4):508–511. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623467>

ADDITIONAL INFORMATION

Funding sources. This study was supported by the Federal Academic Leadership Program "Priority 2030" of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, and final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Received: 17.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

REFERENCES

1. Newton K, Dugger DL, Maltzman A, et al. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury. *Cell Death & Differentiation*. 2016;23(9):1565–1576. doi: 10.1038/cdd.2016.46
2. Cruz SA, Qin Z, Stewart AFR, Chen HH. Dabrafenib, an inhibitor of RIP3 kinase-dependent necroptosis, reduces ischemic brain injury. *Neural Regeneration Research*. 2018;13(2):252–256. doi: 10.4103/1673-5374.226394
3. Zhang YY, Liu WN, Li YQ, et al. Ligustroflavone reduces necroptosis in rat brain after ischemic stroke through targeting RIPK1/RIPK3/MLKL pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2019;392(9):1085–1095. doi: 10.1007/s00210-019-01656-9

AUTHORS' CONTACT INFO

* M.M. Loginova; address: 23 Gagarin avenue, 603022 Nizhny Novgorod, Russian Federation; e-mail: pandaagron@ya.ru