



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali

Corso di Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata e Medicina Sperimentali

XXXVI ciclo

Settore SD BIO/09

## **Eccitabilità cellulare e ruolo del canale rettificante entrante Kir2.1 in un modello di invecchiamento neurogliale associato all'epilessia**

**Dottoranda: Dott.ssa Sara Spinelli**

**Tutor: Prof.ssa Rossana Morabito** PhD, Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina, Italia.

**Co-tutor: Prof.ssa Alessia Remigante** PhD, Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina, Italia.

**Co-tutor estero: PRIV. - DOZ. Silvia Dossena** PhD, Institute of Pharmacology and Toxicology Paracelsus Medizinische Privatuniversität, Salzburg, Austria.

**Coordinatore: Prof.ssa Nunziacarla Spanò** PhD, Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina, Italia.

**Anno Accademico 2022/2023**

# Indice

<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>7</b>
1.1 Epilessia	7
1.2 Stress ossidativo, aging ed epilessia	8
1.3 Cellule gliali, astrogliosi ed epilessia	13
1.4 Spatial buffering dello ione potassio ( $K^+$ )	15
1.5 Canali Kir	17
1.5.1 Spatial buffering di $K^+$ mediato dai canali Kir	20
1.6 Melatonina	24
<b>2. Obiettivo</b>	<b>28</b>
<b>3. Materiali e metodi</b>	<b>29</b>
3.1 Sali e prodotti chimici	29
3.2 Colture cellulari e trattamenti	29
3.3 Trasfezione cellulare e vettori plasmidici	31
3.3.1 Espressione in oociti	32
3.4 Trascrizione inversa e Real Time PCR (RT-qPCR)	32
3.5 Caratterizzazione del modello di aging	32
3.5.1 Saggio di vitalità cellulare	33
3.5.2 Valutazione dei livelli delle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico	33
3.5.3 Valutazione del contenuto dei gruppi sulfidrilici totali	33
3.6 Tecnica del patch-clamp	34
3.6.1 Set-up del patch-clamp	37
3.6.2 Registrazione della corrente $K^+$	38
3.6.3 Protocollo di stimolazione	39
3.6.4 Voltage-clamp a due elettrodi	40
3.6.5 Acquisizione e analisi dei dati	40
3.7 Determinazione dei livelli di ROS	40

3.8 Valutazione del sistema antiossidante enzimatico endogeno	41
3.8.1 Saggio dell'attività di CAT	41
3.8.2 Saggio dell'attività delle SOD	41
3.9 Co-localizzazione	42
3.10 Valutazione dei livelli di espressione di Kir2.1	42
3.10.1 Western blotting	42
3.10.2 Imaging quantitativo	43
3.11 Analisi statistica	43
<b>4. Risultati</b>	
4.1 Il Kir2.1/KCNJ2 è il canale K <sup>+</sup> a rettificazione entrante predominante nelle cellule U-87 MG	45
4.2 Caratterizzazione del modello di aging	46
4.3 La corrente di Kir2.1 è inibita dall'aging	46
4.4 Lo stress ossidativo a breve e a lungo termine influenza differientemente l'attività del canale Kir2.1	48
4.5 La melatonina ha ripristinato l'attività del canale Kir2.1 nel modello di aging	49
4.6 La melatonina ha prevenuto la formazione di ROS nel modello di aging	51
4.7 La melatonina ha prevenuto l'attivazione del sistema antiossidante endogeno nel modello di aging	52
4.8 La traslocazione della proteina Kir2.1 sulla membrana plasmatica non è stata alterata nel modello di aging	53
4.9 La melatonina ha impedito la riduzione dei livelli della proteina Kir2.1 nel modello di aging	55
<b>5. Discussione</b>	<b>57</b>
<b>6. Conclusioni e prospettive future</b>	<b>60</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>61</b>



## Abstract

L'epilessia è un disturbo cronico cerebrale grave, che colpisce oltre 70 milioni di persone in tutto il mondo. Essa rappresenta un complesso sintomatico caratterizzato da molteplici fattori di rischio, di cui il principale è lo stress ossidativo correlato all'invecchiamento, che favorisce i processi di epileptogenesi e astrogliosi. Le cellule gliali svolgono un ruolo cruciale nell'epilessia, attenuando l'ipereccitabilità neuronale tramite il meccanismo di spatial buffering degli ioni  $K^+$  extracellulari, che vengono trasportati all'interno del sincizio gliale attraverso i canali del potassio a rettificazione entrante (Kir), per poi essere rilasciati nell'ambiente extracellulare in siti a minore concentrazione di  $K^+$ . L'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) potrebbe compromettere la funzione di questi canali, favorendo la comparsa delle crisi convulsive. Al fine di determinare il coinvolgimento dei canali Kir nell'epilessia durante l'invecchiamento, è stata utilizzata la linea cellulare U-87 MG di glioblastoma umano esposte al D-galattosio (D-Gal), che mima un aging naturale portando all'aumento sostanziale dei marcatori dello stress ossidativo, inclusi i ROS e le sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS), nonché alla riduzione dei gruppi sulfidrilici totali, che denotano perossidazione lipidica e ossidazione delle proteine, rispettivamente. Lo screening dei trascritti conosciuti di Kir, effettuato con la tecnica RT-qPCR, ha rivelato che il trascritto Kir più abbondante nelle cellule U-87 MG corrisponde al Kir2.1. L'esposizione al D-Gal ha drammaticamente ridotto la funzione di questo canale, monitorata tramite la tecnica del patch-clamp in configurazione whole cell. Sorprendentemente, il canale Kir2.1 non è un bersaglio diretto dello stress ossidativo, il quale agisce provocando una riduzione dell'espressione della proteina, senza alterarne i livelli di trascrizione e/o la traslocazione sulla membrana cellulare. L'utilizzo della melatonina (Mel), molecola antiossidante con proprietà neuroprotettive, ha prevenuto i cambiamenti ossidativi, ripristinando la densità di corrente del canale Kir2.1. Tutti i risultati ottenuti sono stati riprodotti in diversi sistemi di espressione eterologa (cellule NIH/3T3, HEK293T, HeLa e oociti di *Xenopus laevis*). In conclusione, questo elaborato propone una nuova modulazione del canale Kir2.1 in condizioni di stress ossidativo. L'inibizione ossidativa dell'attività di Kir2.1 nella glia neuronale potrebbe alterare il meccanismo di spatial buffering dello ione  $K^+$  e contribuire al processo di epileptogenesi durante l'invecchiamento. In questo contesto, Mel svolge un ruolo protettivo nei confronti dell'epilessia, rappresentando uno strumento utile a chiarirne i meccanismi molecolari sottostanti e aprendo la strada alla formulazione di nuove strategie terapeutiche che possano contrastare i processi di epileptogenesi e astrogliosi.

Epilepsy is a serious chronic brain disorder affecting over 70 million people worldwide. It represents a symptomatic complex characterized by multiple risk factors, including aging-related oxidative stress, which promotes epileptogenesis and astrogliosis processes. Glial cells play a pivotal role in epilepsy by attenuating neuronal hyperexcitability through the spatial buffering of extracellular  $K^+$  ions, which are transported within the glial syncytium through the inward rectified potassium channels (Kir). Then,  $K^+$  ions are released in the extracellular environment at sites with lower  $K^+$  concentrations. Increased reactive oxygen species (ROS) could compromise the function of these channels and promote seizures.

To determine the involvement of Kir channels in epilepsy during cellular aging, a human glioblastoma cell line (U-87 MG cells) was used. Specifically, cells were exposed to D-galactose (D-Gal), which mimics natural aging leading to a substantial elevation of oxidative stress markers, including ROS and thiobarbituric acid reactive species (TBARS), as well as a reduction of total sulfhydryl groups, denoting lipid peroxidation and protein oxidation, respectively. Screening of known Kir transcripts by RT-qPCR revealed that the most abundant Kir transcript in U-87 MG cells corresponds to Kir2.1. Exposure to D-Gal dramatically reduced the function of this channel, monitored *via* patch-clamp technique in whole cell configuration. Kir2.1 was unlikely a direct target of oxidative stress, but loss of function resulted from a reduction of protein abundance, with no alterations in transcript levels and trafficking to the cell surface. Exposure to melatonin (Mel), an antioxidant molecule with neuroprotective properties, prevented oxidative changes and restored Kir2.1 current density. All obtained findings were reproduced in different heterologous expression systems (NIH/3T3, HEK293T, HeLa, and oocytes of *Xenopus laevis*).

In conclusion, we propose a new modulation of the Kir2.1 channel function under oxidative stress conditions. Oxidative inhibition of Kir2.1 activity in the neuronal glia might alter the extracellular  $K^+$  buffering mechanism and contribute to the epileptogenesis process during aging. In this context, Mel plays a protective role and represents a useful tool to both clarify the molecular mechanisms underlying epilepsy and formulate new therapeutic strategies that could counteract epileptogenesis and astrogliosis processes.

## 1. Introduzione

### 1.1 Epilessia

L'epilessia è uno dei disturbi cronici cerebrali più comuni e gravi al mondo, caratterizzato da una duratura predisposizione a generare crisi epilettiche spontanee, che comportano numerose conseguenze neurobiologiche, cognitive e psicosociali (Aguiar et al., 2012; Fischer et al., 2014; Thijs et al., 2019). L'International League Against Epilepsy (ILAE) ha recentemente definito lo stato epilettico come una condizione derivante dal fallimento dei meccanismi responsabili della cessazione delle crisi epilettiche o dall'avvio di meccanismi che portano a convulsioni anormalmente prolungate (Beghi et al., 2015; Manford, 2017).

Un soggetto può essere considerato affetto da epilessia sulla base di almeno una delle seguenti condizioni:

- due crisi convulsive spontanee che si verificano a distanza di almeno 24 ore l'una dall'altra;
- due crisi convulsive spontanee seguite, nei dieci anni successivi, da un'ulteriore crisi e dalla probabilità di recidiva maggiore del 60%;
- diagnosi di sindrome epilettica (Fisher et al., 2014; Beghi et al., 2015).

La molteplicità di crisi epilettiche comporta conseguenze a lungo termine, tra cui lesioni cerebrali, alterazione delle reti neuronali e morte dei neuroni, a seconda del tipo e della durata delle convulsioni (Trinka et al., 2015). Le sindromi epilettiche sono multifattoriali; ogni caso è definito da un'associazione di fattori clinici, elettrofisiologici, eziologici e co-morbosi (Manford, 2017).

I meccanismi fisiopatologici alla base dell'attività convulsiva non sono pienamente compresi. Le convulsioni derivano principalmente dall'attività anomala dei neuroni corticali, delle cellule gliali e degli assoni della sostanza bianca (Fischer, 1995; Thijs et al., 2019).

L'epileptogenesi è il processo di conversione di un cervello non epilettico in uno in grado di generare convulsioni spontanee e ricorrenti, in seguito allo squilibrio tra l'attività eccitatoria e quella inibitoria dei neuroni a favore della prima, interrompendo la normale elaborazione e l'attività di altre reti neuronali (Fischer et al., 2005; Pitkänen and Engel, 2014). Nonostante ciò, è stato dimostrato che anche l'aumento aberrante dei processi inibitori delle reti neuronali può favorire il meccanismo pro-epilettogenico in alcune circostanze, come nell'assenza tipica (o piccolo male) (Pinault and O'Brien, 2007; Cope et al., 2009) e nell'epilessia limbica nel cervello immaturo (Galanopoulou, 2008; Thijs et al., 2019).

L'epilessia può assumere diverse forme e pertanto, può essere classificata come idiopatica, provocata o sintomatica. L'epilessia idiopatica potrebbe essere causata anche da una predisposizione genetica in cui non vi sono anomalie neuroanatomiche o neuropatologiche significative (Ngugi et al., 2010; Shorvon, 2011).

L'epilessia provocata è prevalentemente causata da specifici fattori ambientali o sistemici, su base genetica o acquisita, per cui l'individuazione di cause intrinseche risulta spesso impossibile. L'epilessia sintomatica può avere una componente genetica o acquisita associata a gravi anomalie anatomiche o patologiche, e/o a caratteristiche cliniche indicative di una malattia o condizione di base (trauma, tumori, infezioni, malformazioni o malattia genetica sistemica) (Aguilar et al., 2012; Shorvon, 2011). Sulla base di queste definizioni, risulta evidente che, in molti casi, la categorizzazione dei pazienti affetti da epilessia è difficoltosa e assolutamente arbitraria.

Vista la complessità degli eventi patologici legati all'epilessia, diversi studi mirano a identificare target potenzialmente responsabili dello sviluppo dell'epilessia. Infatti, neurotrasmettitori (glutammato e acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA)), recettori, canali ionici e l'alterazione delle reti neurali sembrano essere coinvolti nell'epileptogenesi (Shorvon, 2011; Aguilar et al., 2012).

## 1.2 Stress ossidativo, aging ed epilessia

Recentemente dalla letteratura scientifica emergono sempre più prove a favore della correlazione tra epilessia e stress ossidativo. In condizioni fisiologiche, i livelli delle specie reattive sono finemente regolati e coadiuvano processi importanti, quali l'autofagia, la segnalazione chimica, la divisione cellulare e l'apoptosi (Mao and Franke, 2013). La condizione di stress ossidativo può essere definita come uno stato biochimico in cui la produzione di specie reattive supera la capacità antiossidante cellulare, con conseguente danno alle membrane biologiche, ai mitocondri e alle macromolocolcole (Cardenas-Rodriguez et al., 2013).

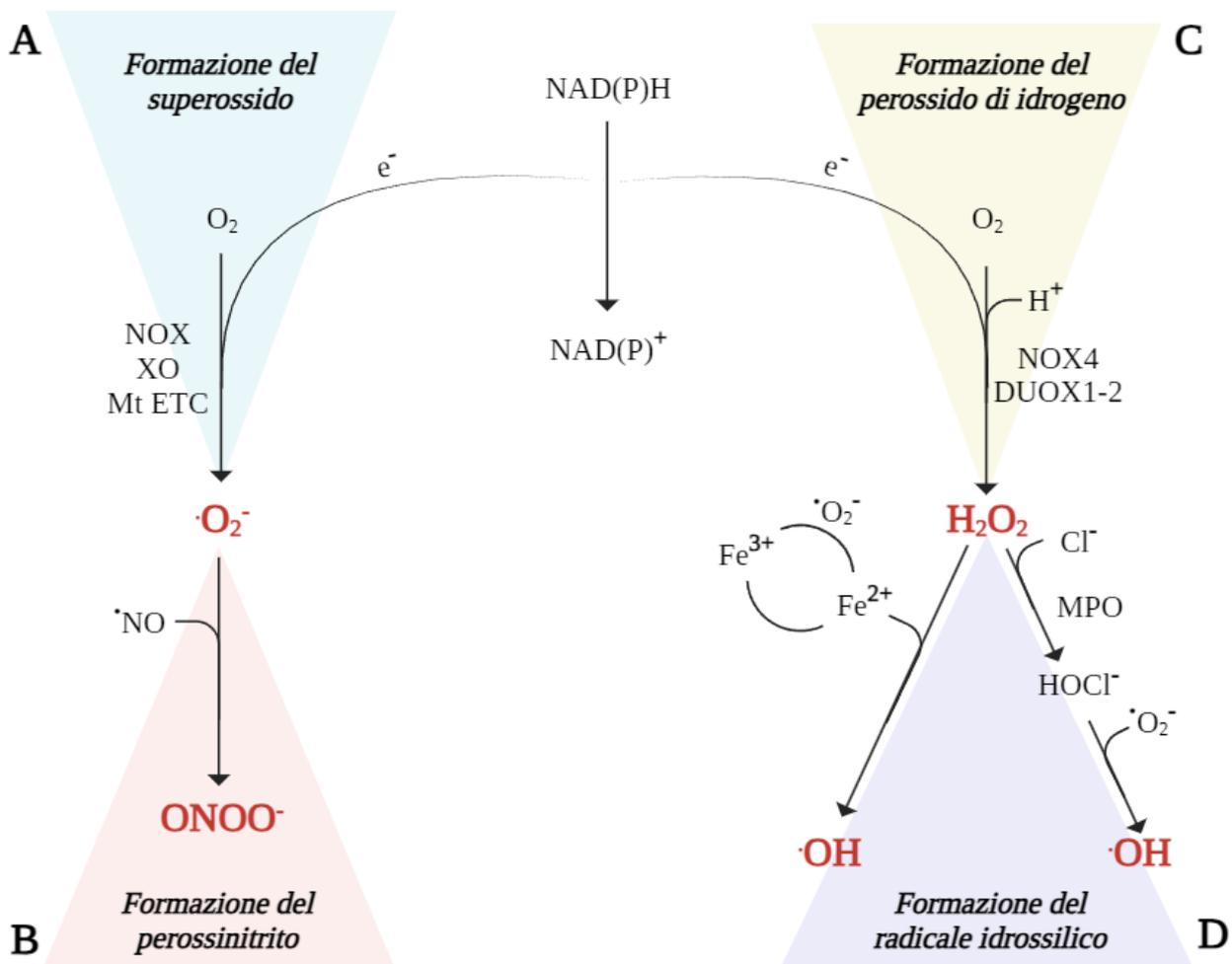
Le specie reattive possono essere classificate come specie reattive dell'ossigeno (ROS), intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) e specie reattive dell'azoto (RNS) e comprendono composti esogeni o endogeni sottoforma di radicali liberi (atomi o gruppi di atomi che fungono da accettori di elettroni e possiedono un elettrone spaiato) o di specie non radicaliche, che possono essere convertite in radicali (Krumova and Cosa, 2016; Halliwell, 2006; Shekh-Ahmad et al., 2019). Le specie più comuni nei sistemi biologici comprendono l'ossigeno singoletto ( $^1\text{O}_2$ ), l'anione superossido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), il perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'ossido nitrico ( $\text{NO}\bullet$ ), il radicale idrossile ( $\bullet\text{OH}$ ) e il perossinitrito ( $\text{ONOO}\bullet$ ), prodotti da reazioni enzimatiche e non enzimatiche come conseguenza naturale del metabolismo aerobico (Turrens, 2003). Difatti, una percentuale infinitesimale di ossigeno consumato dai mitocondri fuoriesce dai complessi I e III della catena di trasporto degli elettroni per formare  $\bullet\text{O}_2^-$  che, a sua volta, può generare ulteriori specie come  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\bullet\text{OH}$  (Figura 1) (St-Pierre et al., 2002; Pearson-Smith and Patel, 2017). La reattività, l'emivita e i target molecolari di queste specie sono illustrate nella Tabella 1.

Specie	Reattività	Emivita	Target
$\cdot\text{O}_2^-$	Bassa	~50 ms	Cluster Fe-S
			$\text{NO}\cdot$
$\cdot\text{OH}$	Alta	$\sim 10^{-9}$ s	Qualsiasi molecola
$^1\text{O}_2$	Bassa	~45 $\mu\text{s}$	Guanina
			Lipidi insaturi
			Amminoacidi
$\text{H}_2\text{O}_2$	Bassa	~1 ms	Tioli
			Metalli
$\text{NO}\cdot$	Bassa	~1 s	Metalli
$\text{ONOO}\cdot$	Alta	~15 $\mu\text{s}$	$\text{CO}_2$
			Amminoacidi
			Metalli

**Tabella 1.** Caratteristiche delle principali specie reattive

La generazione delle specie reattive all'interno di una cellula (Figura 1) si verifica principalmente nei mitocondri o nel citosol e coinvolge diversi partner molecolari (*Fridovich, 1970; Infanger et al., 2006; Kim et al., 2013; Pearson-Smith and Patel, 2017*), di seguito elencati:

- NADPH ossidasi (NOX), a livello della membrana cellulare, che catalizza la reazione di riduzione dell' $\text{O}_2$  a  $\cdot\text{O}_2^-$ ;
- xantina ossidasi citosolica, che catalizza la reazione di riduzione dell' $\text{O}_2$  a  $\cdot\text{O}_2^-$  durante la produzione di acido urico;
- DUOX 1/2 ossidasi, che catalizza la reazione di dismutazione dell' $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- mieloperossidasi, che catalizza la reazione di sintesi dell'ipoclorito ( $\text{HClO}\cdot$ ) a partire da  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Cl}^-$ ;
- formazione di  $\cdot\text{OH}$  a partire da  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  in presenza di  $\text{Fe}^{2+}$  (reazioni di Fenton e Haber-Weiss).
- formazione di  $\cdot\text{OH}$  a partire da  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{HClO}\cdot$ ;
- formazione di  $\text{ONOO}\cdot$  a partire da  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{NO}\cdot$ .



**Figura 1.** Generazione delle specie reattive nell'ambiente intracellulare. **A)** Formazione del superossido:  $\cdot O_2^-$  si forma a partire da  $O_2$ , che riceve un elettrone dagli enzimi NOX e XO ossidasi o dalla catena di trasporto degli elettroni mitocondriali (Mt ETC). **B)** Formazione del perossinitrito:  $\cdot O_2^-$  reagisce spontaneamente con  $\cdot NO$  per formare  $ONOO^-$ . **C)** Formazione del perossido di idrogeno: gli enzimi NOX4 e DUOX1/2 catalizzano la reazione di dismutazione di  $O_2$  in  $H_2O_2$ . **D)** Formazione del radicale idrossilico:  $H_2O_2$  può generare  $\cdot OH$  attraverso la reazione di Haber-Weiss in presenza di metalli di transizione, come  $Fe^{2+}$ , oppure tramite la conversione in  $HOCl^-$  ad opera di MPO, che reagisce con  $\cdot O_2^-$  per formare  $\cdot OH$ .

Sebbene il cervello rappresenti solo il 2% del peso corporeo, in condizioni di riposo consuma circa il 20% dell'ossigeno totale inspirato (Clarke DD and Sokoloff, 1999), a causa dell'elevato tasso metabolico dei neuroni e della necessità di grandi quantità di ATP per mantenere il gradiente ionico necessario a sostenere la normale neurotrasmissione. La produzione di specie reattive nel cervello è direttamente proporzionale all'attività cerebrale (Lukawski and Czuczwar, 2023). Quest'organo è particolarmente vulnerabile al danno ossidativo, a causa dell'abbondanza di mitocondri, dell'elevata richiesta di ossigeno, della scarsa capacità di riparazione, della presenza di alte concentrazioni di acidi grassi polinsaturi e di ferro (Halliwell, 2012;

*Pearson-Smith and Patel, 2017; Hermida-Ameijeiras et al., 2004*). Inoltre, i livelli cerebrali dell'enzima catalasi (CAT), essenziale per la scissione del  $H_2O_2$ , sono più bassi di quelli di altri distretti corporei, come ad esempio il fegato, che presenta una concentrazione di CAT 10 volte maggiore rispetto al cervello (*Mariani et al., 2005; Puttachary et al., 2022*).

La suscettibilità del cervello allo stress ossidativo suggerisce il coinvolgimento di quest'ultimo in diverse patologie a carico del SNC. Un numero crescente di dati derivanti da studi sperimentali e clinici suggerisce che lo stress ossidativo può svolgere un ruolo nella fisiopatologia delle convulsioni, dell'epileptogenesi e dell'epilessia (*Lzi et al., 2018; Fabisiak and Patel, 2022; Łukawski and Czuczwar, 2023*). Difatti, l'aberrante eccitazione neuronale correlata allo stress ossidativo altera diversi processi biochimici e biofisici nel SNC (*Méndez-Armenta et al., 2014; Yang et al., 2020; Yiş et al., 2009; Morimoto et al., 2016; Parson et al., 2022*). Dopo un evento epilettico, i danni ossidativi cellulari che ne conseguono comprendono:

- **perossidazione lipidica.** Lo stress ossidativo determina l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, compromettendo la struttura della membrana e causando alterazioni della permeabilità cellulare, dell'attività delle proteine di membrana e del mantenimento dei gradienti ionici adeguati (*Wong-Ekkabut et al., 2007; Arican et al., 2006*);
- **ossidazione proteica,** che induce modifiche strutturali e funzionali di enzimi chiave, dei recettori dei neurotrasmettitori e dei canali ionici, comportando perdita neuronale e deterioramento cognitivo (*Stadtman, 2001*);
- **danni al DNA nucleare,** testimoniati dall'incremento dei valori dell'8-idrossi-2'-deossiguanosina, biomarcatore chiave del danno ossidativo del DNA (*Geronzi et al., 2018*);
- **alterazione dell'omeostasi del calcio.** Lo stress ossidativo determina un incremento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare, responsabile della modulazione dell'eccitabilità neuronale e della trasmissione sinaptica (*Geronzi et al., 2018*). Di conseguenza, si assiste ad eccitotossicità e morte neuronale indotta da crisi epilettiche (*Martinc et al., 2012; Puttachary et al., 2022*);
- **alterazione della concentrazione degli enzimi antiossidanti.** La difesa enzimatica antiossidante è costituita da una catena neutralizzante di enzimi in grado di ridurre le specie reattive attraverso il buffering degli elettroni spaiati, al fine di prevenire l'accumulo dannoso di ROS (*Parson et al., 2022*). I livelli di superossido dismutasi (SOD) e CAT aumentano significativamente nei modelli di epilessia acuta (*Barros et al., 2007*) e cronica (*Freitas, 2009*). La SOD è responsabile della dismutazione di  $\bullet O_2^-$  in  $H_2O_2$ , il quale viene convertito in acqua e ossigeno da CAT (*Marklund, 1982*). Diversi studi hanno dimostrato che topi knock-out per il gene SOD mostrano una maggiore suscettibilità alle convulsioni e alla degenerazione tissutale, suggerendo che  $\bullet O_2^-$  sia un attore chiave nei cambiamenti cerebrali a lungo termine in seguito ad un episodio convulsivo (*Liang et al., 2012; Liang and Patel, 2004; Parson et al., 2022*);

- **disfunzione mitocondriale.** Diverse tipologie di epilessia sono correlate alla disfunzione mitocondriale, espressa come cambiamento del potenziale della membrana mitocondriale, alterazione dei livelli di NADPH, compromissione della catena di trasporto degli elettroni, mutazioni a carico del DNA mitocondriale e diminuzione della produzione di ATP (*Kann et al., 2005; Fabisiak and Patel, 2022; Puttachary et al., 2022; Chuang et al., 2004; Quintana et al., 2010; Wu et al., 2010; Wojtala et al., 2017*);
- **alterazione del metabolismo cellulare,** con ipermetabolismo cerebrale ictale, caratteristico dei disturbi convulsivi, in cui si osserva un aumento del consumo dell'ossigeno (*Meyer et al., 1966*) e del glucosio (*de Graaf et al., 2004*) in modelli sperimentali di epilessia e nell'uomo (*During et al., 1994; Fabisiak and Patel, 2022*);
- **alterazione del ciclo di Krebs,** mediata dall'inibizione degli enzimi aconitasi e  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi, che comporta un'ulteriore produzione di ROS, esacerbando il danno ossidativo mitocondriale (*Tretter and Adam-Vizi, 2004; Cantu et al., 2009*);
- **alterazione dei livelli di glutammato.** L'eccitotossicità del glutammato, la neuroinfiammazione e lo stress ossidativo sembrano rappresentare la triade caratteristica della neurobiologia dell'epilessia (*Ambrogini et al., 2019*). L'aumento dei livelli di ROS e l'attivazione delle vie infiammatorie determinano la down-regolazione di GLT-1 e GLAST, i trasportatori del glutammato gliale (*Eastman et al., 2019; Pearson-Smith and Patel, 2017*). La conseguente permanenza del glutammato nella fessura sinaptica induce ipereccitabilità delle reti neuronali (*Łukawski and Czuczwar, 2023*);
- **alterazione dei livelli di GABA.** Il contributo del neurotrasmettitore GABA inibitorio all'attività convulsiva nell'epilessia è importante quanto quello del glutammato eccitatorio. Diversi studi hanno riscontrato che le concentrazioni e la densità dei recettori GABA sono ridotte nei pazienti epilettici (*McDonald et al., 1991; Johnson et al., 1992*). L'attività del GABA nella sinapsi è fortemente controllata dalla presenza dei ROS, in particolare  $H_2O_2$  e  $NO\bullet$ , che riducono l'efficienza dei recettori GABA A, con conseguente aumento dell'eccitabilità neuronale (*Accardi et al., 2014; Parson et al., 2022*).

Come dimostrato dalla letteratura scientifica, oltre che conseguenza dell'epilessia, lo stress ossidativo può essere considerato anche un fattore causale della stessa (*Patel, 2004*). Ad esempio, i topi knock-out per il gene SOD2 soffrono di un'estesa disfunzione mitocondriale, che culmina in un aumento dello stress ossidativo, in una diminuzione della produzione di ATP, atassia ed epilessia e morte postnatale precoce (*Liang et al., 2012; Melov et al., 1999; Liang e Patel, 2004; Fabisiak and Patel, 2022*). A conferma di ciò, il trattamento dei topi SOD2 (-/-) con AEOL 112017, una metallo-porfirina lipofila con funzione antiossidante, ha indotto una diminuzione significativa sia della frequenza che della durata delle crisi epilettiche spontanee, suggerendo la

partecipazione attiva dello stress ossidativo nella patogenesi dell'epilessia (*Liang et al., 2012; Pearson-Smith and Patel, 2017*).

Tuttavia, questa relazione sembra avere un effetto diverso in relazione all'età del soggetto. In effetti, le crisi epilettiche sono maggiormente diffuse nei pazienti anziani rispetto a quelli giovani (*Sania, 2010; Hauser, 1992; Wallace et al., 1998*). Per questa ragione, il progressivo invecchiamento della popolazione mondiale può essere associato ad un aumento dell'incidenza dell'epilessia (*Beghi and Giussani, 2018*).

L'invecchiamento è un processo fisiopatologico dinamico e temporale caratterizzato dal graduale accumulo di danni alle cellule, dal progressivo declino funzionale e da una maggiore suscettibilità e vulnerabilità alle malattie, quali il cancro, il diabete di tipo 2 e le malattie cardiovascolari e neurodegenerative (*Finkel et al., 2007; Samani e van der Harst, 2008; Wyss-Coray, 2016*). Esso deriva da cambiamenti molecolari distintivi, definiti "aging hallmarks" che includono danni al DNA (instabilità genomica, accorciamento telomerico, alterazioni epigenetiche e perdita di proteostasi), alterazione metabolica, disfunzione mitocondriale, esaurimento delle cellule staminali e alterazione della comunicazione intercellulare (*López-Otín et al., 2013*). Tutti questi cambiamenti sono correlati all'aumento dello stress ossidativo, sebbene i processi fisiopatologici implicati e i meccanismi biochimici sottostanti non siano stati completamente chiariti (*Cui et al., 2012; López-Otín et al., 2013; Luo et al., 2020*).

La stretta interconnessione tra epilessia e invecchiamento si manifesta nell'incremento dell'eccitabilità dei neuroni ippocampali primari (*Papatheodoropoulos and Kostopoulos, 1996; Kerr and Campbell, 1991*), nella maggiore sensibilità allo stress ossidativo, nell'attivazione delle cellule gliali (*Streit et al., 2004; Sloane et al., 1999; Ogura et al., 1994*) e nella produzione di citochine e dei suoi recettori (*Bodles and Barger, 2004*).

Nel complesso, esiste quindi una relazione intrinseca tra stress ossidativo e invecchiamento, che porta ad un declino della neurogenesi ippocampale e, di conseguenza, a malattie neurodegenerative, inclusa l'epilessia (*Aguiar et al., 2012*).

### **1.3 Cellule gliali, astrogliosi ed epilessia**

Il cervello dei Mammiferi è un organo complesso costituito da neuroni, cellule gliali e più di  $1 \times 10^{14}$  sinapsi (*Liu et al., 2023*). I neuroni sono un gruppo eterogeneo di cellule elettricamente attive, che costituiscono la struttura dei complessi circuiti cerebrali. Le cellule gliali, non neuronali, costituiscono circa la metà di tutte le cellule del SNC, sebbene il rapporto glia/neuroni vari a seconda delle strutture cerebrali e della specie considerate (*Herculano-Houzel, 2014; von Bartheld and Herculano-Houzel, 2016*). Le cellule gliali, che si dividono principalmente in astrociti, microglia, oligodendrociti e cellule precursori degli oligodendrociti (*Allen and Lyons, 2018*), partecipano a molti importanti processi fisiologici come il legame e/o la redistribuzione degli ioni durante l'attività neuronale, la regolazione della funzione dei neurotrasmettitori e la consegna dei substrati energetici ai neuroni (*Ransom et al., 2003; Khaspekov and Frumkina, 2017*). Oltre a queste funzioni, le cellule

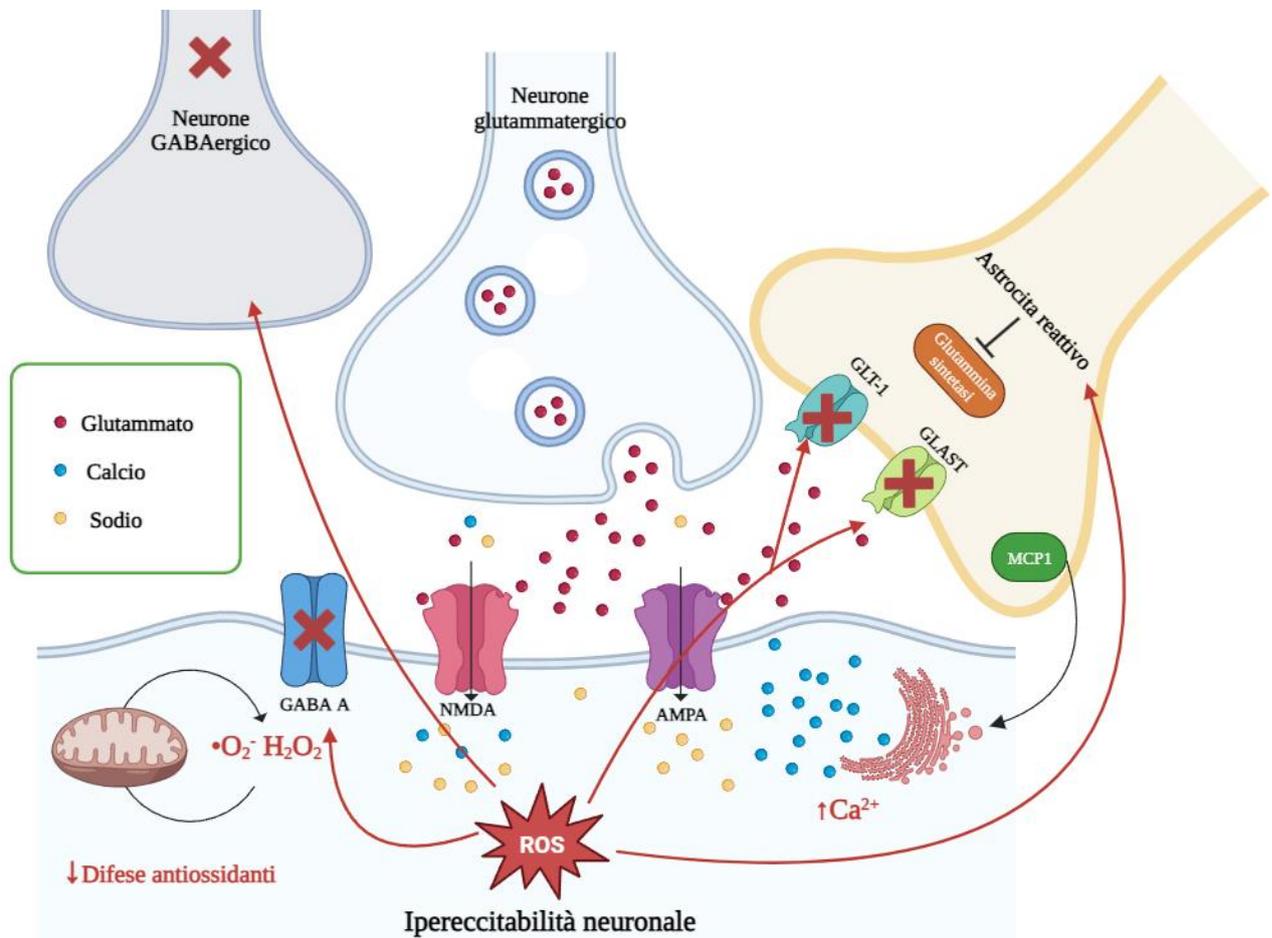
della glia controllano attivamente la trasmissione e la plasticità sinaptica (*Liu et al., 2023*). Infatti, diversi studi hanno dimostrato che i disturbi morfologici e funzionali della glia possono favorire lo sviluppo delle crisi convulsive, tipiche di un fenotipo epilettico (*Halassa and Haydon, 2010; Berner and Steinhäuser, 2016; Dambach et al., 2014*) attraverso, per esempio, alterazioni a livello dei canali e dei recettori di membrana (*de Lanerolle and Lee, 2005; Khaspekov and Frumkina, 2017*).

Temporalmente, è possibile identificare tre stadi principali dell'epilessia:

1. insorgenza della prima crisi epilettica, con aumento dello stress ossidativo e, in particolare, di  $H_2O_2$ ;
2. periodo epileptogenico, o di latenza, durante il quale si verifica un aumento transitorio dell'enzima glutammina sintetasi negli astrociti non reattivi, che converte il glutammato in eccesso in glutammina a livello talamico (*Helms et al., 2006*). In questa fase, la concentrazione di  $H_2O_2$  diminuisce a causa dell'attivazione dei sistemi enzimatici antiossidanti (*Waldbaum et al., 2010*);
3. conversione degli astrociti non reattivi ad astrociti reattivi in seguito al processo di astrogliosi. L'astrogliosi si riferisce ai cambiamenti morfologici, biochimici, genetici e funzionali degli astrociti, che si verificano in risposta a insulti o a lesioni cerebrali (*Ridet et al., 1998; Cerbai et al., 2012*). Questi includono ipertrofia e up-regolazione della proteina acida fibrillare gliale del filamento intermedio (GFAP), alterazioni reversibili nell'espressione genica e pronunciata proliferazione cellulare, con formazione di cicatrici compatte e riarrangiamento permanente dei tessuti (*Li et al., 2008; Robel and Sontheimer, 2016; Sofroniew, 2014*). Gli astrociti reattivi secernono citochine e chemochine come interleuchine (IL-1 $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-10), fattore di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ ), interferoni (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) e la proteina chemioattrattiva-1 (MCP1) (*Feuerstein et al., 1998*).

In seguito alla trasformazione degli astrociti reattivi (Figura 2), l'attività della glutammina sintetasi viene inibita e una quantità eccessiva di glutammato non metabolizzato viene rilasciato nello spazio extracellulare, processo aggravato dall'azione della proteina MCP1, responsabile di un ulteriore aumento del rilascio di glutammato mediato da  $Ca^{2+}$  (*Eid et al., 2013*). Ciò si traduce in ipereccitabilità neuronale e comparsa successiva di convulsioni spontanee ricorrenti (*Puttachary et al., 2022*). La concentrazione di  $H_2O_2$  aumenta in funzione del tempo, a causa del graduale esaurimento dei sistemi antiossidanti (*Sudha et al., 2001*), provocando danni al DNA mitocondriale, con conseguente down-regolazione della sintesi degli enzimi mitocondriali necessari per la fosforilazione ossidativa e deterioramento dei complessi I, III e IV della catena di trasporto degli elettroni (*Gao et al., 2007*). I ROS modificano anche le subunità proteiche dei canali ionici e inattivano i trasportatori del glutammato, contribuendo ad un ulteriore aumento dell'ipereccitabilità neuronale (*Liang and Patel, 2006*). Inoltre, si assiste anche ad una perdita delle popolazioni dei neuroni GABAergici inibitori dell'ippocampo e del giro dentato, provocando una maggiore suscettibilità alle convulsioni (*Rao et al., 2006*). In aggiunta, la produzione astrocitaria eccessiva di IL-6 e TNF- $\alpha$  promuove la demielinizzazione,

la trombosi, l'infiltrazione leucocitaria e la distruzione della barriera emato-encefalica (Feuerstein et al., 1998; Dong and Benveniste, 2001; Puttachary et al., 2022).



**Figura 2.** Meccanismi molecolari coinvolti nella genesi dell'epilessia. In seguito al processo di astrogliosi, l'attività della glutammina sintetasi viene inibita e una quantità eccessiva di glutammato viene rilasciato nello spazio extracellulare, processo aggravato dall'azione della proteina MCP1, responsabile di un ulteriore rilascio di glutammato mediato da  $\text{Ca}^{2+}$ . Le concentrazioni di  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentano, a causa del graduale abbassamento delle difese antiossidanti, provocando danni al DNA mitocondriale e modifiche ossidative a carico dei trasportatori del glutammato (GLT-1 e GLAST) e del GABA (GABA A). Il conseguente aumento dell'ipereccitabilità neuronale, insieme alla perdita delle popolazioni dei neuroni GABAergici inibitori dell'ippocampo e del giro dentato, provoca una maggiore suscettibilità agli episodi convulsivi spontanei ricorrenti.

#### 1.4 Spatial buffering dello ione potassio ( $\text{K}^+$ )

Per comprendere il ruolo cruciale delle cellule gliali e, in particolare, degli astrociti nella patogenesi dell'epilessia è necessario introdurre il concetto di spatial buffering dello ione  $\text{K}^+$ .

Nei primi anni del 1960, Kuffler e collaboratori (*Kuffler et al., 1966*) esaminarono le proprietà della membrana delle cellule gliali della salamandra, scoprendo che quelle appartenenti al nervo ottico erano permeabili quasi esclusivamente allo ione  $K^+$ ; anche minime oscillazioni extracellulari della concentrazione di  $K^+$ , come quelle derivanti dall'attività elettrica indotta da un singolo lampo di luce che colpisce l'occhio, provocavano prontamente una piccola depolarizzazione del potenziale della membrana gliale (*Orkand et al., 1966*). Questi primi esperimenti precedevano di circa due decenni la scoperta dei canali ionici. Nonostante ciò, questi ricercatori formularono un'ipotesi tuttora valida sul ruolo della conduttanza gliale dello ione  $K^+$ : la singola cellula gliale, o una piccola rete di cellule collegate da gap-junction, consentirebbe una redistribuzione spaziale di  $K^+$  da una regione ad elevata concentrazione ad una a minore concentrazione. Quest'ipotesi è nota come tamponamento spaziale dello ione  $K^+$  o spatial buffering (*Orkand, 1980; Olsen and Sontheimer, 2008*).

I protagonisti di questo processo sono gli astrociti, i quali possiedono due tipologie di domini:

- **domini spaziali**, che consentono agli astrociti di occupare un'adeguata superficie cerebrale al fine di stabilire interazioni autonome con coorti di sinapsi circostanti (*Mitterauer, 2010*). Si stima che un singolo astrocita corticale possa avvolgere da 4 a 8 neuroni e prenda contatto con 300-600 dendriti neuronali (*Halassa et al., 2007*). Si può parlare dunque di *isole funzionali di sinapsi*, modulate dai cosiddetti *gliotrasmettitori*, prodotti dai domini funzionali (*Bellot-Saez et al., 2017*);
- **domini funzionali**, costituiti da un'ampia porzione della membrana astrocitaria che invia molteplici processi per avvolgere i terminali presinaptici e post-sinaptici neuronali, formando una sinapsi tripartita (*Bushong et al., 2002; Araque et al., 1999*). Sulla superficie di questi domini sono presenti numerosi canali ionici, citochine, fattori di crescita, glutammato, D-serina e ATP, responsabili della modulazione dell'attività sinaptica e dell'eccitabilità neuronale (*Bellot-Saez et al., 2017*), processo che prende il nome di *gliotrasmissione* (*Verkhratsky and Steinhäuser, 2000; Gadea and López-Colomé, 2001; Bélanger and Magistretti, 2009*).

I neuroni sono immersi in un fluido extracellulare ricco di ioni  $Na^+$  e relativamente povero di ioni  $K^+$ . Le concentrazioni relative di questi cationi sono invertite all'interno delle cellule. I gradienti chimici risultanti da questa diseguale distribuzione ionica sono cruciali per lo svolgimento di molti processi, inclusa la rapida segnalazione elettrica che coinvolge l'afflusso di  $Na^+$  e l'efflusso di  $K^+$  (*Kofuji and Newman, 2004*). Anche modesti efflussi neuronali di  $K^+$  possono determinare cambiamenti considerevoli nella concentrazione di  $K^+$  extracellulare ( $K_o$ ), a causa del volume limitato dello spazio extracellulare del SNC (*Nicholson e Syková, 1998; Kume-Kick et al., 2002*). L'aumento della concentrazione di  $K_o$  ha un impatto considerevole su un'ampia varietà di processi neuronali, come il mantenimento del potenziale di membrana, l'attivazione e l'inattivazione dei canali voltaggio-dipendenti, la trasmissione sinaptica e il trasporto elettrogenico dei neurotrasmettitori (*Kofuji and Newman, 2004*).

Nel cervello, il  $K_o$  è mantenuto a valori prossimi a 3 mM, indipendentemente dalle fluttuazioni dei livelli sierici (Katzman, 1976; Somjen, 1979) sebbene, in seguito ai cambiamenti dell'attività neuronale, si verificano aumenti locali nel  $K_o$ , fino a raggiungere un *plateau* massimo di circa 10-12 mM (Heinemann and Lux, 1977; Connors et al., 1982). Nel caso in cui però, in seguito a disfunzioni omeostatiche, i livelli di  $K_o$  raggiungono valori prossimi a 60 mM, la funzione del SNC può essere gravemente compromessa (Somjen, 2001; Somjen, 2002). Pertanto, non sorprende che nel SNC si trovino diversi meccanismi cellulari per lo stretto controllo della concentrazione di  $K_o$ . L'efficace rimozione del  $K^+$  dallo spazio extracellulare limita l'ipereccitabilità della rete neuronale nella funzione cerebrale normale. La mancata regolazione dei livelli di  $K_o$  è correlata all'insorgenza di condizioni patologiche, tra cui l'epilessia ( $K_o > 15$  mM) (David et al., 2009), la depressione diffusa ( $30 < K_o < 80$  mM) (Somjen, 2002) e la morte cellulare dopo un'ischemia prolungata (Leis et al., 2005; Bellot-Saez et al., 2017).

Generalmente, il buffering gliale di  $K^+$  è mediato da tre meccanismi:

1. l'attività della  $Na^+K^+$ -ATPasi, accompagnata dal rigonfiamento cellulare (dovuto al movimento passivo dell'acqua) e dalla depolarizzazione locale degli astrociti (Kofuji et al., 2002; Steinhäuser et al., 2012);
2. il co-trasporto passivo di  $K^+$  con altri ioni, ad esempio  $Cl^-$ , per garantire l'elettro-neutralità del trasporto. Anche in questo caso, il processo è accompagnato da rigonfiamento cellulare;
3. l'attività dei canali al potassio Kir a rettificazione entrante (Walz, 2000; Chen e Nicholson, 2000), che determinano una redistribuzione spaziale dello ione  $K^+$  indipendente dal consumo di energia, attraverso percorsi intracellulari su lunghe distanze (Kofuji et al., 2002; Olsen and Sontheimer, 2008).

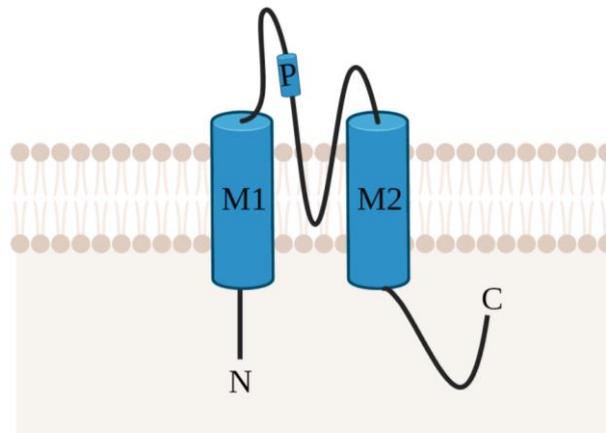
## 1.5 Canali Kir

I canali Kir sono un gruppo di proteine integrali di membrana codificate da 16 geni (da KCNJ1 a KCNJ18) e classificate in sette sottofamiglie (da Kir1.x a Kir7.x), che controllano selettivamente la permeabilità della membrana agli ioni  $K^+$  (Fernandes et al., 2022).

Essi sono espressi in un'ampia varietà di cellule, quali miociti cardiaci (Anumonwo and Lopatin, 2010), neuroni (dell'Orco et al., 2017), cellule del sangue (Colden-Stanfield, 2010), osteoclasti (Wang et al., 2012), cellule endoteliali (Delmoe and Secomb, 2023), cellule gliali (Ohno et al., 2018), cellule epiteliali (Pattnaik and Hughes, 2009), e oociti (Hatcher-Solis et al., 2014), a livello di specifici micro- e macro-domini di membrana, in stretta vicinanza con altre proteine di trasporto (Hibino et al., 2010).

La struttura tridimensionale dei canali Kir è stata studiata tramite la cristallografia a raggi X (Fernandes et al., 2022; Nishida et al., 2007; Inanobe et al., 2007). Tutti i canali Kir possiedono un poro canale, costituito da subunità omo- ed etero-tetrameriche, ognuna delle quali comprende due domini transmembrana (M1 e M2),

separati da una struttura P-loop, all'interno della quale si trova la sequenza responsabile della costituzione del filtro di selettività per  $K^+$  (T-X-G-Y(F)-G) (Zangerl-Plessl et al., 2019). Le porzioni N- e C-terminale, collegate rispettivamente a M1 e M2, formano il dominio citoplasmatico, che agisce da regolatore del gating (Hibino et al., 2010) (Figura 3).



**Figura 3.** Struttura generica dei canali Kir. I canali Kir funzionali sono costituiti da quattro subunità, ognuna delle quali comprende due domini transmembrana (M1 e M2), una struttura P-loop formante il poro e i domini C-terminale e N-terminale citosolici.

I canali Kir contribuiscono alla regolazione dell'eccitabilità e del volume cellulare, agendo come diodi che trasportano gli ioni  $K^+$  all'interno della cellula (Akyuz et al., 2022). Le correnti dei canali Kir sono state isolate per la prima volta nel 1949 da Bernard Katz (Katz, 1949). Egli identificò nel muscolo scheletrico la presenza di una corrente  $K^+$  che si comportava in modo anomalo rispetto a quella a rettificazione uscente presente nell'assone del calamaro (González et al., 2012): il movimento degli ioni  $K^+$  non seguiva la cinetica di Hodgkin-Huxley (Brodwick, 1983), ma dipendeva maggiormente dal gradiente elettrochimico del  $K^+$ , definito come il potenziale di membrana ( $E_m$ ) sottratto del potenziale di equilibrio di  $K^+$  ( $E_k$ ). Pertanto, in condizioni fisiologiche, i canali di Kir generano grandi correnti  $K^+$  a rettificazione entrante a potenziali più negativi rispetto a  $E_k$  (Sakmann and Trube, 1984; Hibino et al., 2010). Non tutti i canali Kir mostrano lo stesso grado di rettificazione, per cui è possibile distinguere:

- rettificatori forti, come Kir2.x e Kir3.x, espressi nelle cellule eccitabili. Questi canali consentono alle cellule di accumulare al loro interno ioni  $K^+$  durante la genesi del potenziale d'azione, facilitando l'entrata di  $K^+$  durante la fase di iperpolarizzazione. Inoltre, contribuiscono alla ripolarizzazione e alla stabilità di  $E_m$  a riposo (Zangerl-Plessl et al., 2019; Hager et al., 2022);
- rettificatori deboli, come Kir1.x, Kir4.x e Kir5.x, che regolano le concentrazioni di  $K_o$  per permettere il funzionamento di diversi co-trasportatori ionici (Zangerl-Plessl et al., 2019; Hager et al., 2022).

Questa plasticità funzionale è indispensabile per garantire il mantenimento dell'omeostasi di  $K^+$  in relazione alle esigenze tissutali, per cui l'espressione dei canali Kir varia a seconda delle cellule considerate (*Hager et al., 2022*):

- le cellule neurali esprimono maggiormente Kir2.x, Kir3.x, Kir4.x e Kir5.x;
- le cellule renali esprimono maggiormente Kir4.x, Kir5.x e Kir6.x;
- le cellule pancreatiche esprimono Kir5.x e Kir6.x;
- i cardiomiociti esprimono maggiormente Kir2.x, Kir3.x e Kir6.x.

Essendo privi del segmento S4, conservato nei canali voltaggio-dipendenti, i canali Kir non sono sensibili al voltaggio della membrana e la loro regolazione è il risultato del blocco del flusso di  $K^+$  verso l'esterno da parte di cationi bivalenti intracellulari e di altre molecole, che prendono parte ai processi di gating mediati dal dominio citoplasmatico (*Hibino et al., 2010; Fernandes et al., 2022*):

- $Mg^{2+}$  intracellulare e poliamine, che creano un blocco fisico del canale Kir in seguito alla loro interazione con i residui localizzati nel poro canale (*Matsuda et al., 1987*), che si verifica quando  $E_m$  è maggiormente depolarizzato rispetto a  $E_k$ . Il blocco mediato da  $Mg^{2+}$ , insieme ad altri meccanismi intrinseci di gating, è il diretto responsabile della rettificazione entrante della corrente (*Hibino et al., 2010; Akyuz et al., 2022*);
- fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato, che si lega al dominio C-terminale, garantendo la corretta funzionalità della maggior parte dei canali Kir (*Takano and Kuratomi, 2003*);
- ATP intracellulare, che regola la funzionalità dei canali  $K_{ATP}$  attraverso l'interazione diretta con le regioni citoplasmatiche di Kir6.2 (*Antcliff et al., 2005; Tsuboi et al., 2004*);
- concentrazione di  $K_o$ . La conduttanza di tutti i canali Kir, ad eccezione di Kir7.1 (*Döring et al., 1998*), aumenta parallelamente alla concentrazione di  $K_o$  (*Lopatin and Nichols, 1996*). Questa proprietà implica che la permeabilità ionica attraverso i canali di Kir non segua la teoria di Goldman-Hodgkin-Katz, ma il modello del “poro di multi-ione”, secondo cui un canale può essere occupato allo stesso tempo da più ioni (*Hille and Schwarz, 1978; Hibino et al., 2010*);
- processi fosforilativi mediati da proteine chinasi (PKA e PKC), che possono determinare un aumento o una diminuzione dell'attività del canale Kir (*Shi et al., 2007*).

Funzionalmente, i canali Kir sono classificati in:

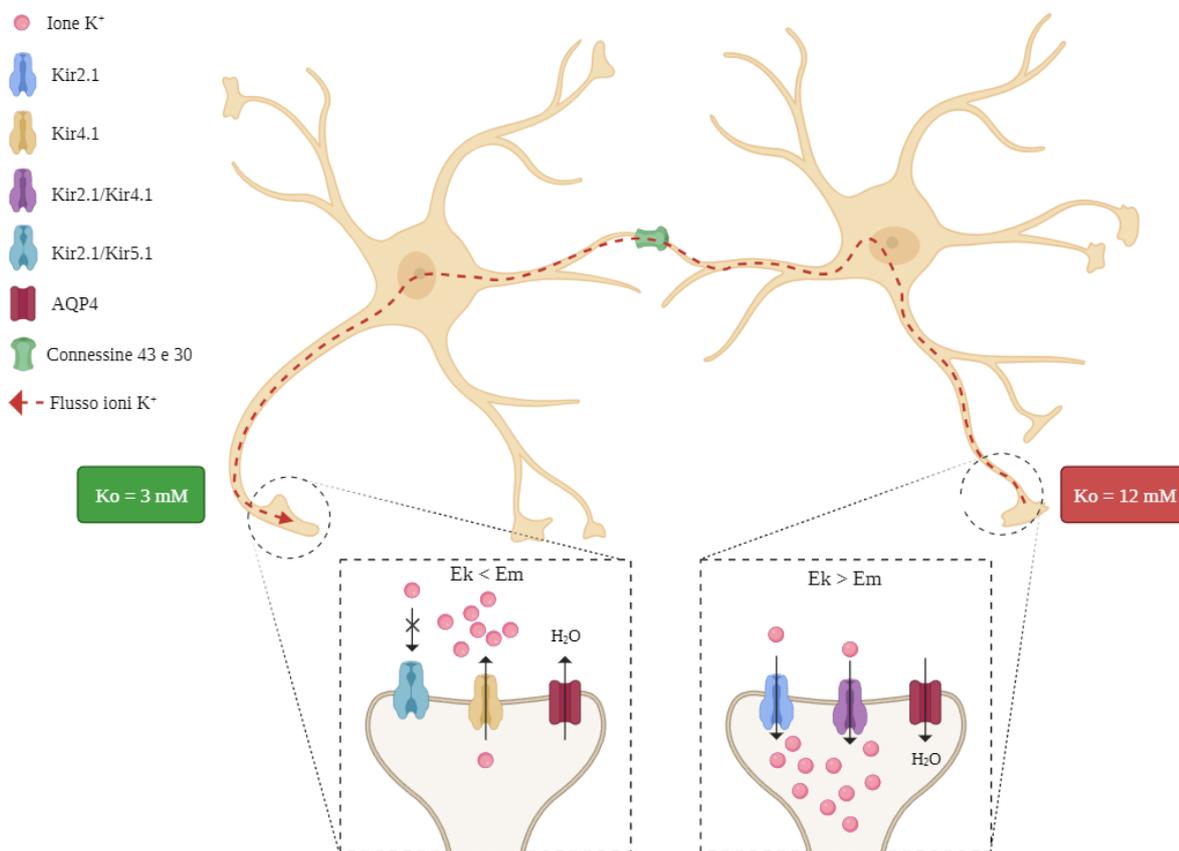
- canali Kir classici (Kir2.x)
- canali Kir associati a proteine G (Kir3.x)

- canali Kir ATP-sensibili (Kir6.x)
- canali di trasporto (Kir1.x, Kir4.x, Kir5.x e Kir7.x) (*Hibino et al., 2010*).

In questo elaborato, l'attenzione è rivolta ai canali Kir classici, in quanto diversi studi hanno ipotizzato un ruolo di primaria importanza di alcuni canali Kir2.x gliali nell'epileptogenesi, processo probabilmente correlato ad alterazioni del meccanismo di spatial buffering di  $K^+$  (*Akyuz et al., 2022; Shen et al., 2007; Haj-Yasein et al., 2011; Howe et al., 2008*). A livello delle cellule gliali, in particolare degli astrociti, i canali Kir possono essere omo-merici (Kir2.1 e Kir4.1) o etero-merici (Kir2.1/Kir4.1), assumendo fenotipi di rettificazione differenti, deputati al corretto flusso di ioni  $K^+$  (*Fakler et al., 1996; Kofuji et al., 2002*). Il Kir4.1 omo-merico è un rettificatore debole, mentre l'associazione con il Kir2.1 lo rende un rettificatore forte. Dunque, nei siti ad alta attività neuronale, il Ko in eccesso viene trasportato all'interno degli astrociti attraverso i canali Kir2.1 e Kir2.1/Kir4.1 fortemente rettificanti, mentre il  $K^+$  verrebbe rilasciato nuovamente nello spazio extracellulare in siti a minore concentrazione attraverso la rettificazione debole di Kir4.1, in combinazione con il silenziamento dei canali Kir2.1, mediato dal co-assemblaggio al Kir5.1 (Figura 4) (*Derst et al., 2001; Brasko and Butt, 2018*). Ciò rende il Kir2.1 il principale regolatore omeostatico di Ko negli astrociti (*Bellot-Saez et al., 2017*).

### 1.5.1 Spatial buffering di $K^+$ mediato dai canali Kir

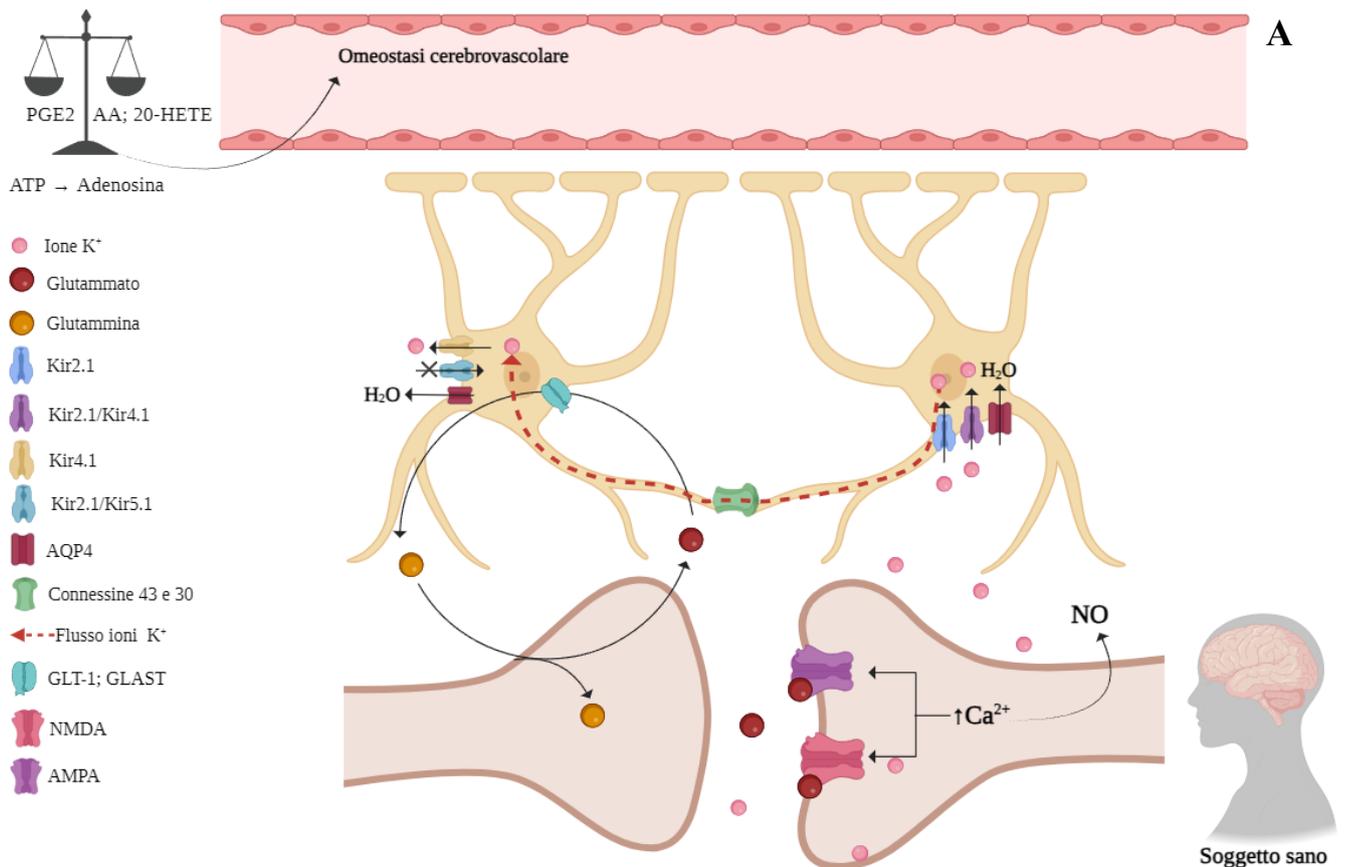
Il buffering del  $K^+$  mediato dai canali Kir è estremamente veloce e guidato dalla differenza tra  $E_m$  del sincizio gliale (dotato di numerose gap-junction) ed  $E_k$  locale (*Kofuji et al., 2002*). Gli ioni  $K^+$  entrano negli astrociti in prossimità dei siti con maggiore concentrazione di Ko, a livello dei quali  $E_m$  a riposo è più negativo rispetto a  $E_k$ , a causa del gradiente elettrico che si instaura tra l'esterno e l'interno del sincizio gliale. L'efflusso di  $K^+$  si verifica in siti distanti da quelli di ingresso, che possiedono concentrazioni inferiori di Ko (Figura 4). Difatti, l'ingresso di Ko provoca una depolarizzazione locale della membrana che si propaga elettrotonicamente nelle cellule gliali, generando una forza trainante che induce la fuoriuscita di  $K^+$  dal sincizio. Dopo il buffering, quindi, il guadagno netto di  $K^+$  da parte delle cellule gliali è basso e ciò previene il rigonfiamento cellulare (*Steinhäuser et al., 2012*).

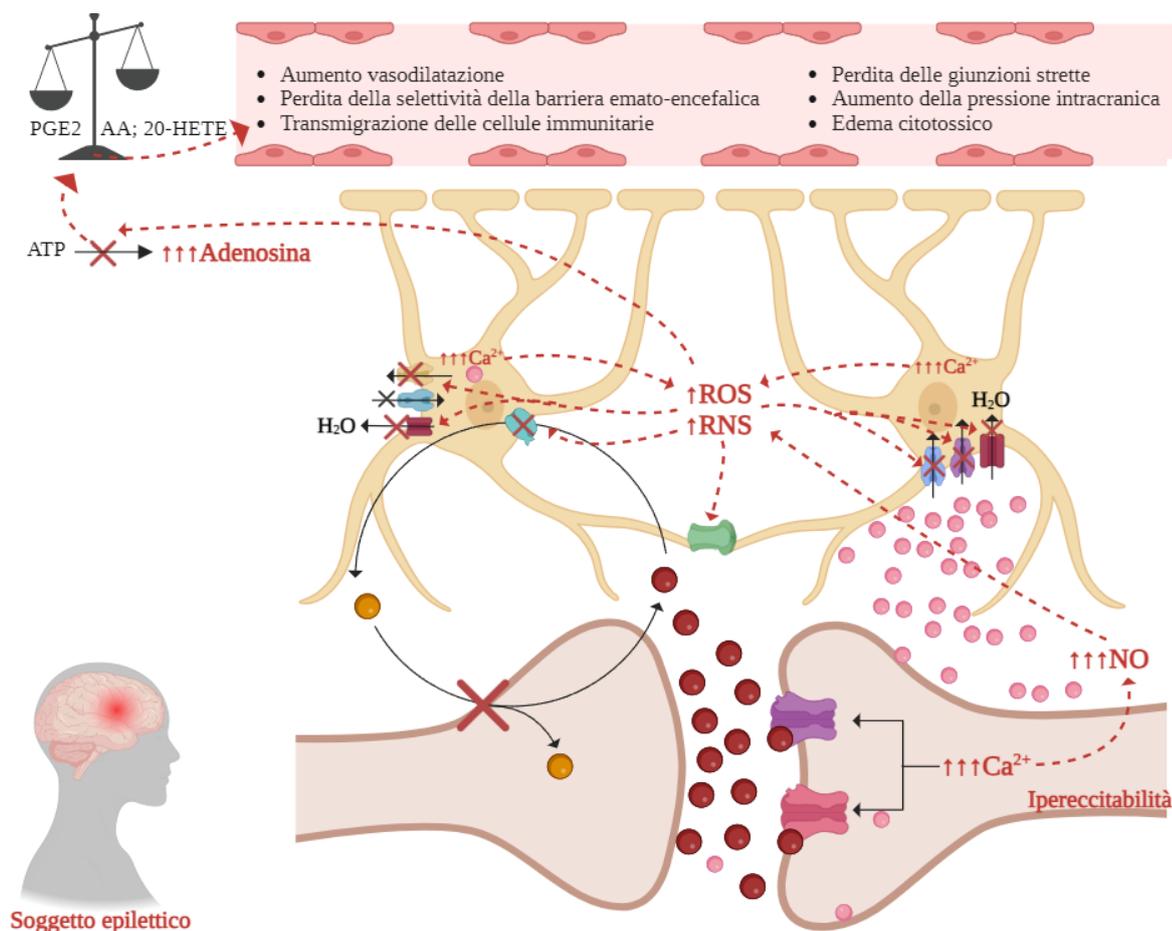


**Figura 4.** Meccanismo dello spatial buffering di  $K^+$  mediato dai canali Kir. L'incremento dell'attività neuronale determina l'aumento della concentrazione di  $K_o$  (12 mM), portando i valori di  $E_k$  a -60 mV nella fessura sinaptica. Dall'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz si ricava il potenziale di membrana ( $E_m$ ), pari a circa -75 mV, garantito dall'isopotenzialità del sincizio gliale.  $E_k$  risulta maggiore di  $E_m$ , promuovendo l'entrata degli ioni  $K^+$ , che si muoveranno all'interno del sincizio sfruttando le gap-junction, fino alla zona a più bassa concentrazione di  $K_o$  (3 mM). A questo punto,  $E_k$  risulta minore di  $E_m$  e gli ioni  $K^+$  verranno riversati nell'ambiente extracellulare.

L'efficienza del buffering spaziale dipende dalla corretta distribuzione e funzione dei canali Kir2.1 e Kir4.1 astrocitari, dalla presenza e integrità delle gap-junction (connexine 43 e 30) e dalla presenza delle acquaporine, in particolare l'acquaporina 4 (AQP4) (Kovács *et al.*, 2012). A conferma di ciò, gli astroцитi nell'ippocampo sclerotico di pazienti con epilessia del lobo temporale esprimono fenotipi immuno-istochimici e funzionali insoliti, con alterazione delle giunzioni comunicanti, diminuzione dell'espressione dei canali Kir (Steinhäuser *et al.*, 2012) e alterazione della distribuzione di AQP4 (Kim *et al.*, 2010). Le conseguenze di queste disfunzioni sfociano in un alterato equilibrio osmotico, in un'aumentata eccitabilità neuronale e nel disturbo del traffico dei substrati metabolici, compromettendo così la sopravvivenza neuronale. Al contempo, la diminuita espressione dei trasportatori del glutammato e della glutammina sintetasi potrebbe indurre l'incremento dei livelli di glutammato nell'ambiente extracellulare, comportando l'aberrante eccitabilità del SNC tipica dello

stato epilettico (Kovács *et al.*, 2012). Le crisi convulsive sono associate, inoltre, ad un incremento della concentrazione dell'ossido nitrico (NO) e dei ROS. Lo stress ossidativo-nitrosativo altera l'equilibrio tra le molecole vasodilatatrici (PGE2) e quelle vasoconstrictrici (AA e 20-HETE), incrementando il flusso sanguigno cerebrale. Inoltre, l'aumentato catabolismo astrocitario dell'adenosina altera tutte le funzioni adenosino-mediate, quali la soppressione della neurotrasmissione e il potenziamento della vasodilatazione (Kovács *et al.*, 2012) (Figura 5).



**B**

**Figura 5.** Spatial buffering dello ione K<sup>+</sup> in soggetti sani (A) o epilettici (B). **A)** Fisiologicamente, l'attività elettrica neuronale porta all'aumento della concentrazione di K<sup>+</sup>, rapidamente contrastato dal buffering astrocitario dello ione K<sup>+</sup>, mediato dai canali Kir2.1 e Kir4.1. Gli ioni K<sup>+</sup> si muovono all'interno del sincizio gliale, grazie alla presenza delle gap-junction, fino a raggiungere zone a minore concentrazione di K<sup>+</sup>, a livello delle quali vengono riversati gli ioni K<sup>+</sup> tramite i canali Kir4.1; questo processo è coadiuvato dal silenziamento del Kir2.1, mediante l'associazione con Kir5.1. Al contempo, il glutammato rilasciato nella fessura sinaptica si lega ai recettori NMDA e AMPA, la cui trasduzione del segnale porta all'aumento della concentrazione di Ca<sup>2+</sup> e alla formazione di NO. Quest'ultimo, insieme all'adeguato livello di adenosina e al corretto bilancio di molecole vasodilatatrici (PGE2) e vasoconstrictrici (AA e 20-HETE), assicura il mantenimento dell'omeostasi cerebrovascolare. **B)** In un soggetto epilettico, l'alterazione del meccanismo di spatial buffering si traduce in ipereccitabilità indotta dall'eccessiva presenza di glutammato nella fessura sinaptica, che porta ad un aumento aberrante della concentrazione di Ca<sup>2+</sup> nell'elemento post-sinaptico, con conseguente innalzamento di NO. Questo processo, insieme con l'aumento della concentrazione di Ca<sup>2+</sup> astrocitario in seguito al processo di astrogliosi, porta all'incremento dello stress ossidativo-nitrosativo, che colpisce i canali ionici, i trasportatori, le gap-junction e l'equilibrio tra PGE2 e AA/20-HETE, comportando l'aumento della vasodilatazione, la perdita dell'integrità della barriera ematoencefalica e la morte neuronale.

È chiaro, dunque, che il danno ossidativo neurale è un componente cruciale nella patogenesi e nella progressione dell'epilessia e le terapie atte a ridurre lo stress ossidativo potrebbero migliorare i danni tissutali e modificare favorevolmente il decorso clinico di questa patologia (Costello and Delanty, 2004). A tal proposito, una particolare attenzione è stata rivolta alla melatonina (Mel), molecola la cui azione antiossidante

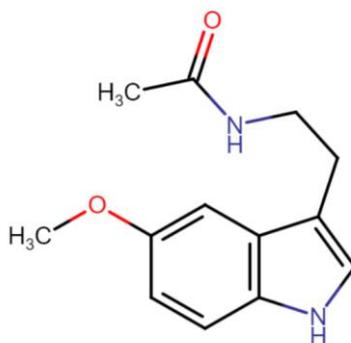
è dieci volte più potente rispetto a quella di altre sostanze (vitamine C ed E, glutazione e NADH) (*Brzeczek et al., 2016; Tan et al., 2003; Gitto et al., 2001*).

## 1.6 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metossiindolamina) è una piccola molecola indolica anfifilica che regola diversi processi fisiologici, garantendo l'equilibrio omeostatico dell'intero organismo (*Tan et al., 2015; Chitimus et al., 2020*).

Essa è prodotta principalmente dalla ghiandola pineale, ma sono stati identificati altri siti di produzione extra-pineali, come il tratto gastrointestinale, i follicoli piliferi epiteliali, la pelle, la retina, le ghiandole salivari, le piastrine, i linfociti e il cervello in via di sviluppo (*Izykowska et al., 2009; Mahmood, 2018*). Tutti questi distretti corporei partecipano al raggiungimento dei livelli sierici fisiologici di Mel, che variano durante il giorno da 5 a 200 pg/mL (*Hickie et al., 2011*).

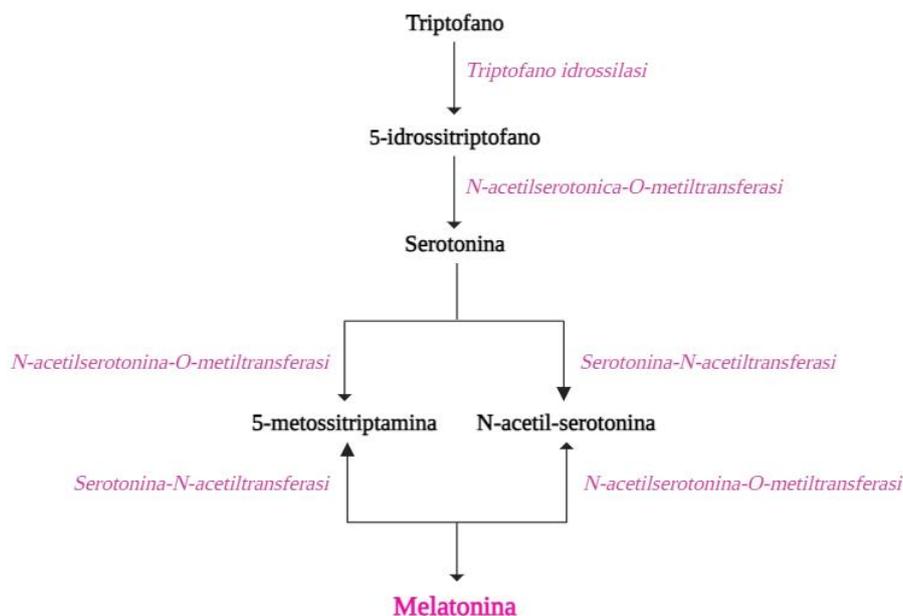
Strutturalmente, Mel è costituita da un anello eterociclico indolico e due catene laterali (Figura 6). L'anello indolico è ricco di elettroni ad elevata reattività e stabilità di risonanza, necessari per eliminare i radicali liberi (*Poeggeler et al., 1993*). Le catene laterali, rappresentate da un gruppo 5-metossi e uno 3-ammide, sono collegate all'anello indolico in posizione C5 e C3, rispettivamente; esse contribuiscono all'attività di scavenging (soprattutto di  $\bullet\text{OH}$ ) e attenuano la tossicità di Mel (*Tan et al., 2002*).



**Figura 6.** Struttura di Mel.

Nei Mammiferi, il precursore iniziale della sintesi di Mel è il triptofano che, grazie ad una reazione di idrossilazione, viene convertito in 5-idrossitriptofano ad opera dell'enzima triptofano idrossilasi. La successiva reazione di metilazione converte il 5-idrossitriptofano in serotonina che, in seguito al trasferimento di un gruppo acetilico e metilico mediato rispettivamente dagli enzimi serotonina-N-acetiltrasferasi e N-acetilserotonina-O-metiltrasferasi, viene convertita in Mel (Figura 7). La serotonina-N-acetiltrasferasi è

l'enzima che limita la velocità del processo di sintesi ed è regolato dal ritmo circadiano, per cui Mel viene maggiormente secreta nelle ore notturne (Tan et al., 2015).



**Figura 7.** Sintesi di Mel.

Rispetto al processo di sintesi, il metabolismo di Mel è molto complesso e non è stato del tutto chiarito. La melatonina può essere metabolizzata tramite un processo enzimatico, pseudo-enzimatico o attraverso la sua interazione con ROS e NOS, generando diversi composti, tra cui la 6-idrossimelatonina (Tan et al., 2007). La regolazione di alcuni processi omeostatici dell'organismo non è, quindi, soltanto affidata a Mel, ma anche all'azione dei suoi metaboliti.

La melatonina svolge un ruolo integrativo e orchestra complessi processi di segnalazione grazie al controllo del ciclo sonno/veglia e dell'asse ipotalamo/ipofisi, con effetti vasomotori, immunostimolanti, endocrini, anti-lipidici, anti-apoptotici e regolatori del signaling dell'ossido nitrico (Hardeland et al., 2011; Mahmood, 2018). Inoltre, ha un'azione anti-eccitatoria, agendo su canali ionici e sistemi di neurotrasmissione, in virtù della sua attività antiossidante 10 volte più potente rispetto a quella di altre molecole antiossidanti (vitamine C ed E, glutazione e NADH), sia *in vivo* che *in vitro* (Brzeczek et al., 2016; Tan et al., 2003; Gitto et al., 2001).

Alla luce dei numerosi ruoli svolti da Mel, questa molecola può essere considerata pleiotropica. Difatti, i recettori melatonergici sono ubiquitari nell'organismo e ciò contribuisce a spiegare le sue azioni endo-, para-, auto- e intracrine (Tan et al., 2003). La pleiotropia di Mel si esplica essenzialmente attraverso quattro differenti meccanismi:

- legame ai recettori di membrana. Nei Mammiferi sono stati identificati due tipi di recettori di membrana, accoppiati a proteine G: MT1 e MT2 (*Luchetti et al., 2010*). Il legame di Mel a questi recettori induce la produzione di secondi messaggeri che regolano i processi fosforilativi e l'attività funzionale dei canali  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  (*Vanecek, 1998*);
- legame ai recettori nucleari. La natura lipofila di Mel permette il suo passaggio attraverso la membrana plasmatica e il legame ai recettori nucleari, appartenenti alla famiglia RZR/ROR. Questi recettori sono ubiquitari e hanno un ruolo nel processo di sviluppo del SNC, nel controllo dei ritmi circadiani e nel differenziamento/proliferazione cellulare;
- legame a proteine intracellulari, come la calmodulina. Questo legame influenza l'omeostasi del  $Ca^{2+}$ , i processi fosforilativi a carico della  $Ca^{2+}$ -calmodulina chinasi e la funzione della pompa  $Ca^{2+}$ -ATPasi (*Vanecek, 1998*);
- Azione di scavenging indipendente dai recettori (*Mahmood, 2018*).

La melatonina previene i danni indotti dallo stress ossidativo a livello molecolare, cellulare, dei tessuti, degli organi e sistematico attraverso meccanismi diretti e indiretti (*Reiter et al., 1999; Tan et al., 2002*), che comprendono lo scavenging dei radicali liberi, la stimolazione degli enzimi antiossidanti endogeni e il miglioramento dell'efficienza di altri antiossidanti (*Reiter et al., 2016; Poeggeler et al., 1993; Galano et al., 2018; Chitimus et al., 2020*). La particolarità di questa molecola risiede nel fatto che anche i prodotti che derivano dalle reazioni con i ROS conservano l'attività antiossidante che, in alcuni casi, è più potente di quella della stessa Mel (*Tan et al., 2014; Galano et al., 2015*). Un'altra importante caratteristica di Mel è che, in condizioni di stress ossidativo moderato, la sua sintesi viene accelerata affinché l'organismo possa prepararsi ad affrontare gradi di stress più severi; pertanto, essa può essere identificata come molecola inducibile (*Tan et al., 2015*).

Il meccanismo alla base dell'azione scavenging non è stato completamente chiarito; tuttavia, numerose ipotesi sono state postulate:

- donazione di elettroni, al fine di neutralizzare le specie radicaliche;
- trasferimento di idrogeno alle specie radicaliche;
- formazione di un complesso con la specie ossidante;
- sostituzione di un atomo di idrogeno con la molecola ossidante;
- nitrosazione della specie ossidante;
- capacità di riparare le biomolecole precedentemente ossidate (*Tan et al., 2002*).

Un deficit di Mel o dell'espressione dei suoi recettori è correlato all'insorgenza di diverse patologie, come malattie cardiovascolari, metaboliche, neurodegenerative (morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson,

schizofrenia, epilessia), disturbi del turnover osseo, disturbi infiammatori e immunitari, autismo e cancro (*Sun et al., 2016; Lv et al., 2020; Gunata et al., 2020; Zheng et al., 2022; Hardeland, 2018; Lalanne et al., 2021; Talib, 2018*).

La somministrazione di Mel esogena può attenuare la produzione di specie radicaliche nelle patologie sopracitate, tra cui l'epilessia, riducendo l'insorgenza e la frequenza delle crisi convulsive (*Mareš et al., 2013*). Difatti, alte concentrazioni di Mel (10-100 mg/Kg o 100  $\mu$ M) riducono la morte neuronale, la formazione di malondialdeide e l'attivazione delle cellule gliali nel fenotipo epilettico, in virtù della sua azione antiossidante e antiinfiammatoria (*de Lima et al., 2005; Vishnoi et al., 2016*).

## 2. Obiettivo

L'epilessia è una patologia complessa con una sintomatologia caratterizzata da molteplici fattori di rischio, di cui il principale è l'invecchiamento (*Heuser et al., 2014; Thijs et al., 2019*).

La maggiore incidenza degli episodi convulsivi nei soggetti anziani può essere attribuita ai processi di epileptogenesi e di astrogliosi, entrambi correlati all'aumento dello stress ossidativo (*Beghi and Giussani, 2018*). Difatti, l'ipereccitabilità neuronale e le lesioni ossidative prodotte da un'eccessiva produzione di radicali liberi possono avere un ruolo sia nell'eziologia che nella progressione dell'epilessia (*Geronzi, et al., 2018; Lukawski and Czuczwar, 2023*). Dunque, comprendere il ruolo dello stress ossidativo nell'epileptogenesi è di fondamentale importanza per delineare nuove efficaci strategie terapeutiche.

Allo stato attuale, l'obiettivo farmacologico primario del controllo dell'epilessia è la soppressione dell'attività convulsiva in seguito allo sviluppo della patologia. L'efficacia di tale strategia si attesta intorno al 66%, ma la prognosi a lungo termine rimane comunque infausta (*Thijs et al., 2019*).

Considerando che la popolazione mondiale è in costante crescita, con un parallelo aumento del numero di soggetti anziani, l'epilessia rappresenterà, in futuro, un enorme onere sociale, sanitario ed economico; è necessario dunque agire sulla prevenzione degli eventi epileptogenici ed individuare i target molecolari implicati nel suo sviluppo (*Aguilar et al., 2012*).

Sebbene i meccanismi alla base dell'epileptogenesi non siano ancora stati del tutto chiariti, il ruolo dei canali ionici come regolatori dell'eccitabilità cellulare ha guadagnato sempre più attenzione. A questo proposito, prove emergenti evidenziano la potenziale implicazione dei canali Kir2.1 negli eventi epileptogenici, a causa del loro ruolo cruciale nei meccanismi sottostanti il mantenimento dello spatial buffering dello ione K<sup>+</sup> (*Akyuz et al., 2022*).

Sulla base di tali evidenze, gli obiettivi del presente elaborato sono:

- stabilire se lo stress ossidativo correlato all'invecchiamento può alterare la funzione, l'espressione o la traslocazione dei canali Kir2.1 in cellule di glioblastoma umano (U-87 MG) esposte al D-Galattosio (D-Gal), al fine di creare un modello di aging neurogliale simile a quello naturale. Difatti, diversi studi hanno dimostrato che il modello di invecchiamento naturale indotto da D-Gal può essere considerato uno strumento prezioso per lo studio dei meccanismi sottostanti l'aging, sia *in vivo* che *in vitro* (*Azman and Zakaria, 2019; Hou et al., 2019; Shwe et al., 2017*).
- valutare il potenziale effetto protettivo di Mel, a concentrazioni farmacologiche (*Morabito et al., 2019*), nel prevenire i cambiamenti indotti dallo stress ossidativo.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Sali e prodotti chimici

La melatonina (CAS Number: 73-31-4), il D-(+)-Galattosio (CAS Number: 59-23-4), il D-Mannitolo (CAS Number: 69-65-8), il *tert*-butil idroperossido (TBHP, CAS Number: 75-91-2) e la clorammina T (Cl-T, CAS Number: 149358-73-6) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. Il bloccante di Kir4.1 2-(2-Bromo-4-isopropylphenoxy)-N-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl) acetamide (VU0134992, CAS Number: 755002-90-5) (Kharade *et al.*, 2018) e l'inibitore di Kir2.1 N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-1-naphthalenemethanamine hydrochloride (ML133, CAS Number: 1222781-70) sono stati acquistati da Tocris (Bio-technie, Minneapolis, MN, USA). Le soluzioni madre sono state preparate in dimetilsolfossido (DMSO) e conservate al riparo da fonti luminose.

#### 3.2 Colture cellulari e trattamenti

Gli esperimenti presenti in questo elaborato sono stati effettuati su cinque linee cellulari:

- cellule U-87 MG (human glioblastoma astrocytoma, American Type Cell Culture Collection (ATCC));
- cellule NIH/3T3 (mouse fibroblasts, ATCC);
- cellule HEK 293 T (human embryonic kidney, CRL-3216, ATCC);
- cellule HeLa (human cervical adenocarcinoma, CCL-2, ATCC);
- oociti di *Xenopus laevis*, prelevati mediante ovariectomia parziale da rane anestetizzate con lo 0.2% di Tricaina (MS222).

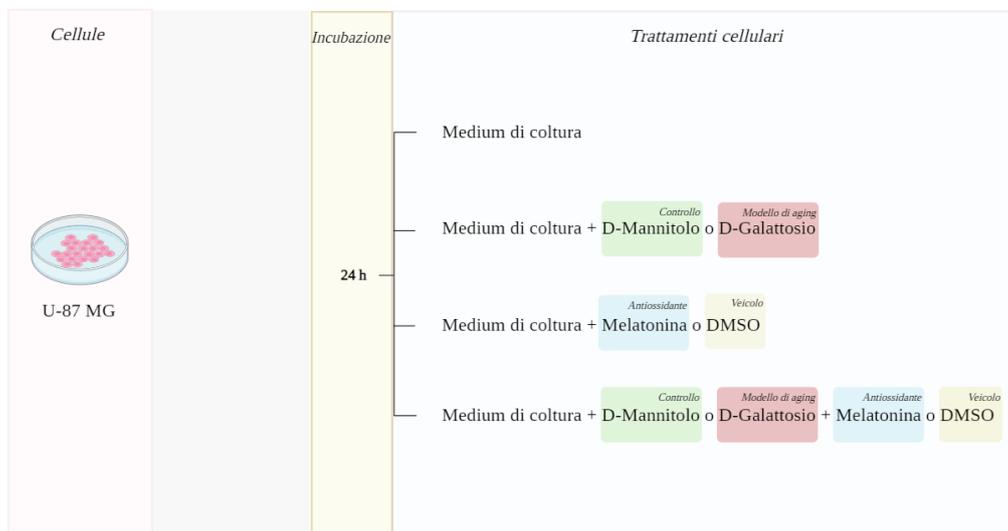
Le U-87 MG rappresentano una linea cellulare con morfologia epiteliale, isolata da gliomi maligni. I gliomi sono i tumori cerebrali primari più comuni, che si manifestano in genere attraverso crisi epilettiche sintomatiche. Le cellule gliali esprimono diversi canali  $K^+$ , i quali svolgono un ruolo importante nello spatial buffering e sono, dunque, presumibilmente coinvolti nel facilitare l'ipereccitabilità epilettica (Madadi *et al.*, 2021). Le cellule U-87 MG sono state seminate in terreno F-12 Ham (N4888, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germania) completato con il 10% di siero bovino fetale (FBS, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2 mM di L-glutamina, 100 U/mL di penicillina, 100  $\mu$ g/mL di streptomicina e 7.5% di  $\text{NaHCO}_3$ . Le cellule NIH/3T3, HEK 293T, HeLa e gli oociti rappresentano ottimi modelli per studi *in vitro*, grazie alle loro caratteristiche peculiari: facilità nel mantenimento della coltura cellulare, intensa proliferazione, facilità di trasfezione e alto tasso di realizzazione dei sigilli mediante tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell.

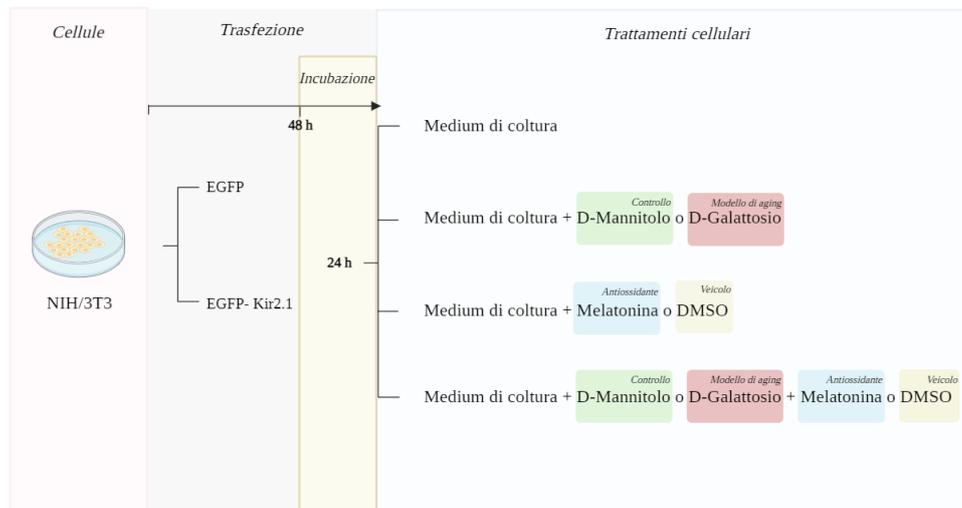
Le cellule NIH-3T3 sono state seminate in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (D7777, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), completato con il 10% di newborn bovine serum (GIBCO), 100 U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomicina.

Le cellule HEK 293T e le cellule HeLa sono state seminate in terreno Minimum Essential Eagle Medium (M5650, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), completato con il 10% di siero bovino fetale (FBS; GIBCO, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), 2 mM di L-glutamina, 100 U/mL di penicillina, 100 µg/mL di streptomicina e 1 mM acido piruvico (sale di sodio).

Tutte le linee cellulari sono state mantenute a 37°C, con il 5% di CO<sub>2</sub>, 95% di aria e 100% di umidità. Le sottoculture venivano seminate ogni due-tre giorni in piastre Petri da 100 mm di diametro dopo il trattamento con tripsina/acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), per consentire la propagazione della coltura.

Per riprodurre un modello di aging correlato all'aumento dello stress ossidativo, le cellule U-87 MG e NIH/3T3 sono state seminate per 24 h in terreno completo contenente 100 mM D-Gal. Per testare l'effetto antiossidante di Mel, le cellule sono state esposte simultaneamente con 100 mM D-Gal e 100 µM Mel per 24 h. Per ottenere un'osmolarità uguale dei media di incubazione, è stata utilizzata una quantità equimolare (100 mM) di D-Mannitolo (D-Man) in sostituzione a 100 mM D-Gal. Come controllo per Mel, è stato utilizzato un volume uguale di DMSO (Figura 8).





**Figura 8.** Rappresentazione schematica dei trattamenti sperimentali in cellule U-87 MG e NIH/3T3.

### 3.3 Trasfezione cellulare e vettori plasmidici

Il meccanismo di trasfezione consiste nell'introduzione di materiale genetico esogeno all'interno delle cellule. In questo caso, è stata eseguita la trasfezione del vettore codificante per Kir2.1 in cellule NIH-3T3, HeLa e HEK 293T per indurre l'espressione ectopica del canale Kir2.1.

Il vettore plasmidico CMV-GFP-Kir2.1 codificante per il canale Kir2.1 umano (KCNJ2, NCBI Sequence ID: NM\_000891.3) con l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) fusa al dominio N-terminale, è stato gentilmente concesso da Bikash Pattnaik (Addgene plasmid # 107184; <http://n2t.net/addgene:107184>; RRID: Addgene\_107184). Le cellule di controllo sono state trasfettate con un vettore codificante solo per la proteina EGFP (empty vector).

Le cellule NIH/3T3 e HeLa sono state seminate in piastre Petri da 35 mm di diametro, incubate over-night per ottenere una confluenza del 30-50% e trasfettate con 3 o 1.5 µg di DNA plasmidico e 6 o 3 µL di METAFECTENE PRO (Biontex, Monaco, Germania), rispettivamente, seguendo le istruzioni del produttore. Il METAFECTENE PRO sfrutta il meccanismo della lipofezione: il reagente contiene lipidi cationici che formano liposomi i quali, a contatto con gli acidi nucleici, creano dei complessi chiamati lipoplex. I lipoplex possono essere assorbiti dalle cellule eucariotiche per endocitosi, veicolando gli acidi nucleici all'interno del citosol. Le cellule HEK293T sono state trasfettate con 400 ng di DNA plasmidico mediante l'utilizzo di Effectene Kit from Qiagen (Hilden, Germany), seguendo le istruzioni del produttore. L'Effectene Transfection Reagent possiede una formulazione lipidica non-liposomica che viene utilizzata in combinazione con uno speciale attivatore della condensazione del DNA. Il reagente ricopre di lipidi cationici il DNA condensato, favorendo il trasferimento del DNA nelle cellule eucariotiche.

Otto ore dopo la trasfezione, il mezzo è stato sostituito e le cellule sono state trasferite su vetrini copri-oggetto (diametro 10 mm); le misurazioni elettrofisiologiche sono state eseguite 72 h dopo la trasfezione. Le singole cellule trasfettate sono state individuate otticamente tramite il segnale fluorescente emesso da EGFP (eccitazione massima, 488 nm; emissione massima, 507 nm).

### **3.3.1 Espressione in oociti**

L'RNA è stato trascritto utilizzando il kit T7 mMessageMachine (Thermofisher, Milano, Italia) in seguito alla linearizzazione del plasmide con NheI. Gli oociti di *Xenopus laevis* sono stati iniettati con circa 5 ng di RNA e incubati a 18°C per 24 h, in accordo con Traverso e collaboratori (Traverso et al., 2006).

### **3.4 Trascrizione inversa e Real Time PCR (RT-qPCR)**

Al fine di individuare i trascritti Kir/KCN presenti nelle cellule U-87 MG, è stata effettuata l'estrazione dell'RNA totale, la trascrizione inversa e la tecnica Real time PCR di tipo quantitativo. Le cellule sono state seminate in una piastra Petri del diametro di 10 mm o in due del diametro di 3.5 mm, fino a confluenza. L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita con l'RNasy micro-kit (Qiagen, Hilden, Germania). L'RNA totale proveniente dal rene umano, dalla corteccia frontale e dalla tiroide è stato acquistato da Ambion (Foster City, CA, USA) o Clontech (Mountain View, CA, USA) e utilizzato per confermare l'efficienza dei primer. Un µg di RNA totale è stato utilizzato per la reazione di trascrizione inversa con il kit QuantiTect®, per la sintesi del cDNA con rimozione integrata della contaminazione genomica del DNA (Qiagen). I primer PrimeTime® qPCR per la rilevazione di tutte e quindici le isoforme del canale Kir e di POLR2A (trascritto utilizzato come house-keeping) sono stati acquistati da Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Le reazioni di qPCR sono state effettuate con 5 µL di cDNA template diluito 1:10 in un volume finale di 20 µL costituito da primer 1X e GoTaq® qPCR Master Mix 1X (Promega, Madison, WI, USA). Le reazioni di Real-time PCR sono state eseguite tramite lo strumento Rotor Gene (Qiagen) e sono state effettuate in duplicati tecnici per ogni campione, includendo un controllo negativo di trascrizione inversa e un controllo privo del template. I livelli dei trascritti sono stati normalizzati per quelli dell'house-keeping e analizzati con il metodo comparativo *Ct* (Livac and Schmittgen, 2001).

### **3.5 Caratterizzazione del modello di aging**

### 3.5.1 Saggio di vitalità cellulare

Al fine di accertare la non tossicità dei trattamenti sperimentali, è stata valutata la vitalità cellulare tramite il sistema CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA), seguendo le istruzioni del produttore. Il reagente CellTiter 96® AQueous One Solution contiene un composto tetrazolico (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt), il quale viene metabolizzato dalle cellule vitali e ridotto in un prodotto colorato formazanico solubile. La quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule vive presenti in coltura. Le cellule U-87 MG e NIH/3T3 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con una densità di  $1 \times 10^6$  cellule/pozzetto. Dopo i trattamenti (Figura 8), le cellule sono state incubate con 20  $\mu$ L CellTiter 96 per 3 h in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. La produzione di formazano è stata rilevata a 490 nm di assorbanza (Victor X3 multiplate reader, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) dopo aver sottratto l'assorbanza di fondo. I dati provengono dalla media di 6 replicati sperimentali per ogni condizione.

### 3.5.2 Valutazione dei livelli delle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico

I livelli delle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS) sono stati valutati come descritto da Mendanha e collaboratori (*Mendanha et al., 2012*), con piccole modifiche. I TBARS sono prodotti dalla reazione tra l'acido tiobarbiturico (TBA) e la malondialdeide (MDA), il prodotto finale della perossidazione lipidica. In breve, le cellule U-87 MG sono state seminate in piastre Petri da 150 mm di diametro fino a circa l'80% confluenza ed esposte ai trattamenti sperimentali (Figura 8). In seguito, i campioni sono stati centrifugati (Neya 16R, 2000 xg, 5 min) e i pellet cellulari sono stati sospesi in soluzione isotonica, trattati con acido tricloroacetico al 10% (p/v) e centrifugati (Neya 16R, 3000 xg, 10 min). Al surnatante sono stati aggiunti 0.5 mL di TBA (1% in 0,05 M NaOH) e la miscela è stata incubata a 95°C per 2 h. I livelli di TBARS sono stati ottenuti sottraendo il 20% dell'assorbanza a 453 nm dall'assorbanza a 532 nm (Onda Spectrophotometer, UV-21). I risultati sono indicati come  $\mu$ M TBARS (coefficiente di estinzione molare:  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.5.3 Valutazione del contenuto dei gruppi sulfidrilici totali

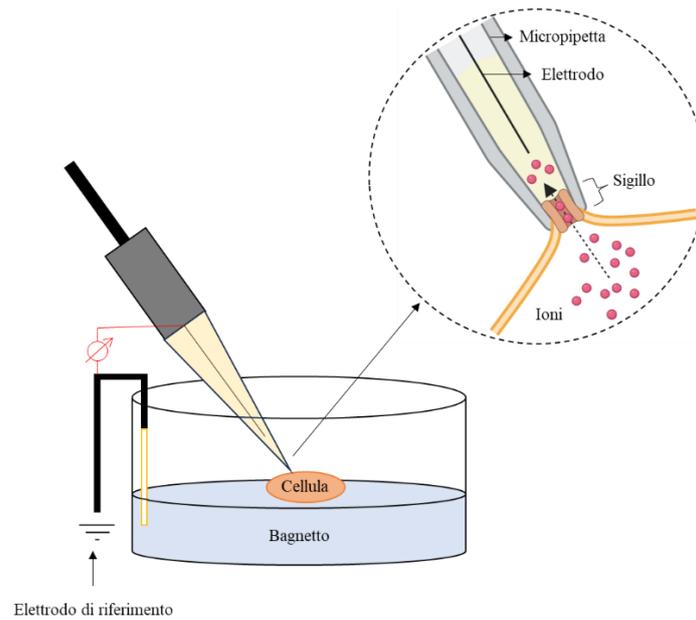
La valutazione del contenuto dei gruppi sulfidrilici totali (gruppi -SH) è un test che permette di valutare la condizione ossidativa delle proteine. Difatti, l'aumento dei ROS può comportare l'ossidazione dei gruppi sulfidrilici, con la formazione di ponti disolfuro e una conseguente diminuzione dei gruppi -SH (*Perrone et al., 2023*). Il contenuto dei gruppi sulfidrilici totali è stato valutato come descritto da Aksenov and Markesbery (*Aksenov and Markesbery, 2001*), con piccole modifiche. Le cellule U-87 MG sono state seminate in piastre Petri da 150 mm di diametro fino a circa l'80% confluenza e successivamente esposte ai trattamenti

sperimentali (Figura 8). In seguito, i campioni sono stati centrifugati (Neya 16R, 2000 xg, 5 min) e i pellet cellulari sono stati lisati su ghiaccio in 1 mL di soluzione tamponata contenente 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP40 e cocktail di inibitori delle proteasi (Roche, Basilea, Svizzera). Dopo un'ulteriore centrifugazione (Neya 16R, 16000 xg, 30 minuti, 4°C) il surnatante è stato incubato con l'1% di SDS per 20 minuti su ghiaccio. Per avviare la reazione, è stata aggiunta un'aliquota di 10 µL di surnatante a 90 µL di 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid] (DTNB, 1 mM) e i campioni sono stati incubati a 25°C per 30 minuti, protetti dalla luce. Dopo l'incubazione, l'assorbanza del campione è stata misurata a 412 nm (spettrofotometro Onda, UV-21) e i livelli di acido 3-tio-2-nitro-benzoico (TNB) sono stati rilevati dopo sottrazione dell'assorbanza del bianco (campioni contenenti solo DTNB). I risultati sono stati riportati come % dei gruppi sulfidrilici totali.

### **3.6 Tecnica del patch-clamp**

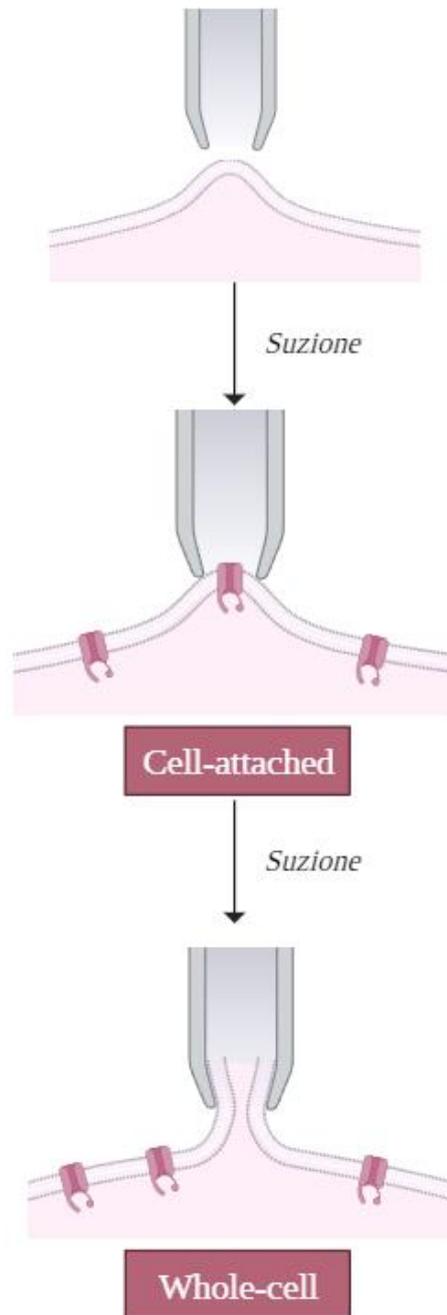
Il patch-clamp è una raffinata tecnica elettrofisiologica attraverso la quale è possibile valutare l'eccitabilità cellulare, manifestata come corrente ionica transmembrana e/o generazione di potenziali d'azione (*Hill and Stephens, 2021; Karmažínová and Lacinová, 2010*). Sviluppata intono alla fine degli anni '70, la tecnica del patch-clamp è stata utilizzata con successo per la caratterizzazione delle conduttanze ioniche di canali ionici voltaggio-dipendenti, canali ionici ligando-dipendenti e scambiatori ionici (*Karmažínová and Lacinová, 2010*).

Il principio del metodo sfrutta la formazione del cosiddetto “sigillo”, ovvero un'intima connessione isolata elettricamente tra una porzione di membrana cellulare (patch) e la punta di una micropipetta di vetro contenente l'elettrodo di stimolazione/registrazione. In particolare, il sigillo viene creato in seguito alla delicata interazione tra la micropipetta (contenente la soluzione intracellulare) e la cellula (immersa nella soluzione extracellulare) e all'applicazione di una leggera suzione attraverso la pipetta (Figura 9).



**Figura 9.** Formazione del sigillo

Per accertare la stabilità del sigillo, la resistenza elettrica di quest'ultimo deve superare  $1 \text{ G}\Omega$ , creando il cosiddetto gigaseal. La formazione del gigaseal è il punto di partenza primario per ottenere le diverse possibili configurazioni del patch-clamp, tra cui quella whole-cell (*Hamill et al. 1981*) (Figura 10).



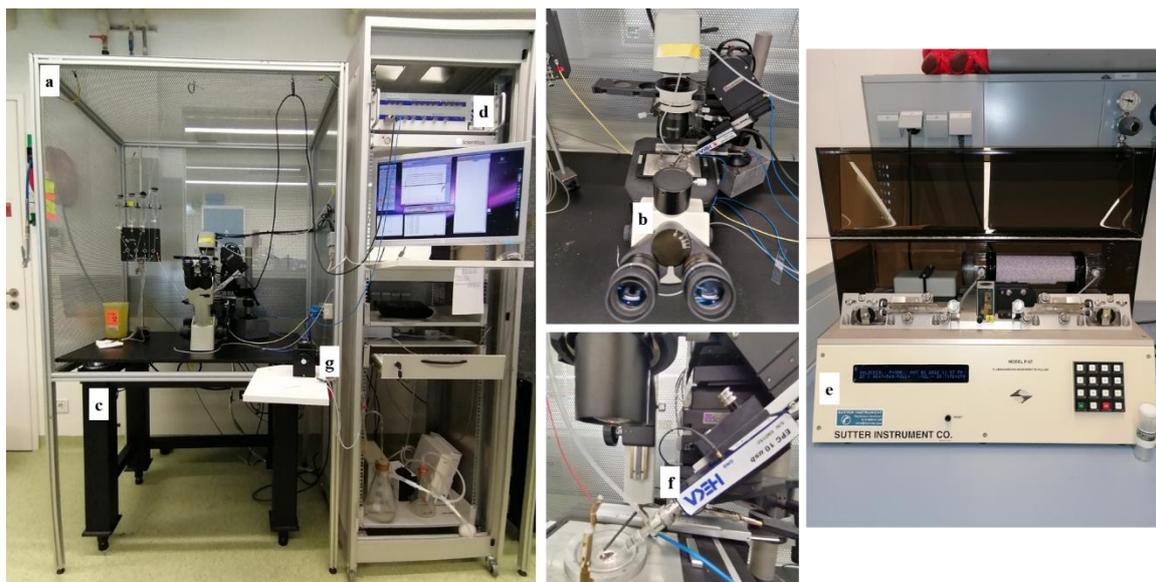
**Figura 10.** Patch-clamp in configurazione whole-cell.

La configurazione whole-cell è la più comunemente utilizzata negli esperimenti elettrofisiologici per monitorare l'attività di tutti i canali espressi nella cellula in esame. Per ottenerla è necessario applicare una suzione più decisa, così da rompere la porzione di membrana sottostante la micropipetta. In alternativa, è possibile indurre la formazione di pori a livello del patch tramite l'aggiunta di antibiotici perforanti nella soluzione intracellulare, quali la nistatina, l'amfotericina B o la gramicidina. Il patch perforato consente di

ottenere dei sigilli più stabili e costituisce il metodo di elezione per lo studio dei canali ionici soggetti a run-down (perdita di corrente) (Rosholm *et al.*, 2021). In questo elaborato è stata eseguita la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell e in modalità voltage-clamp, in cui il segnale registrato è rappresentato dalla quantità di corrente che passa attraverso la membrana cellulare ad un voltaggio prestabilito. Nel voltage-clamp la cellula viene stimolata con un quantitativo di corrente opposto e uguale a quello che passa attraverso i canali ionici nella membrana cellulare. La quantità di corrente necessaria per mantenere costante il potenziale della membrana fornisce una misura diretta di quella che scorre attraverso la stessa.

### 3.6.1 Set-up del patch-clamp

Come mostrato in Figura 11, il set-up utilizzato comprende una gabbia di Faraday (a), all'interno della quale è collocato un microscopio invertito (b) su un tavolo antivibrante di tipo pneumatico (c). Il cambio della soluzione extracellulare è effettuato tramite un sistema di perfusione. L'acquisizione dei dati è stata realizzata tramite l'amplificatore EPC-10 (d) (HEKA Elektronik, Germania), collegato ad una scheda analogico-digitale ITC-16 e controllato da un computer Macintosh, corredato di programma Patch Master (HEKA Elektronik, Germania). Le micropipette da patch-clamp sono state realizzate a partire da capillari in vetro borosilicato (World Precision Instruments, #1B150F-3, O.D. = 1.0 mm, I.D. = 0.58 mm) mediante l'utilizzo di un puller (e) (P-97, Sutter Instruments, USA). Le micropipette da patch-clamp sono state inserite nell'holder (f), collegato all'amplificatore, il cui movimento è reso possibile dall'utilizzo di un micromanipolatore di tipo piezoelettrico (g) (Scientifica, UK). Le registrazioni sono state eseguite a temperatura ambiente, 12-18 h dopo il passaggio di tripsinizzazione delle cellule.

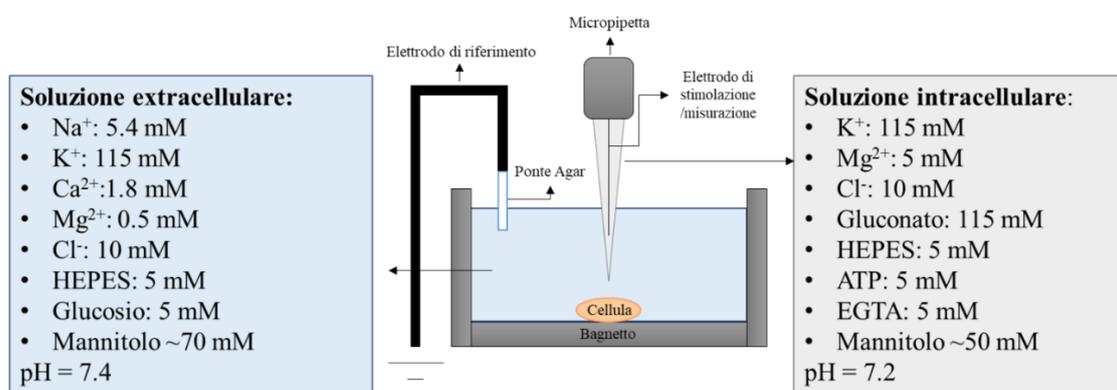


**Figura 11.** Set-up del Patch-clamp. **a)** gabbia di Faraday; **b)** microscopio invertito; **c)** tavolo antivibrante di tipo pneumatico; **d)** amplificatore; **e)** puller; **f)** holder; **g)** micromanipolatore piezoelettrico.

### 3.6.2 Registrazione della corrente $K^+$

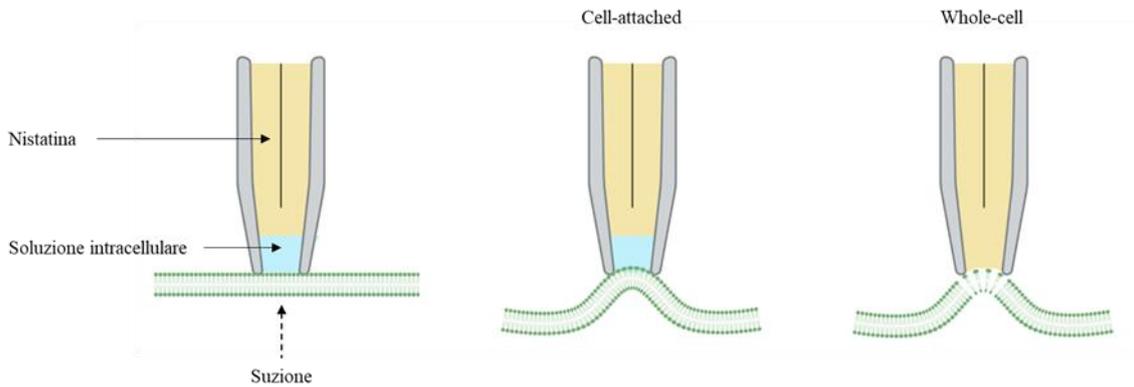
Al fine di misurare la corrente  $K^+$ , è stato utilizzato il metodo del patch-clamp in modalità voltage-clamp e in configurazione whole-cell (patch perforato).

Dopo i trattamenti (Figura 8), le cellule U-87 MG e NIH/3T3 sono state seminate over-night su vetrini copri-oggetto (diametro 10 mm) contenuti in piastre Petri da 30 mm di diametro. I vetrini sono stati posti nel bagnetto, contenente la soluzione extracellulare (composizione descritta in Figura 12) e connesso all'elettrodo di riferimento tramite un ponte costituito dal 4% di agar in 100 mM KCl. Le cellule singole sono state selezionate tramite contrasto di fase o microscopia a fluorescenza, a seconda dei casi. Le micropipette di vetro sono state riempite con soluzione intracellulare (composizione descritta nella Figura 12). Con le soluzioni utilizzate, la resistenza degli elettrodi era compresa tra i 3 e gli 8  $M\Omega$ .



**Figura 12.** Composizione (in mM) delle soluzioni extracellulare (bagnetto) e intracellulare (di riempimento della micropipetta) per esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell. La pressione osmotica è stata regolata a ~ 308 mOsm/  $K_{GH_2O}$  con mannitolo, se necessario. L' ATP è stata aggiunta alle soluzioni come sale di  $Mg^{2+}$ . HEPES, acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazineethanesulfonico; EGTA, acido etilglicol-bis( $\beta$ -aminoetil etere)-N,N',N',N'-tetraacetico.

Per ottenere la configurazione whole-cell, sono stati aggiunti 167  $\mu g/mL$  di nistatina alla soluzione intracellulare da una madre 50 mg/mL preparata in DMSO (Horn, 1991) (Figura 13).



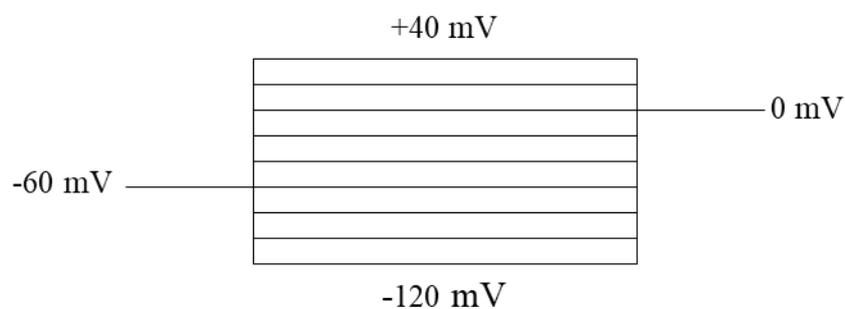
**Figura 13.** Patch perforato

Per gli esperimenti in perfusione (cellule U-87 MG, HEK293T e oociti di *Xenopus laevis*) è stata eseguita una rapida sostituzione della soluzione extracellulare con una velocità di flusso pari a 5 mL/min e un volume di soluzione di circa 300  $\mu$ L.

### 3.6.3 Protocollo di stimolazione

Le conduttanze dei canali ionici possono essere attivate da specifici step di impulsi, dove un numero stabilito di incrementi di voltaggio viene applicato per la durata desiderata (*Sherman-Gold, 1993; Hill and Stephens, 2021*).

Una volta verificata la stabilità del sigillo e l'assenza di correnti di leakage, sono state effettuate le registrazioni di corrente dopo cinque minuti dal passaggio alla configurazione whole-cell, così da consentire un'adeguata dialisi del contenuto intracellulare. L'entità della corrente è stata misurata ogni 5 minuti fino ad un massimo di 30 minuti. Per stabilire la relazione corrente/voltaggio (I/V), le cellule sono state stimolate con degli step di impulsi della durata di 400-500 ms, da -120 mV a +40 mV, a incrementi di 20 mV, da un potenziale di holding pari a -60 mV (Figura 14).



**Figura 14.** Protocollo di stimolazione

### 3.6.4 Voltage-clamp a due elettrodi

Il voltage-clamp a due elettrodi è una tecnica utilizzata per misurare le correnti dei canali o dei trasportatori ionici espressi negli oociti di *Xenopus laevis*. In questo caso, la membrana plasmatica dell'oocita entra a contatto con due microelettrodi, uno per il rilevamento del voltaggio e l'altro per l'iniezione della corrente (Wang *et al.*, 2017).

Le pipette di registrazione sono state riempite con 3 M KCl (resistenza pari a 0.6 M $\Omega$ ) e le correnti sono state registrate utilizzando un amplificatore TEC03 (NPI electronics, Tamm, Germania). Gli elettrodi, messi a terra, sono stati collegati al bagnetto tramite ponti agar. La soluzione extracellulare standard conteneva 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES (pH 7.3).

### 3.6.5 Acquisizione e analisi dei dati

Per l'acquisizione dei dati, sono stati utilizzati amplificatori EPC-10 (HEKA, Stuttgart, Germania) controllati da computer Macintosh contenenti il software Patch Master (HEKA). Per le registrazioni di voltage-clamp a due elettrodi, le correnti sono state acquisite utilizzando il programma GePulse personalizzato e un'interfaccia ITC-16 (Instrutech, Colorado, USA). Le correnti di capacità fast e slow sono state monitorate e compensate durante le registrazioni. La resistenza di accesso è stata monitorata e mantenuta a valori minori di 20 M $\Omega$ . Tutte le misurazioni di corrente sono state filtrate a 3 kHz e digitalizzate a 50 kHz.

Per l'analisi dei dati, sono stati utilizzati i software Fit Master (HEKA), Excel (versione 2019, Microsoft, USA) e GraphPad (versione 9.0 per Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Il valore medio della corrente (pA), misurato in un intervallo di circa 7.5 msec e preso dopo 2.5 msec dall'inizio dell'impulso, è stato normalizzato per la capacità di membrana (pF), al fine di ottenere la densità di corrente (pA/pF o nA/pF per gli oociti), che rappresenta una misura della magnitudo della corrente indipendente dalla grandezza delle cellule. In alcuni esperimenti, è stata sottratta la corrente residua dopo l'esposizione a 1 mM Ba<sup>2+</sup>.

Tutti i risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Per l'analisi statistica è stato utilizzato lo Student t-test per dati non appaiati o appaiati, a seconda dei casi. Le differenze tra i dati sono state assunte come statisticamente significative per  $p < 0.05$  (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). "n" corrisponde al numero di esperimenti indipendenti, ovvero al numero di cellule utilizzate.

### 3.7 Determinazione dei livelli di ROS

La produzione di ROS è stata valutata tramite l'utilizzo dell'indicatore 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA, D6883, Sigma-Aldrich) (Liu *et al.*, 2017). Questo metodo sfrutta il principio secondo cui l'indicatore non fluorescente H2DCFDA reagisce con i ROS eventualmente prodotti, andando incontro a

reazioni di deacetilazione e di ossidazione, formando così il composto fluorescente diclorofluoresceina (DCF). Le cellule U-87 MG e NIH/3T3 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con una densità di  $1 \times 10^6$  cellule/pozzetto e, dopo 24 h, esposte ai trattamenti sperimentali per 3-6-12-24 e 72 h (Figura 8). Come controllo positivo, le cellule sono state trattate con 1 mM di  $H_2O_2$  per 30 minuti. Dopo ogni trattamento, il medium di incubazione è stato eliminato e le cellule sono state lavate in tampone fosfato salino (PBS) ed incubate con 50  $\mu$ L di H2DCFDA 20  $\mu$ M per 45 minuti in un'atmosfera umidificata al 5% di  $CO_2$ . Infine, le cellule sono state lavate per 3 volte con PBS. Le misurazioni di fluorescenza sono state eseguite con un microplate reader (Victor X3, Perkin Elmer, lunghezze d'onda di eccitazione: 485 nm, lunghezza d'onda di emissione: 535 nm), dopo aver sottratto la fluorescenza di fondo. I dati provengono dalla media di 6 replicati sperimentali per ogni condizione.

### **3.8 Valutazione del sistema antiossidante enzimatico endogeno**

#### **3.8.1 Saggio dell'attività di CAT**

La catalasi è un enzima antiossidante ubiquitario che catalizza la decomposizione di  $H_2O_2$  in  $H_2O$  e  $O_2$  (*Glorieux and Calderon, 2017*). Per determinare l'attività di questo enzima, le cellule U-87 MG e NIH/3T3 sono state seminate in piastre a 6 pozzetti con una densità di  $1 \times 10^6$  cellule/pozzetto. Dopo 24 h, esse sono state esposte ai trattamenti sperimentali (Figura 8). Un sottoinsieme di cellule è stato trattato con 1 mM di  $H_2O_2$  per 30 minuti. Dopo ogni trattamento, il mezzo di incubazione è stato eliminato e le cellule sono state lavate in PBS. L'attività di CAT è stata valutata dal Catalase Assay Kit (MAK381, Sigma-Aldrich), secondo le istruzioni del produttore. L'assorbanza dei campioni è stata determinata alla lunghezza d'onda di 595 nm (plate reader Victor X3, Perkin Elmer) dopo aver sottratto l'assorbanza di fondo. I dati provengono dalla media di 3 replicati sperimentali per ogni condizione.

#### **3.8.2 Saggio dell'attività delle SOD**

Le superossido dismutasi (SOD) sono metalloenzimi antiossidanti presenti in molti organismi, dai mammiferi ai batteri. Catalizzano la dismutazione di  $\bullet O_2^-$  in  $H_2O_2$  e  $O_2$  (*Sheng et al., 2014*). Per determinare l'attività di questi enzimi, le cellule U-87 MG e NIH/3T3 sono state seminate in piastre a 6 pozzetti con una densità di  $1 \times 10^6$  cellule/pozzetto. Dopo 24 ore, esse sono state esposte ai trattamenti sperimentali (Figura 8). Un sottoinsieme di cellule è stato trattato con 1 mM  $H_2O_2$  per 30 min. Dopo ogni trattamento, il mezzo di incubazione è stato eliminato e le cellule sono state lavate in PBS. L'attività delle SOD è stata valutata dal Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (CS0009, Sigma-Aldrich), secondo le istruzioni del produttore. L'assorbanza dei campioni è stata determinata alla lunghezza d'onda di 450 nm (plate reader Victor

X3, Perkin Elmer) dopo aver sottratto l'assorbanza di fondo. I dati provengono dalla media di 3 replicati sperimentali per ogni condizione.

### **3.9 Co-localizzazione**

La traslocazione di EGFP-Kir2.1 verso la membrana plasmatica è stato valutato mediante la co-localizzazione di EGFP e un marcatore della membrana plasmatica (CellMask<sup>TM</sup> Deep Red plasma membrane stain, C10046, Invitrogen Molecular Probes, Waltham, MA, USA) come precedentemente descritto da de Moraes e collaboratori e da Roesch e collaboratori (*de Moraes et al., 2016; Roesch et al., 2018*). In breve, le cellule NIH/3T3 e HeLa sono state lavate tre volte con la soluzione salina bilanciata Hanks (HBSS, Sigma-Aldrich), incubate con 1.25 µg/mL CellMask<sup>TM</sup> Deep Red plasma membrane stain su ghiaccio per 5 minuti in HBSS, lavate nuovamente tre volte con HBSS ghiacciato e sviluppate immediatamente in HBSS. L'imaging è stato eseguito mediante acquisizione sequenziale con il microscopio confocale Leica TCS SP5II AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) dotato di un obiettivo ad immersione HCX PL APO 63 /1.20 Lambda blue water e controllato dal software LAS AF SP5 (Leica Microsystems). L'EGFP è stato eccitato alla lunghezza d'onda di 488 nm con il laser Argon e l'emissione è stata rilevata nella gamma tra 500 e 600 nm; il CellMask<sup>TM</sup> Deep Red stain è stato eccitato a 633 nm con un laser Elio/Neon e l'emissione è stata rilevata nella gamma tra 640 e 700 nm. La co-localizzazione è stata quantificata ed espressa come coefficiente di correlazione di Pearson (*Adler and Parmryd, 2010*), coefficiente di sovrapposizione e tasso di co-localizzazione.

### **3.10 Valutazione dei livelli di espressione di Kir2.1**

#### **3.10.1 Western blotting**

Per valutare i livelli di espressione della proteina Kir2.1, le cellule NIH/3T3 sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti ed esposte ai trattamenti sperimentali (Figura 8). Successivamente, i campioni sono stati lavati in PBS e lisati in ghiaccio con 100 µL di tampone RIPA ghiacciato (Sigma Aldrich) contenente 1X Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific). I lisati cellulari sono stati centrifugati a 900 xg per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato raccolto e conservato a -20°C fino all'utilizzo. Gli estratti proteici sono stati separati con voltaggio costante (120 V) su un gel di sodio dodecil solfato (SDS) al 10% di poliacrilamide. Le proteine sono state, in seguito, trasferite per 2 ore su una membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF) applicando un voltaggio costante (75 V). Le membrane sono state bloccate per 1 ora a temperatura ambiente con il 5% di latte in polvere privo di grassi diluito in soluzione tamponata Tris-HCl contenente 0.1% di Tween 20 (TBST), incubate over night a 4°C in agitazione con anticorpi primari diluiti con il 5% di latte in polvere privo di grassi sciolto in TBST. Il giorno successivo, le membrane sono state lavate 3 volte in TBST, incubate per 1 ora a

temperatura ambiente con gli anticorpi secondari diluiti con il 5% di latte in polvere privo di grassi sciolto in TBST e lavate nuovamente. Gli immunocomplessi sono stati visualizzati utilizzando il sistema di imaging a infrarossi ODYSSEY (LI-COR, Lincoln, NE, USA). L'anticorpo monoclonale anti-GFP suscitato in topo (2D4, A254386, diluizione 1:1000) proveniva da Antibodies (Stoccolma, Svezia). L'anticorpo anti-GAPDH suscitato in capra (PLA0302, diluizione 1:1000) proveniva da Sigma-Aldrich. Gli anticorpi secondari anti-goat (926-32214, diluizione 1:20000 diluizione) e anti-mouse (926-32210, 1:20000 diluizione) IRDye 800 CW provenivano da LICOR. Il segnale emesso da GFP-Kir2.1 è stato normalizzato per quello emesso dal GAPDH, utilizzata come proteina house-keeping. La densitometria è stata eseguita con il software ImageJ 1.53t (Wayne Rasband, NIH, MD, USA). Le analisi statistiche sono state effettuate tramite i programmi Excel (versione 2019, Microsoft, USA) e GraphPad (versione 9.0 per Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Tutti i risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Per l'analisi statistica è stato utilizzato l'ANOVA one-way seguito dal test post-hoc di Bonferroni. Le differenze tra i dati sono state assunte come statisticamente significative per  $p < 0.05$  (\*: $p < 0.05$ ; \*\*: $p < 0.01$ ; \*\*\*: $p < 0.001$ ). “n” corrisponde al numero di esperimenti indipendenti.

### 3.10.2 Imaging quantitativo

L'abbondanza totale della proteina EGFP-Kir2.1 è stata valutata tramite l'imaging quantitativo, come precedentemente descritto da de Moraes e collaboratori e Roesch e collaboratori (*de Moraes et al., 2016*; *Roesch et al., 2018*). In breve, le cellule NIH/3T3 sono state fissate con il 4% di paraformaldeide per 15 minuti, colorate con 0.1  $\mu\text{g/mL}$  di 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) per 10 minuti, lavate tre volte e sviluppate in HBSS. L'intensità di fluorescenza di interi campi di imaging (livelli medi di grigio) nel canale di emissione di EGFP è stata sottratta per la fluorescenza di fondo e normalizzata per l'intensità di fluorescenza sottratta dal fondo nel canale di emissione del DAPI. L'imaging è stato eseguito al microscopio confocale come descritto sopra (paragrafo “Co-localizzazione”). Il DAPI è stato eccitato alla lunghezza d'onda di 605 nm con il laser DPSS e l'emissione è stata rilevata nella gamma tra 430 e 480 nm. L'EGFP è stato eccitato a 488 nm con il laser Argon e l'emissione è stata rilevata nella gamma tra 500 e 560 nm. Il gain del fotomoltiplicatore e la potenza del laser sono stati mantenuti rigorosamente costanti durante l'acquisizione di tutte le immagini.

### 3.11 Analisi statistica

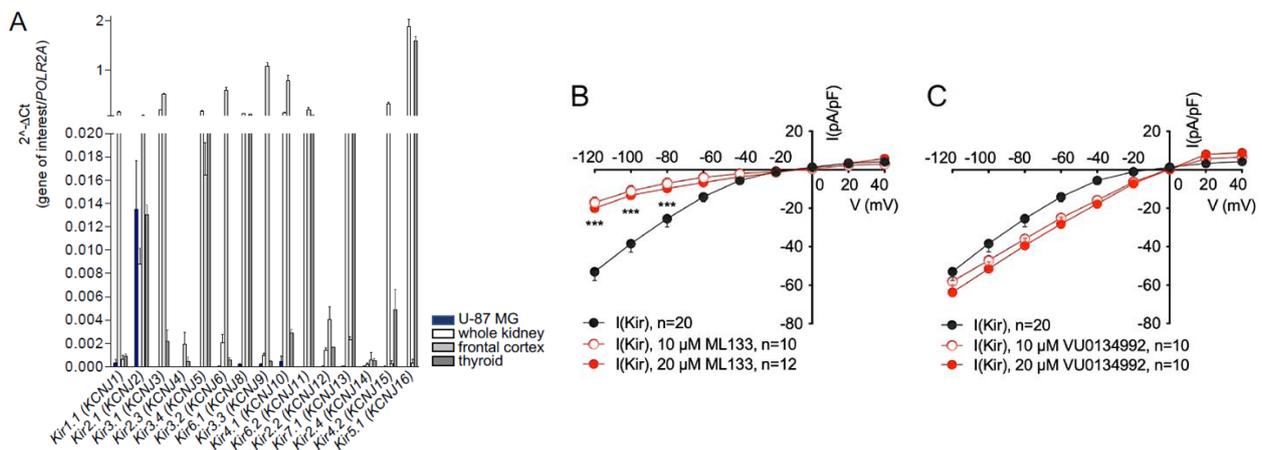
Tutti i dati sono stati espressi come medie aritmetiche  $\pm$  S.E.M. Per l'analisi dei dati, è stato utilizzato il software GraphPad Prism (versione 9.5.1 per Mac OS X, GraphPad Software Inc., CA, USA). Per l'analisi statistica sono stati utilizzati lo Student t-test a due code e l'ANOVA one-way seguito dal test post-hoc di Bonferroni o di Dunnett, a seconda dei casi. Le differenze tra i dati sono state assunte come statisticamente

significative per  $p < 0.05$  (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). “n” corrisponde al numero di esperimenti indipendenti.

## 4. Risultati

### 4.1 Il Kir2.1/KCNJ2 è il canale K<sup>+</sup> a rettificazione entrante predominante nelle cellule U-87 MG

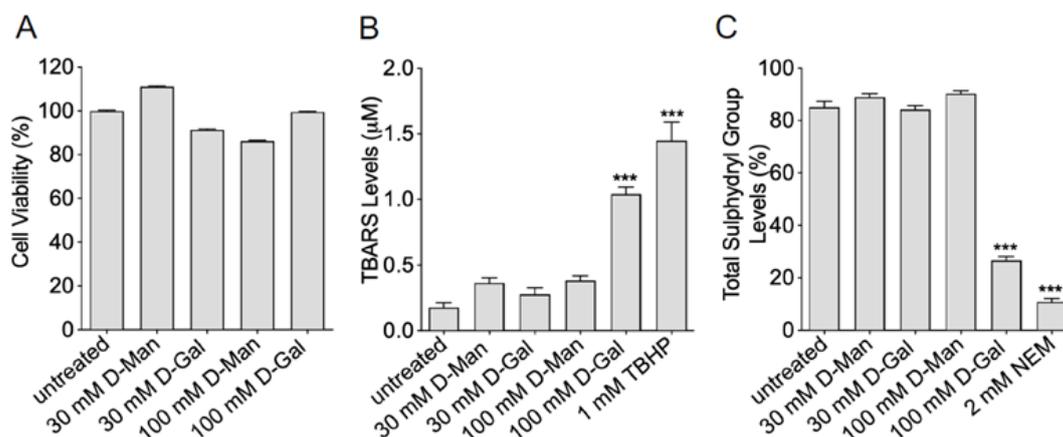
Lo screening di tutti e quindici trascritti conosciuti di Kir/KCN, effettuato con la tecnica RT-qPCR, ha rivelato che il trascritto Kir più abbondante nelle cellule U-87 MG corrisponde al Kir2.1/KCNJ2. Il Kir4.1/KCNJ10 è il secondo trascritto più abbondante, anche se 26 volte meno espresso. Sono stati rilevati livelli molto bassi dei trascritti di Kir1.1/KCNJ1, Kir2.3/KCNJ4, Kir3.2/KCNJ6, Kir6.1/KCNJ8, Kir3.3/KCNJ9, Kir2.2/KCNJ12, Kir7.1/KCNJ13, Kir2.4/KCNJ14 e Kir4.2/KCNJ15, mentre i trascritti di Kir3.1/KCNJ3, Kir3.4/KCNJ5, Kir6.2/KCNJ11 e Kir5.1/KCNJ16 non sono stati riscontrati (Figura 15A). In queste cellule, le misurazioni di patch-clamp in configurazione whole-cell, con soluzioni atte a isolare le correnti K<sup>+</sup>, hanno mostrato una grande corrente a rettificazione entrante con un potenziale di inversione di 0 mV, coerente con una corrente selettiva allo ione K<sup>+</sup>. Questa corrente è inibita da ML133, un potente inibitore del canale Kir2.1 a concentrazioni micromolari, ma non da VU0134992, che blocca il poro-canale di Kir4.1 (Figure 15B e C). Questi risultati mettono in luce che il principale canale K<sup>+</sup> attivo a rettificazione entrante nelle cellule U-87 MG è il Kir2.1/KCNJ2.



**Figura 15.** Livelli di trascritto e funzioni dei canali Kir nelle cellule U-87 MG. **A)** I livelli di trascritto delle isoforme Kir (KCNJ) sono stati misurati tramite RT-qPCR in cellule U-87 MG 24 h dopo la semina. I livelli di trascritto sono stati normalizzati per quelli di POLR2A (house-keeping). Rene, corteccia frontale e tiroide sono stati utilizzati per confermare l'efficienza dei primer. I dati provengono dalla media di 3 replicati biologici indipendenti. **B) e C)** Correnti K<sup>+</sup> in cellule U-87 MG. Le singole cellule sono state selezionate e sottoposte alla tecnica del patch-clamp, in modalità voltage-clamp, in configurazione whole-cell. Il protocollo di stimolazione utilizzato prevedeva incrementi di +20 mV da -120 a +40 mV, con un potenziale di holding di -60 mV. La durata di ogni step di voltaggio era di 400 ms. Le correnti del canale Kir sono state isolate dal totale delle correnti sottraendo quelle misurate nella stessa cellula dopo l'esposizione a 1 mM BaCl<sub>2</sub>. Un sottinsieme di cellule è stato esposto a 10-20 μM di ML133 (inibitore del Kir2.1) o di VU0134992 (inibitore del Kir4.1). \*\*\* p<0.001 vs I(Kir), Student's t-test a due code per dati non appaiati. "n" si riferisce al numero di cellule.

## 4.2 Caratterizzazione del modello di aging

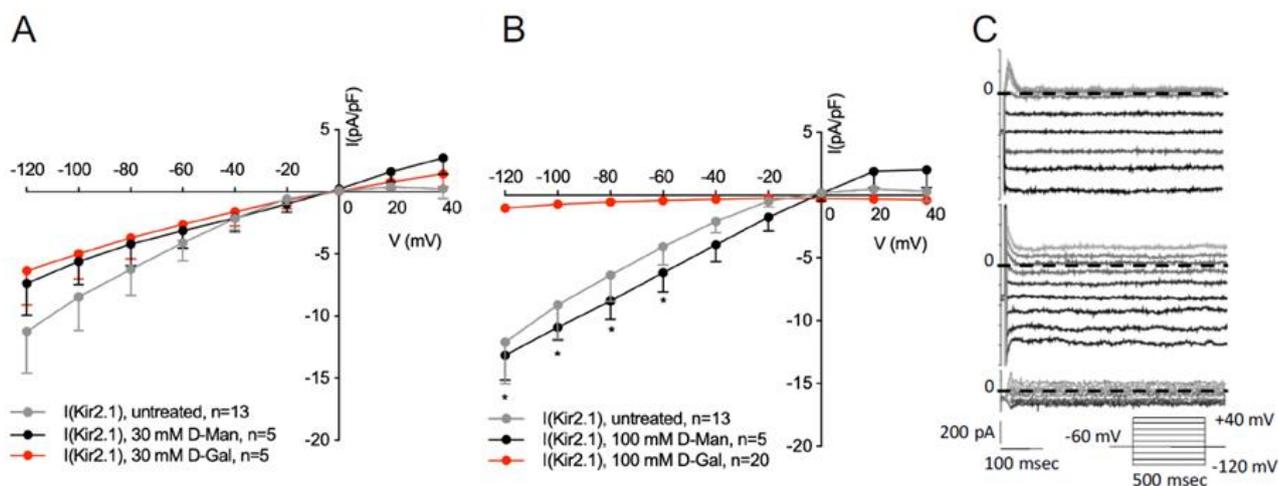
Per stabilire la concentrazione appropriata di D-Gal che induce uno stress ossidativo cronico, le cellule U-87 MG sono state esposte a 30 o 100 mM D-Gal per 24 h. Poiché una variazione dell'osmolarità dell'ambiente cellulare potrebbe influenzare l'attività di canali e trasportatori e/o determinare una diminuzione della vitalità cellulare (Hoffmann *et al.*, 2009; Lang, 2007), il D-Man, uno zucchero non permeabile e non metabolizzabile dalle cellule, è stato utilizzato per ottenere un'uguale osmolarità del mezzo di coltura cellulare in campioni di controllo. La dose 100 mM D-Gal non ha determinato una riduzione della vitalità cellulare (Figura 16A), ma ha comportato un incremento dei livelli di TBARS (Figura 16B) e una diminuzione del contenuto dei gruppi sulfidrilici totali (Figura 16C), denotando perossidazione lipidica e ossidazione proteica in queste cellule. Al contrario, la dose 30 mM D-Gal non ha comportato l'aumento dello stress ossidativo. Dunque, la dose 100 mM D-Gal è stata scelta per creare il modello di aging in cellule gliali.



**Figura 16.** Caratterizzazione del modello di aging in cellule U-87 MG. Le cellule sono state incubate con 30 o 100 mM D-Man (controllo) o D-Gal per 24 h. **A)** Vitalità cellulare; **B)** livelli di TBARS; **C)** livelli dei gruppi sulfidrilici totali. L'incubazione con 1 mM TBHP o 2 mM N-ethylmaleimide (NEM) per 1 h è stata utilizzata per ottenere una completa ossidazione lipidica o proteica, rispettivamente (controlli positivi). \*\*\* $p < 0.001$  vs untreated, one-way ANOVA seguito dal test post-hoc di Bonferroni ( $n=10$ ).

## 4.3 La corrente di Kir2.1 è inibita dall'aging

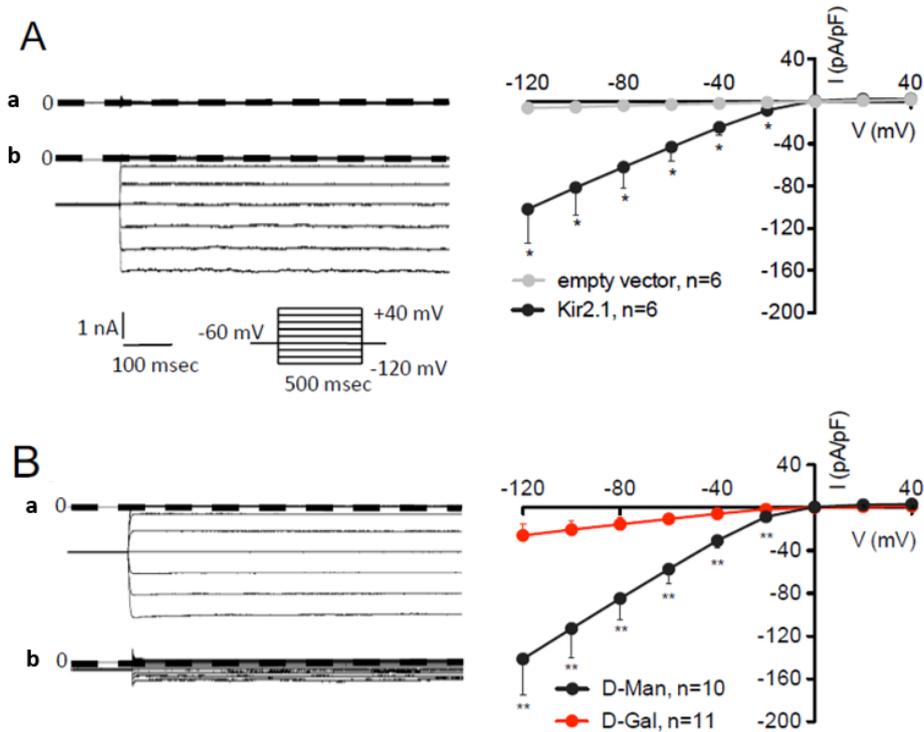
L'esposizione delle cellule U-87 MG a 100 mM D-Gal per 24 h ha comportato un'inibizione quasi completa delle correnti di Kir2.1 (Figura 17B), mentre la dose 30 mM D-Gal non ha sortito effetto (Figura 17A). Inoltre, le correnti registrate in seguito all'esposizione delle cellule a 30-100 mM D-Man non sono statisticamente significative rispetto a quelle registrate in cellule non trattate, escludendo la possibilità che questa inibizione fosse dovuta all'iperosmolarità del mezzo di coltura cellulare. L'inibizione della corrente Kir2.1 è, dunque, causata dall'incremento dello stress ossidativo.



**Figura 17.** Effetto dose-dipendente di D-Gal sull'attività del canale Kir2.1. Relazione densità di corrente/voltaggio ( $I(\text{pA/pF})/V$ ) delle cellule U-87 MG non trattate o incubate per 24 h con **A)** 30 mM D-Man o D-Gal o **B)** 100 mM D-Man o D-Gal. Le singole cellule sono state selezionate e sottoposte alla tecnica del patch-clamp, in modalità voltage-clamp e in configurazione whole-cell. Il protocollo di stimolazione utilizzato prevedeva incrementi di +20 mV da -120 a +40 mV, con un potenziale di holding di -60 mV. La durata di ogni step di voltaggio era di 500 ms. Le correnti del canale Kir sono state isolate dal totale delle correnti sottraendo quelle misurate nella stessa cellula dopo l'esposizione a 1 mM BaCl<sub>2</sub>. \* $p < 0.05$  vs  $I(\text{Kir2.1})$  100 mM D-Gal, Student's t-test a due code per dati non appaiati. "n" si riferisce al numero di cellule. **C)** registrazioni di corrente whole-cell corrispondenti a (dall'alto): cellule non trattate, cellule trattate con 100 mM D-Man e cellule trattate con 100 mM D-Gal.

Per confermare questi risultati, è stato creato un sistema di espressione eterologo nelle cellule NIH/3T3. Le cellule native NIH/3T3 non esprimono correnti macroscopiche di K<sup>+</sup>. Tuttavia, queste cellule hanno sviluppato una grande corrente a rettificazione entrante 72 h dopo la trasfezione con EGFP-Kir2.1 (Figura 18Ab). Questa corrente presenta un potenziale di inversione di 0 mV, come previsto per una corrente selettiva allo ione K<sup>+</sup> data dalla composizione delle soluzioni utilizzate, riflettendo le caratteristiche biofisiche della corrente a rettificazione entrante delle cellule native U-87 MG (Figura 15B e 15C).

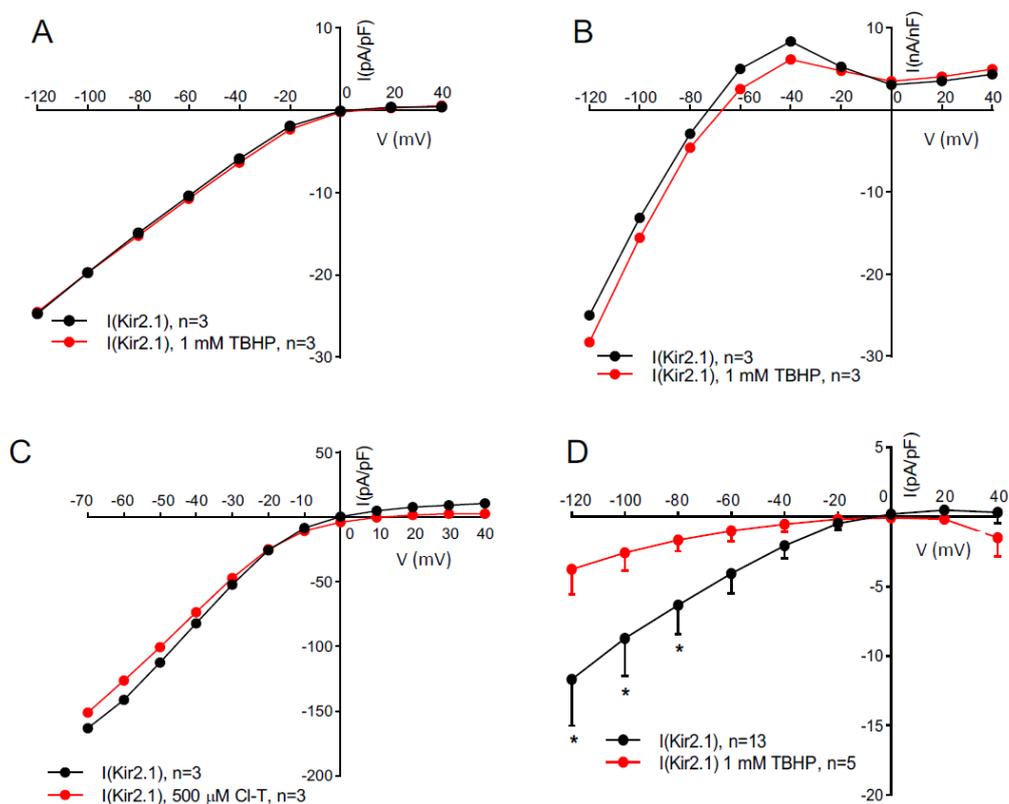
L'esposizione delle cellule NIH/3T3 trasfettate a 100 mM D-Gal per 24 h ha comportato, anche in questo caso, un'inibizione quasi completa della corrente di Kir2.1 (Figura 18B).



**Figura 18.** RegISTRAZIONI di corrente whole-cell (sinistra) e relazioni I(pA/pF)/V (destra) di **A**) cellule NIH/3T3 trasfettate per 72 h con **(a)** vettore codificante per EGFP o **(b)** per EGFP-Kir2.1; **B**) cellule NIH/3T3 trasfettate per 72 h con vettore codificante per EGFP-Kir2.1 e incubate per 24 h con **(a)** 100 mM D-Man o **(b)** 100 mM D-Gal. Le singole cellule sono state selezionate e sottoposte alla tecnica del patch-clamp, in modalità voltage-clamp e in configurazione whole-cell. Il protocollo di stimolazione utilizzato prevedeva incrementi di +20 mV da -120 a +40 mV, con un potenziale di holding di -60 mV. La durata di ogni step di voltaggio era di 500 ms. \* $p < 0.05$  vs empty vector, \*\* $p < 0.01$  vs I(Kir2.1) 100 mM D-Gal, Student's t-test a due code per dati non appaiati. "n" si riferisce al numero di cellule.

#### 4.4 Lo stress ossidativo a breve e a lungo termine influenza differenzialmente l'attività del canale Kir2.1

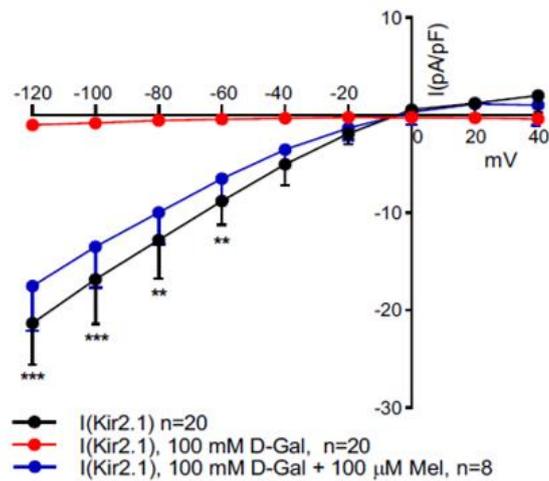
Per verificare se i residui amminoacidici del canale Kir2.1 rappresentano un bersaglio diretto dello stress ossidativo, sono state misurate le correnti di Kir2.1 endogene (U-87 MG, Figura 19A) o ectopicamente espresse in oociti di *Xenopus laevis* (Figura 19B) e in cellule HEK293T (Figura 19C) in seguito all'esposizione a due forti specie pro-ossidanti: TBHP e la Cl-T. Esse sono state perfuse insieme alla soluzione extracellulare per 5 minuti in seguito al passaggio alla configurazione whole-cell e dopo la registrazione della corrente basale al tempo 0 e a 5 minuti. In queste condizioni, i composti ossidanti non hanno influenzato significativamente le correnti Kir2.1. Al contrario, l'incubazione delle cellule U-87 MG con la stessa concentrazione di TBHP per un tempo più prolungato (2 h) ha comportato una significativa inibizione della corrente di Kir2.1 (Figura 19D), suggerendo che uno stress ossidativo prolungato è necessario per influenzare l'attività di Kir2.1.



**Figura 19.** Effetto dell'esposizione breve e prolungata a sostanze pro-ossidanti sull'attività del canale Kir2.1. Relazione I(pA/pF)/V di **A)** cellule U-87 MG che esprimono a livello endogeno il canale Kir2.1; **B)** oociti di *Xenopus laevis* che esprimono ectopicamente il canale Kir2.1 prima e dopo la perfusione con soluzione extracellulare contenente 1 mM TBHP per 5 minuti; **C)** cellule HEK293T che esprimono ectopicamente il canale Kir2.1 prima e dopo la perfusione con soluzione extracellulare contenente 500  $\mu$ M Cl-T per 5 minuti; **D)** cellule U-87 MG che esprimono a livello endogeno il canale Kir2.1 incubate per 2 h con 1 mM TBHP. Le singole cellule sono state selezionate e sottoposte alla tecnica del patch-clamp, in modalità voltage-clamp e in configurazione whole-cell. Il protocollo di stimolazione utilizzato prevedeva incrementi di +20 mV da -120 a +40 mV, con un potenziale di holding di -60 mV. La durata di ogni step di voltaggio era di 400 ms. \* $p < 0.05$  vs I(Kir2.1) 1 mM TBHP, Student's t-test a due code per dati non appaiati. "n" si riferisce al numero di cellule.

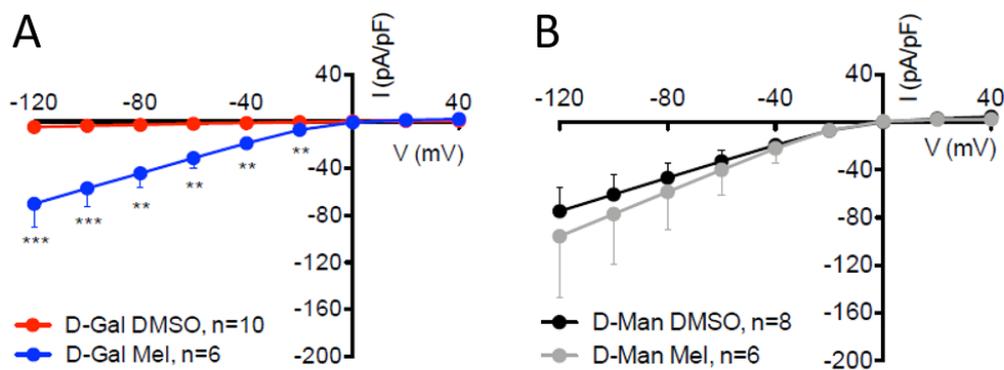
#### 4.5 La melatonina ha ripristinato l'attività del canale Kir2.1 nel modello di aging

In una serie separata di esperimenti, le cellule U-87 MG sono state incubate con 100 mM D-Gal in presenza o assenza di 100  $\mu$ M Mel. In queste cellule, Mel ha completamente ripristinato la corrente endogena di Kir2.1 (Figura 20).



**Figura 20.** Effetto protettivo di Mel sull'attività del canale Kir2.1 in cellule U-87 MG. Relazione I(pA/pF)/V in cellule U-87 MG incubate o meno per 24 h con 100 mM D-Gal, in presenza o assenza di 100  $\mu$ M Mel. Le singole cellule sono state selezionate e sottoposte alla tecnica del patch-clamp, in modalità voltage-clamp e in configurazione whole-cell. Il protocollo di stimolazione utilizzato prevedeva incrementi di +20 mV da -120 a +40 mV, con un potenziale di holding di -60 mV. La durata di ogni step di voltaggio era di 400 ms. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs I(Kir2.1) 100 mM D-Gal, Student's t-test a due code per dati non appaiati. "n" si riferisce al numero di cellule.

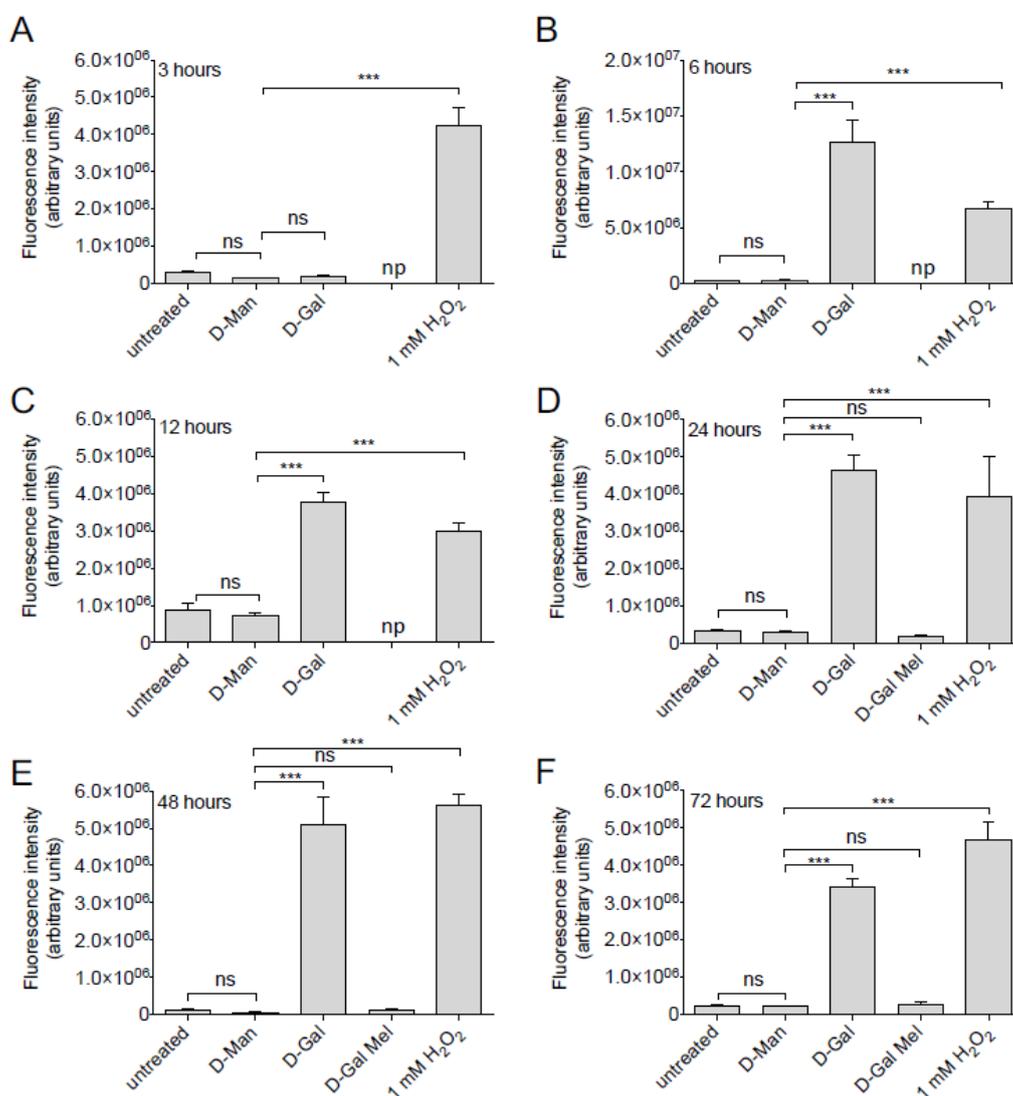
Inoltre, Mel ha ripristinato la corrente ectopica nelle cellule NIH/3T3 inibita da 100 mM D-Gal (Figura 21A), mentre non ha modificato l'entità della corrente nelle cellule di controllo esposte a 100 mM D-Man (Figura 21B).



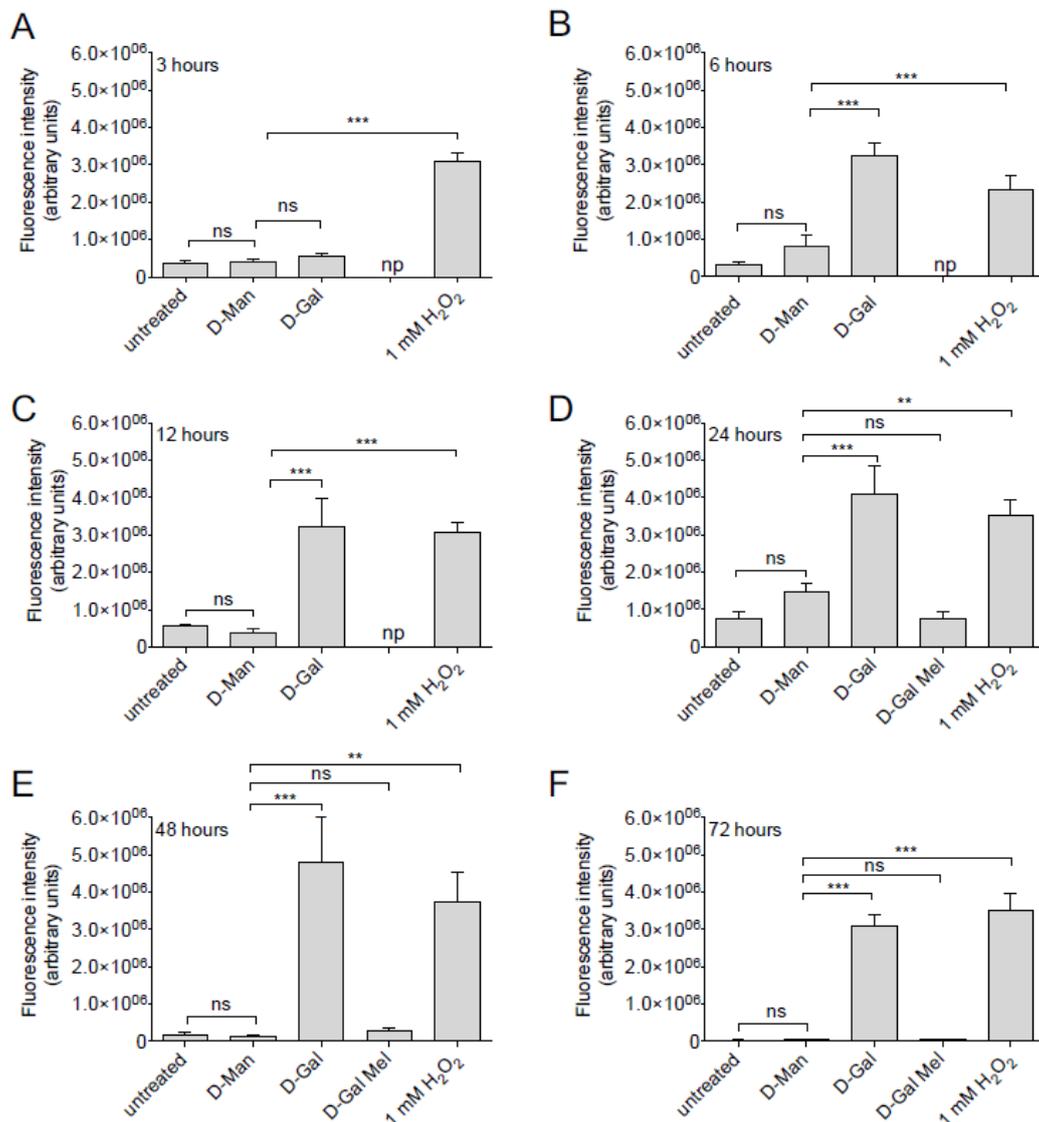
**Figura 21.** Effetto protettivo di Mel sull'attività del canale Kir2.1 in cellule NIH/3T3. Relazione I(pA/pF)/V in cellule NIH/3T3 trasfettate per 72 h con EGFP-Kir2.1 e incubate per 24 h con **A**) 100 mM D-Gal o **B**) D-Man, in presenza di 100  $\mu$ M Mel o del suo veicolo (0.1% DMSO). Le singole cellule sono state selezionate e sottoposte alla tecnica del patch-clamp, in modalità voltage-clamp e in configurazione whole-cell. Il protocollo di stimolazione utilizzato prevedeva incrementi di +20 mV da -120 a +40 mV, con un potenziale di holding di -60 mV. La durata di ogni step di voltaggio era di 400 ms. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs I(Kir2.1) 100 mM D-Gal, Student's t-test a due code per dati non appaiati. "n" si riferisce al numero di cellule.

#### 4.6 La melatonina ha prevenuto la formazione di ROS nel modello di aging

Per valutare se l'effetto protettivo di Mel sull'attività di Kir2.1 è correlato al buffering dello stress ossidativo, i livelli di ROS sono stati misurati in cellule U-87 MG (Figura 22) e NIH/3T3 (Figura 23) in seguito all'incubazione con 100 mM D-Man o D-Gal per 3-6-12-24-48-72 h, in presenza o assenza di 100  $\mu$ M Mel. Come previsto, D-Gal ha provocato un aumento significativo del contenuto dei ROS intracellulari, a partire dalla sesta ora di incubazione, in entrambi i tipi di cellule. Al contrario, la compresenza di Mel nel terreno di coltura ha efficacemente impedito l'aumento dei ROS.



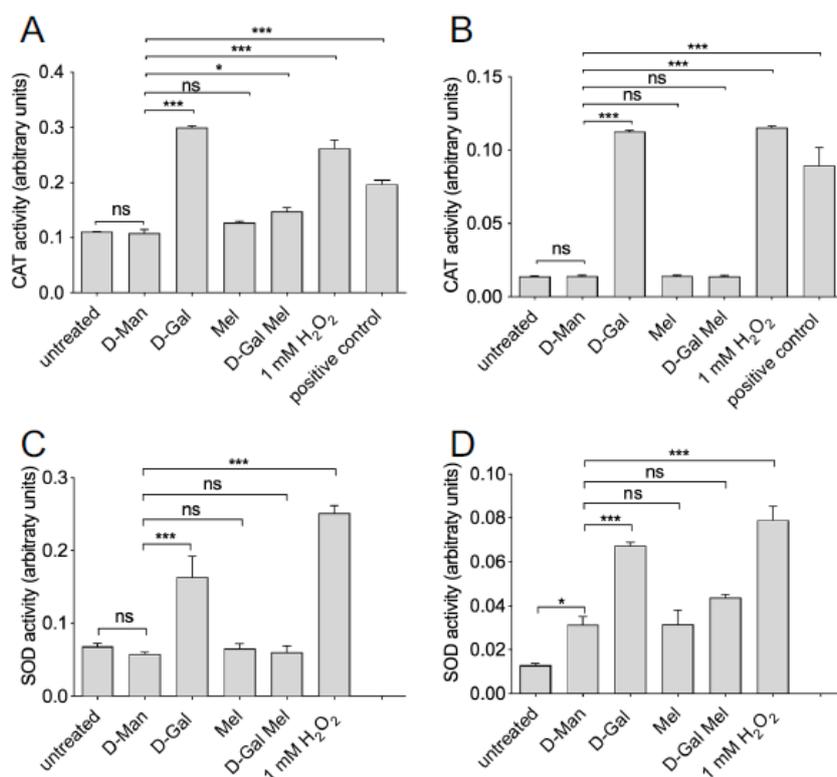
**Figura 22.** Produzione di ROS indotta da D-Gal ed effetto protettivo di Mel nelle cellule U-87 MG. Livelli di ROS in cellule non trattate o esposte a 100 mM D-Man, 100 mM D-Gal o D-Gal + 100  $\mu$ M Mel ai tempi indicati (A-F). L'incubazione con 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 30 minuti è stata utilizzata come riferimento per condizioni di elevato stress ossidativo (controllo positivo). np, non eseguito, ns, non statisticamente significativo. \*\*\* p < 0.001 vs D-Man, one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Dunnett (n=6).



**Figura 23.** Produzione di ROS indotta da D-Gal ed effetto protettivo di Mel nelle cellule NIH/3T3. Livelli di ROS in cellule non trattate o esposte a 100 mM D-Man, 100 mM D-Gal o D-Gal + 100  $\mu$ M Mel ai tempi indicati (A-F). L'incubazione con 1 mM di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 30 minuti è stata utilizzata come riferimento per condizioni di elevato stress ossidativo (controllo positivo). np, non eseguito, ns, non statisticamente significativo. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs D-Man, one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Dunnett (n=6).

#### 4.7 La melatonina ha prevenuto l'attivazione del sistema antiossidante endogeno nel modello di aging

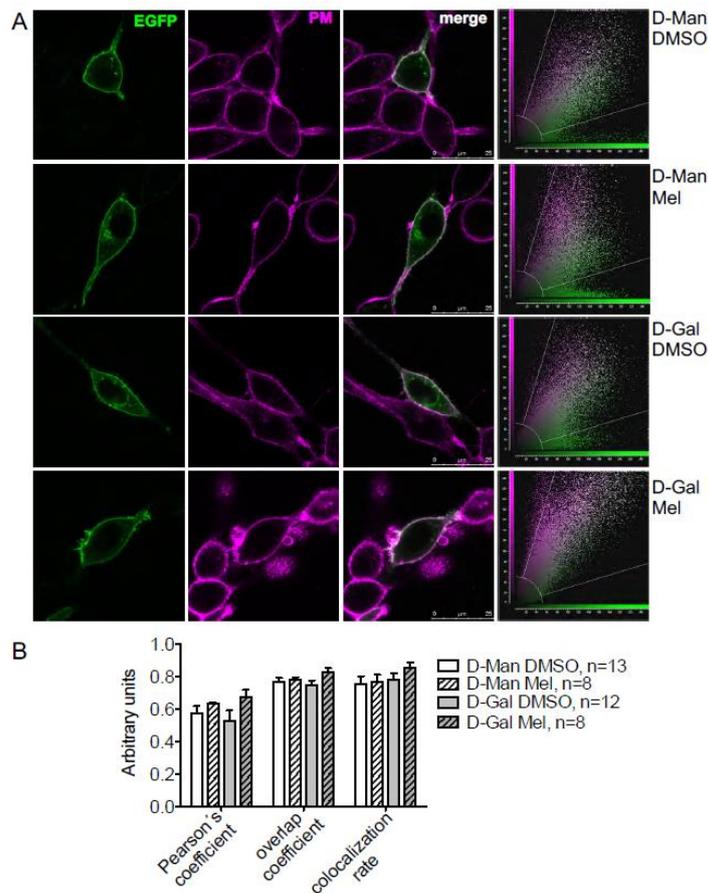
L'attività degli enzimi CAT e SOD del sistema antiossidante endogeno è stata valutata in cellule U-87 MG e NIH/3T3 in seguito all'incubazione per 24 h con 100 mM D-Man o D-Gal, in presenza o assenza di 100  $\mu$ M Mel. L'esposizione a D-Gal ha indotto un'attivazione significativa di CAT e SOD in entrambi i tipi cellulari, coerente con un aumento dello stress ossidativo, che è stato efficacemente prevenuto da Mel (Figura 24).



**Figura 24.** Incremento dell'attività di CAT e SOD indotta da D-Gal ed effetto protettivo di Mel. Attività di CAT in cellule **A)** U-87 MG e **B)** NIH/3T3 e attività di SOD in cellule **C)** U-87 MG e **D)** NIH/3T3 non trattate o esposte per 24 h a 100 mM D-Man, 100 mM D-Gal, 100  $\mu$ M Mel, o D-Gal + Mel. L'incubazione con 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 30 minuti è stata utilizzata come riferimento per condizioni di elevato stress ossidativo (controllo positivo). ns, non statisticamente significativo, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs D-Man, one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Dunnett ( $n = 3$ ).

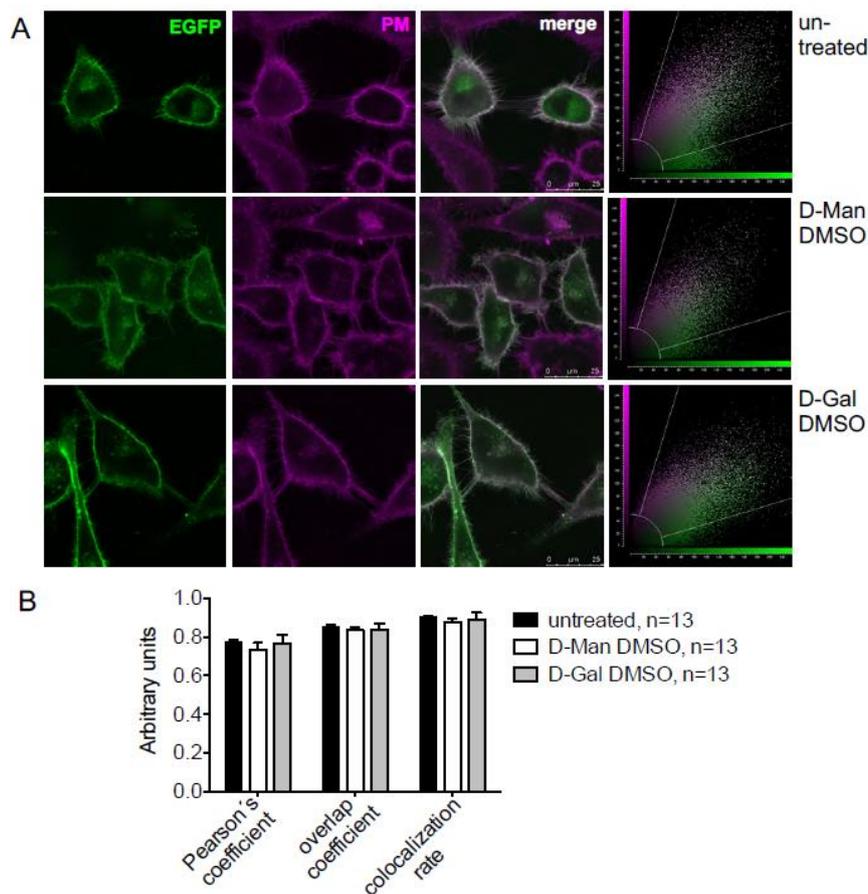
#### 4.8 La traslocazione della proteina Kir2.1 sulla membrana plasmatica non è stata alterata nel modello di aging

Per verificare se un'alterazione della traslocazione della proteina sulla membrana potrebbe contribuire alla riduzione dell'attività del canale Kir2.1 osservata dopo l'esposizione a D-Gal, è stata effettuata la co-localizzazione di EGFP-Kir2.1 e della membrana plasmatica tramite microscopia confocale nelle cellule NIH/3T3 esposte a 100 mM D-Man o D-Gal in presenza di 100  $\mu$ M Mel o del suo veicolo (0.1% DMSO). In queste cellule, il canale Kir2.1 ha mostrato una localizzazione predominante sulla membrana plasmatica, con una parziale ritenzione all'interno dei compartimenti subcellulari. In ogni caso, i parametri di co-localizzazione non hanno rilevato una differenza statisticamente significativa che rifletta una traslocazione alterata di EGFP-Kir2.1 sulla membrana plasmatica nelle condizioni testate (Figura 25).



**Figura 25.** Co-localizzazione di Kir2.1 e della membrana plasmatica nelle cellule NIH/3T3. **A)** da sinistra a destra: segnale fluorescente di EGFP-Kir2.1 (verde) e della membrana plasmatica (magenta) nelle cellule NIH/3T3 vive, corrispondente immagine di fusione e scatter plot. I pixel bianchi indicano la co-localizzazione tra i due segnali. Le cellule sono state trasfettate per 72 h e incubate per 24 h con 100 mM D-Man o 100 mM D-Gal in presenza di 100  $\mu$ M Mel o del suo veicolo (0.1% DMSO). Barra di scala: 25  $\mu$ m; **B)** parametri di co-localizzazione di EGFP-Kir2.1 e della membrana plasmatica. “n” si riferisce al numero di cellule. I dati sono stati analizzati con one-way ANOVA seguito dal test post-hoc di Bonferroni. Non sono state riscontrate differenze significative tra i set di dati.

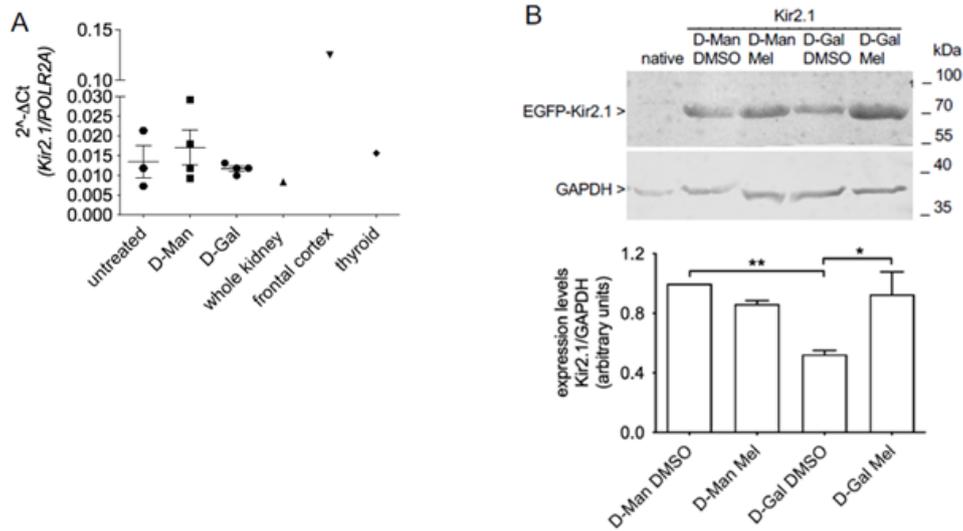
Poiché una parziale ritenzione all'interno dei compartimenti subcellulari osservata nelle cellule NIH/3T3 potrebbe aver mascherato sottili differenze nella localizzazione di EGFP-Kir2.1 tra le diverse condizioni, esperimenti simili sono stati condotti nelle cellule HeLa. In queste cellule, EGFP-Kir2.1 ha mostrato una localizzazione predominante sulla membrana plasmatica. Tuttavia, anche in questo caso, il possibile effetto di D-Gal nella riduzione del targeting del Kir2.1 sulla membrana plasmatica non è stato riscontrato (Figura 26).



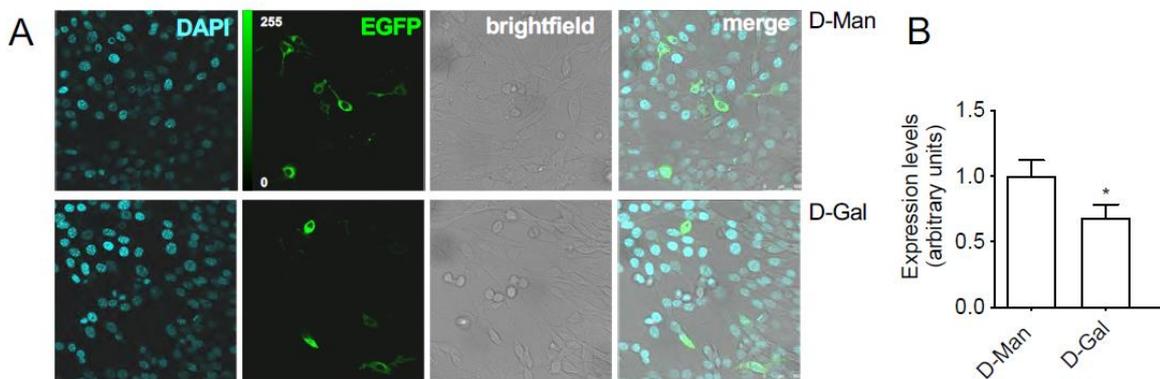
**Figura 26.** Co-localizzazione di Kir2.1 e della membrana plasmatica nelle cellule HeLa. **A)** da sinistra a destra: segnale fluorescente di EGFP-Kir2.1 (verde) e della membrana plasmatica (magenta) nelle cellule HeLa vive, corrispondente immagine di fusione e scatter plot. I pixel bianchi indicano la co-localizzazione tra i due segnali. Le cellule sono state trasfettate per 72 h e incubate per 24 h con 100 mM D-Man o 100 mM D-Gal. Barra di scala: 25  $\mu$ m; **B)** parametri di co-localizzazione di EGFP-Kir2.1 e della membrana plasmatica. “n” si riferisce al numero di cellule. I dati sono stati analizzati con one-way ANOVA seguito dal test post-hoc di Bonferroni. Non sono state riscontrate differenze significative tra i set di dati.

#### 4.9 La melatonina ha impedito la riduzione dei livelli della proteina Kir2.1 nel modello di aging

Per verificare se l'alterazione dell'attività del canale Kir2.1, osservata dopo l'esposizione a D-Gal, potrebbe essere dovuta ad una riduzione del trascritto e/o della proteina Kir2.1, i livelli del trascritto di Kir2.1 sono stati misurati tramite RT-qPCR in cellule U-87 MG non trattate o esposte a 100 mM D-Man o D-Gal. Non è stata riscontrata nessuna variazione significativa nei livelli di trascritto di Kir2.1 in queste cellule, rendendo così improbabile un effetto di D-Gal sulla trascrizione dell'mRNA o sulla sua stabilità (Figura 27A). I livelli della proteina Kir2.1 sono stati misurati tramite Western blotting (Figura 27B) e imaging quantitativo (Figura 28) nelle cellule NIH/3T3 trasfettate con EGFP-Kir2.1 ed esposte a 100 mM D-Man o D-Gal in presenza di 100  $\mu$ M Mel o del suo veicolo (0.1% DMSO). È interessante notare che una significativa riduzione dei livelli di proteina Kir2.1 è stata riscontrata in cellule esposte a D-Gal, efficacemente impedita dall'azione di Mel.



**Figura 27.** Cambiamenti indotti da D-Gal nei livelli di trascritto e/o di proteina Kir2.1 ed effetto protettivo di Mel. **A)** Livelli di mRNA Kir2.1 in cellule U-87 MG non trattate o incubate per 24 h con 100 mM D-Man o 100 mM D-Gal. Rene, corteccia frontale e tiroide sono stati utilizzati per confermare l'efficienza del primer. I dati provengono da 3-4 replicati biologici indipendenti. **B)** Blot originale (in alto) e densitometria (in basso) dei livelli di proteina EGFP-Kir2.1 in cellule NIH/3T3 trasfettate per 72 ore e incubate per 24 h con 100 mM D-Man o 100 mM D-Gal in presenza di 100  $\mu$ M Mel o del suo veicolo (0.1% DMSO). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Bonferroni ( $n=6$ ). I dati provengono dalla media di quattro replicati biologici indipendenti.



**Figura 28.** Livelli della proteina Kir2.1 in cellule NIH/3T3 di controllo o trattate con D-Gal. **A)** Da sinistra a destra: segnale fluorescente di DAPI (ciano) e di EGFP-Kir2.1 (verde), immagine corrispondente in campo chiaro e immagine di fusione. Le cellule sono state trasfettate per 72 h e incubate per 24 h con 100 mM D-Man o 100 mM D-Gal. Barra di scala: 50  $\mu$ m; **B)** Intensità della fluorescenza di EGFP-Kir2.1 normalizzata per la densità cellulare. \* $p < 0.05$ , Student's t-test a due code per dati non appaiati.  $n=18$ , dove "n" si riferisce al numero dei campi di imaging.

## 5. Discussione

L'epilessia è una malattia cronica del cervello la cui prevalenza e incidenza aumentano con l'età (Ramsay *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2022). Lo stress ossidativo è considerato un fattore determinante nella patogenesi dell'epilessia e dell'epileptogenesi, in combinazione con la neuroinfiammazione, specialmente durante l'invecchiamento (Borowicz-Reutt and Czuczwar, 2020; Fabisiak and Patel, 2022). Tuttavia, non sono stati del tutto chiariti i meccanismi molecolari attraverso cui lo stress ossidativo predispone e altera la funzione cerebrale durante l'epilessia; ad esempio, non è chiaro il ruolo dei canali ionici implicati nel meccanismo di spatial buffering dello ione  $K^+$  durante l'invecchiamento.

Il processo di spatial buffering dello ione  $K^+$  è affidato all'attività dei canali Kir a rettificazione entrante. Nelle cellule gliali di Müller della retina, i canali Kir2.x mediano la dispersione dell'eccesso locale di ioni  $K^+$  extracellulari attraverso il sincizio gliale. Questo processo richiede l'attività concertata di canali a rettificazione forte, come Kir2.1, che media l'afflusso di  $K^+$  nelle cellule gliali, e di canali a rettificazione debole, come Kir4.1, che riversa ioni  $K^+$  nell'ambiente extracellulare, in siti a minore concentrazione di  $K^+$  (Newman, 1993; Kofuji and Newman, 2004; Kofuji *et al.*, 2002). Lo spatial buffering, rimuovendo  $K^+$  dall'ambiente extracellulare, previene la depolarizzazione neuronale e l'ipereccitabilità. Gli astrociti svolgono un ruolo fondamentale in questo contesto (Walz, 2000; Chen, 2000), esprimendo canali Kir2.x, incluso Kir2.1. Il processo di buffering di  $K^+$  è inficiato nel contesto epilettico, a causa di un'alterazione dell'assorbimento di  $K^+$  mediato dai canali Kir a livello astrocitario (de Lanerolle and Lee, 2005; Steinhauser *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020). Infatti, è stata riscontrata una diminuzione dell'espressione e della funzione del canale Kir2.1 in un modello murino di epilessia da complesso della sclerosi tuberosa (Jansen *et al.*, 2005). Al contrario, negli astrociti dell'ippocampo (Schröder *et al.*, 2002) i canali Kir2.1 sono drammaticamente up-regolati da convulsioni indotte dall'acido kainico (Kang *et al.*, 2008), presumibilmente come meccanismo di adattamento protettivo. Questi risultati supportano un ruolo chiave del Kir2.1 nel buffering gliale di  $K^+$  e, di conseguenza, nella patogenesi dell'epilessia.

Gli esperimenti presenti in questo elaborato sono stati condotti utilizzando una linea cellulare gliale, in particolare le U-87 MG che esprimono in maniera endogena i canali Kir. Inizialmente, è stato individuato il trascritto Kir più abbondante tra i quindici conosciuti; i risultati ottenuti mostrano che il Kir2.1 è il principale trascritto in queste cellule, seguito dal Kir4.1 (Figura 15A). Gli esperimenti condotti mediante tecniche di elettrofisiologia evidenziano la presenza di una corrente selettiva allo ione  $K^+$  a rettificazione entrante, che viene inibita da ML133, un potente inibitore del canale Kir2.1, ma non da VU0134992, inibitore del Kir4.1 (Figura 15B e 15C). Dunque, il principale canale Kir presente nelle cellule U-87 MG corrisponde all'isoforma Kir 2.1.

Per la creazione di un modello di aging neurogliale, le cellule U-87 MG sono state esposte per 24 h a 30 o 100 mM D-Gal. L'effetto del D-Gal si espleta in virtù del suo metabolismo all'interno della cellula. Infatti, esso

può essere ridotto dall'enzima galattosio reductasi per formare galactitolo, che induce stress osmotico e disfunzione mitocondriale. In alternativa, il D-Gal può essere ossidato dall'enzima galattosio ossidasi per formare  $H_2O_2$ , provocando un'alterazione dell'omeostasi redox e l'attivazione della NADPH ossidasi. Questi processi comportano l'aumento dello stress ossidativo e l'attivazione delle vie infiammatorie, condizioni tipiche dell'invecchiamento e delle patologie ad esso correlate. La dose e il tempo di somministrazione di D-Gal variano in base al citotipo considerato (*Azman and Zakaria., 2019*).

Le cellule U-87 MG incubate con 100 mM D-Gal mostrano un incremento dei marcatori di stress ossidativo (TBARS e livelli dei gruppi sulfidrilici, Figure 16B e 16C) e l'inibizione della corrente Kir2.1 (Figure 17B); al contrario, la dose pari a 30 mM non ha indotto alcuna variazione dei parametri ossidativi o funzionali considerati. Di conseguenza, la dose 100 mM risulta idonea per la creazione di un modello di invecchiamento neurogliciale *in vitro* e, pertanto, è la concentrazione scelta per tutti gli esperimenti successivi. Questi primi esperimenti supportano un nesso causale tra l'aumento dello stress ossidativo e la soppressione dell'attività di Kir2.1.

I risultati ottenuti sono stati riprodotti in un sistema eterologo di cellule NIH/3T3 in seguito all'espressione ectopica di Kir2.1 (Figura 18A e 18B) mostrando, anche in questo caso, un'inibizione della corrente in seguito all'esposizione di queste cellule a 100 mM D-Gal. In entrambe le linee cellulari, i livelli di ROS sono aumentati a partire da 6 h dopo l'esposizione al D-Gal, con un picco massimo dopo 12-24 h (Figure 22 e 23). Lo stress ossidativo conseguente si traduce non solo in un aumento della perossidazione lipidica e dell'ossidazione proteica, ma anche nell'incremento dell'attività degli enzimi antiossidanti endogeni (CAT e SOD, Figura 24). Di conseguenza, il Kir2.1 può essere considerato un potenziale bersaglio dei ROS generati in questo modello di aging. L'inibizione del Kir2.1 astrocitario mediata dallo stress ossidativo potrebbe compromettere il meccanismo di spatial buffering dello ione  $K^+$ , contribuendo al processo di epileptogenesi e/o epilessia durante l'invecchiamento.

Per comprendere il meccanismo alla base della perdita della funzione di Kir2.1 è stato verificato se lo stress ossidativo indotto dall'aging avesse un effetto diretto sul canale. Infatti, è ampiamente dimostrato che l'ossidazione diretta delle catene laterali amminoacidiche, in particolare dei residui di cisteina e metionina, può modificare profondamente l'attività dei canali ionici (*Hoshi and Heinemann, 2001; Annunziato et al., 2002; Gradogna et al., 2017*). Ad esempio, uno studio di Liu e Gutterman (2002) ha evidenziato che la produzione di specie reattive può modulare l'attività di diversi canali per lo ione  $K^+$ , come i canali  $BK_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$  e  $K_v$ , la cui attività è incrementata o, al contrario, soppressa (per i  $K_v$ ) in condizioni di stress ossidativo (*Liu and Gutterman, 2002*)

Sorprendentemente, negli esperimenti condotti, l'esposizione acuta delle cellule che esprimono Kir2.1 endogeno o ectopico a forti sostanze pro-ossidanti non ha modificato le correnti Kir2.1 rispetto alle condizioni di controllo (Figure 19A, 19B e 19C), denotando che la proteina Kir2.1, completamente ripiegata e incorporata correttamente nella membrana plasmatica, è resistente al danno funzionale da ossidazione diretta (Figura 16B).

Al contrario, l'esposizione prolungata ad un composto pro-ossidante ha comportato una significativa riduzione della corrente (Figura 19D), indicando che alla base dell'inibizione potrebbero essere coinvolti meccanismi post-trascrizionali e/o post-traduzionali. Infatti, uno studio recente di Canella e collaboratori (2023) ha mostrato che l'inibizione dell'attività del canale BK indotta dall'esposizione all'ozono era mediata da modifiche post-traduzionali che comprendevano la formazione di addotti di natura proteica. Un altro studio condotto da Kodama e collaboratori (1996) ha evidenziato che l'esposizione acuta di cellule ventricolari all'amiodarone (un farmaco antiaritmico), ha determinato una diminuzione della corrente al  $K^+$  a causa di una riduzione significativa dei livelli di mRNA del canale Kv1.5. Tuttavia, i livelli di trascritto Kir2.1 nelle cellule U-87 MG esposte a D-Gal non sono stati alterati rispetto a quelli misurati nelle cellule di controllo (Figura 28A), escludendo l'effetto diretto dello stress ossidativo sui livelli di mRNA e/o sul macchinario trascrizionale. Diversi studi hanno dimostrato che un difetto a carico della traslocazione dei canali ionici sulla membrana plasmatica può contribuire all'alterazione dell'attività di questi canali. Ad esempio, nelle cellule SH-SY5Y sottoposte ad una condizione di ipossia continua si assiste ad una diminuzione dell'espressione in membrana e ad una minore conduttanza del canale hERG, processo mediato dall'accumulo di ROS (Vaddi et al., 2019). Tuttavia, nelle nostre condizioni, la traslocazione del Kir2.1 sulla membrana plasmatica non è stato influenzato dall'esposizione al D-Gal (Figure 25 e 26). Al contrario, i livelli della proteina Kir2.1 risultano sostanzialmente ridotti rispetto alle condizioni di controllo nel sistema di espressione ectopica in seguito all'esposizione delle cellule al D-Gal (Figure 27B e 28). Di conseguenza, l'inibizione della corrente Kir2.1 in questo modello di aging neurogliale è attribuibile alla sostanziale riduzione dei livelli totali della proteina Kir2.1, probabilmente mediata dall'aumento di stress ossidativo. Questo risultato è in accordo con Jin e coautori (2020), i quali hanno dimostrato che l'esposizione di cellule muscolari lisce al metilgliosale, composto noto per indurre stress ossidativo (Todoriki et al., 2022), induce una diminuzione dell'espressione del canale  $K_{ATP}$ , riducendone l'attività.

Alla luce dei risultati ottenuti, lo stress ossidativo può essere considerato uno degli agenti causali della perdita della funzione del canale Kir2.1 durante l'invecchiamento. Questa evidenza è confermata dall'azione antiossidante di Mel. Difatti, Mel previene la riduzione della corrente Kir2.1 endogena o ectopica causata dal D-Gal (Figure 20 e 21A), ripristinandola a condizioni di controllo. L'effetto benefico di Mel è da ricercare nelle sue proprietà antiossidanti dirette e indirette. La melatonina ha un'azione diretta nei confronti dello stress ossidativo, agendo da forte scavenger dei radicali liberi, testimoniata dall'effetto preventivo sulla formazione di ROS (Figure 22 e 23). Inoltre, Mel agisce indirettamente supportando il sistema antiossidante endogeno, mediante la riduzione dei livelli di ROS e, di conseguenza, garantendo l'attività fisiologica degli enzimi CAT e SOD (Figura 24). Il miglioramento della condizione ossidativa cellulare si riflette sui livelli di proteina Kir2.1, che vengono totalmente ripristinati dal trattamento con l'antiossidante (Figura 27B). L'effetto antiossidante di Mel a concentrazioni farmacologiche è stato evidenziato in alcuni studi precedenti, in cui la dose 100  $\mu$ M (23  $\mu$ g/mL) ha prevenuto le alterazioni funzionali dello scambiatore anionico SLC4A1 causate

dallo stress ossidativo (Morabito *et al.*, 2019; Morabito *et al.*, 2020). Considerando che Mel si accumula a livello delle membrane cellulari (Venegas *et al.*, 2012), le concentrazioni locali nell'ordine di grandezza di pochi  $\mu\text{g/mL}$  appaiono realistiche in un contesto clinico. In accordo con i dati presentati in questo elaborato, diversi studi hanno dimostrato che Mel possiede proprietà neuroprotettive nel contesto dell'epilessia umana e di vari modelli animali. Ad esempio, Mel ha mostrato effetti benefici in modelli animali di crisi epilettiche indotte dal ferro (Kabuto *et al.*, 1998), dalla penicillina (Yildirim *et al.*, 2006), dal pentilentetrazolo (Solmaz *et al.*, 2009) e dal kainato (Tchekalarova *et al.*, 2013). Altri studi clinici supportano l'uso di Mel come coadiuvante delle terapie farmacologiche per migliorare la frequenza o la gravità delle convulsioni (Maghbooli *et al.*, 2023; Verma *et al.*, 2021).

## 6. Conclusioni e prospettive future

Lo stress ossidativo correlato all'invecchiamento altera la funzione e l'espressione del canale Kir2.1 nel modello di aging neurogliale proposto; l'effetto protettivo di Mel si esplica in virtù della sua potente azione antiossidante, che previene i cambiamenti ossidativi responsabili della perdita di funzione del canale.

Dunque, in questo elaborato si propone una nuova modulazione del canale Kir2.1 in condizioni di stress ossidativo. L'inibizione ossidativa dell'attività di Kir2.1 nella glia neuronale potrebbe alterare il meccanismo di spatial buffering extracellulare dello ione  $\text{K}^+$  e contribuire al processo di epileptogenesi durante l'invecchiamento. In questo contesto, Mel svolge un ruolo protettivo nel prevenire i danni molecolari e funzionali indotti dallo stress ossidativo, ripristinando completamente la conduttanza del Kir2.1. Questi risultati dimostrano che l'utilizzo di Mel nel contesto dell'epilessia rappresenta uno strumento utile a chiarire i meccanismi molecolari sottostanti la patologia e apre la strada alla formulazione di nuove strategie terapeutiche che possano contrastare il processo di epileptogenesi e astrogliosi.

Si rendono necessari ulteriori studi per chiarire ulteriormente i meccanismi fisiopatologici alla base della diminuzione dell'espressione della proteina Kir2.1. Ad esempio, è ben stabilito che lo stress ossidativo può causare la perdita della struttura secondaria o terziaria della proteina, pregiudicandone il corretto ripiegamento e la stabilità (Dahl *et al.*, 2015; Chong *et al.*, 2017); le proteine misfolded subiscono una degradazione accelerata tramite diversi meccanismi, come il sistema ubiquitina-proteasoma, regolato dallo stress ossidativo (Ciechanover *et al.*, 2015; Shang and Taylor, 2011; Gomes-Marcondes and Tisdale, 2002). Pertanto, in questo contesto è stato riportato che Mel può alleviare lo stress ossidativo del reticolo endoplasmatico e l'accumulo di proteine poliubiquitinate, migliorando quindi il ripiegamento e la stabilità delle stesse (Aouichat *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2020; Shin *et al.*, 2022). È altamente probabile che un meccanismo simile si sia verificato anche in questo modello sperimentale.

## 7. Bibliografia

- Accardi MV, Daniels BA, Brown PM, Fritschy JM, Tyagarajan SK, Bowie D. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the strength of inhibitory GABA-mediated synaptic transmission. *Nat Commun.* 2014;5:3168. doi: 10.1038/ncomms4168. PMID: 24430741; PMCID: PMC4977183.
- Adler J, Parmryd I. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry A.* 2010 Aug;77(8):733-42. doi: 10.1002/cyto.a.20896. PMID: 20653013.
- Aguiar CC, Almeida AB, Araújo PV, de Abreu RN, Chaves EM, do Vale OC, Macêdo DS, Woods DJ, Fonteles MM, Vasconcelos SM. Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:795259. doi: 10.1155/2012/795259. Epub 2012 Jul 14. PMID: 22848783; PMCID: PMC3403512.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001 Apr 20;302(2-3):141-5. doi: 10.1016/s0304-3940(01)01636-6. PMID: 11290407.
- Akyuz E, Koklu B, Uner A, Angelopoulou E, Paudel YN. Envisioning the role of inwardly rectifying potassium (Kir) channel in epilepsy. *J Neurosci Res.* 2022 Feb;100(2):413-443. doi: 10.1002/jnr.24985. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34713909.
- Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science.* 2018 Oct 12;362(6411):181-185. doi: 10.1126/science.aat0473. PMID: 30309945; PMCID: PMC6292669.
- Ambrogini P, Torquato P, Bartolini D, Albertini MC, Lattanzi D, Di Palma M, Marinelli R, Betti M, Minelli A, Cuppini R, Galli F. Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019 Jun 1;1865(6):1098-1112. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.01.026. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30703511.
- Annunziato L, Pannaccione A, Cataldi M, Secondo A, Castaldo P, Di Renzo G, Tagliatalata M. Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? *Neurobiol Aging.* 2002 Sep-Oct;23(5):819-34. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00069-6. PMID: 12392785.
- Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MS, Ashcroft FM. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *EMBO J.* 2005 Jan 26;24(2):229-39. doi: 10.1038/sj.emboj.7600487. Epub 2005 Jan 13. PMID: 15650751; PMCID: PMC545803.

- Anumonwo JM, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jan;48(1):45-54. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.013. Epub 2009 Aug 22. PMID: 19703462; PMCID: PMC2813336.
- Aouichat S, Navarro-Alarcon M, Alarcón-Guijo P, Salagre D, Ncir M, Zourgui L, Agil A. Melatonin Improves Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated IRE1 $\alpha$  Pathway in Zucker Diabetic Fatty Rat. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021 Mar 8;14(3):232. doi: 10.3390/ph14030232. PMID: 33800157; PMCID: PMC8001258.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999 May;22(5):208-15. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01349-6. PMID: 10322493.
- Arican N, Kaya M, Kalayci R, Uzun H, Ahishali B, Bilgic B, Elmas I, Kucuk M, Gurses C, Uzun M. Effects of lipopolysaccharide on blood-brain barrier permeability during pentylenetetrazole-induced epileptic seizures in rats. *Life Sci.* 2006 May 30;79(1):1-7. doi: 10.1016/j.lfs.2005.12.035. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16434059.
- Azman KF, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology.* 2019 Dec;20(6):763-782. doi: 10.1007/s10522-019-09837-y. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31538262.
- Barros DO, Xavier SM, Barbosa CO, Silva RF, Freitas RL, Maia FD, Oliveira AA, Freitas RM, Takahashi RN. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 2007 Apr 18;416(3):227-30. doi: 10.1016/j.neulet.2007.01.057. Epub 2007 Jan 30. PMID: 17383094.
- Bedner P, Steinhäuser C. Neuron-glia interaction in epilepsy. *J Neurosci Res.* 2016 Sep;94(9):779-80. doi: 10.1002/jnr.23800. Epub 2016 Jun 18. PMID: 27316466.
- Beghi E, Giussani G, Sander JW. The natural history and prognosis of epilepsy. *Epileptic Disord.* 2015 Sep;17(3):243-53. doi: 10.1684/epd.2015.0751. PMID: 26234761.
- Beghi E, Giussani G. Aging and the Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology.* 2018;51(3-4):216-223. doi: 10.1159/000493484. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30253417.
- Bélanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(3):281-95. doi: 10.31887/DCNS.2009.11.3/mbelanger. PMID: 19877496; PMCID: PMC3181926.
- Bellot-Saez A, Kékesi O, Morley JW, Buskila Y. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K<sup>+</sup> spatial buffering. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 Jun;77:87-97. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.03.002. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28279812.
- Bodles AM, Barger SW. Cytokines and the aging brain - what we don't know might help us. *Trends Neurosci.* 2004 Oct;27(10):621-6. doi: 10.1016/j.tins.2004.07.011. PMID: 15374674.

- Borowicz-Reutt KK, Czuczwar SJ. Role of oxidative stress in epileptogenesis and potential implications for therapy. *Pharmacol Rep.* 2020 Oct;72(5):1218-1226. doi: 10.1007/s43440-020-00143-w. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32865811; PMCID: PMC7550371.
- Brasko C, Butt AM. Expression of Kir2.1 Inward Rectifying Potassium Channels in Optic Nerve Glia: Evidence for Heteromeric Association with Kir4.1 and Kir5.1. *Neuroglia.* 2018; 1(1):176-187. doi:10.3390/neuroglia1010012
- Brodwick MS. Ion channels: membrane potential-dependent ion channels in cell membrane. *Science.* 1983 Dec 9;222(4628):1115-6. doi: 10.1126/science.222.4628.1115. PMID: 17747381.
- Brzęczek M, Słonka K, Hyla-Klekot L. Melatonin-a pleiotropic hormone. *Pediatr Med Rodz* 2016; 12(2):127-133. doi: 10.15557/PiMR.2016.0011
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 2002 Jan 1;22(1):183-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002. PMID: 11756501; PMCID: PMC6757596.
- Canella R, Benedusi M, Vallese A, Pecorelli A, Guiotto A, Ferrara F, Rispoli G, Cervellati F, Valacchi G. The role of potassium current in the pulmonary response to environmental oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* 2023 Mar 15;737:109534. doi: 10.1016/j.abb.2023.109534. Epub 2023 Feb 3. PMID: 36740034.
- Cantu D, Schaack J, Patel M. Oxidative inactivation of mitochondrial aconitase results in iron and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated neurotoxicity in rat primary mesencephalic cultures. *PLoS One.* 2009 Sep 18;4(9):e7095. doi: 10.1371/journal.pone.0007095. PMID: 19763183; PMCID: PMC2738973.
- Cardenas-Rodriguez N, Huerta-Gertrudis B, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, Bandala C, Carmona-Aparicio L, Coballase-Urrutia E. Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan 14;14(1):1455-76. doi: 10.3390/ijms14011455. PMID: 23344052; PMCID: PMC3565330.
- Cerbai F, Lana D, Nosi D, Petkova-Kirova P, Zecchi S, Brothers HM, Wenk GL, Giovannini MG. The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS One.* 2012;7(9):e45250. doi: 10.1371/journal.pone.0045250. Epub 2012 Sep 18. PMID: 23028880; PMCID: PMC3445467.
- Chen KC, Nicholson C. Spatial buffering of potassium ions in brain extracellular space. *Biophys J.* 2000 Jun;78(6):2776-97. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76822-6. PMID: 10827962; PMCID: PMC1300867.
- Chitimus DM, Popescu MR, Voiculescu SE, Panaitescu AM, Pavel B, Zagrean L, Zagrean AM. Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules.* 2020 Aug 20;10(9):1211. doi: 10.3390/biom10091211. PMID: 32825327; PMCID: PMC7563541.

- Chong WC, Shastri MD, Eri R. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2017 Apr 5;18(4):771. doi: 10.3390/ijms18040771. PMID: 28379196; PMCID: PMC5412355.
- Chuang YC, Chang AY, Lin JW, Hsu SP, Chan SH. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia.* 2004 Oct;45(10):1202-9. doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.18204.x. PMID: 15461674.
- Ciechanover A, Kwon YT. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med.* 2015 Mar 13;47(3):e147. doi: 10.1038/emm.2014.117. PMID: 25766616; PMCID: PMC4351408.
- Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and Energy Metabolism of the Brain. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Chapter 31.
- Colden-Stanfield M. Adhesion-dependent modulation of macrophage K<sup>+</sup> channels. *Adv Exp Med Biol.* 2010;674:81-94. doi: 10.1007/978-1-4419-6066-5\_8. PMID: 20549942.
- Connors BW, Ransom BR, Kunis DM, Gutnick MJ. Activity-dependent K<sup>+</sup> accumulation in the developing rat optic nerve. *Science.* 1982 Jun 18;216(4552):1341-3. doi: 10.1126/science.7079771. PMID: 7079771.
- Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orbán G, Errington AC, Lorincz ML, Gould TM, Carter DA, Crunelli V. Enhanced tonic GABA<sub>A</sub> inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med.* 2009 Dec;15(12):1392-8. doi: 10.1038/nm.2058. Epub 2009 Nov 22. PMID: 19966779; PMCID: PMC2824149.
- Costello DJ, Delanty N. Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? *Expert Rev Neurother.* 2004 May;4(3):541-53. doi: 10.1586/14737175.4.3.541. PMID: 15853548.
- Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct.* 2012;2012:646354. doi: 10.1155/2012/646354. Epub 2011 Oct 2. PMID: 21977319; PMCID: PMC3184498.
- Dahl JU, Gray MJ, Jakob U. Protein quality control under oxidative stress conditions. *J Mol Biol.* 2015 Apr 10;427(7):1549-63. doi: 10.1016/j.jmb.2015.02.014. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25698115; PMCID: PMC4357566.
- Dambach H, Hinkerohe D, Prochnow N, Stienen MN, Moinfar Z, Haase CG, Hufnagel A, Faustmann PM. Glia and epilepsy: experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. *Epilepsia.* 2014 Jan;55(1):184-92. doi: 10.1111/epi.12473. Epub 2013 Dec 2. PMID: 24299259.
- David Y, Cacheaux LP, Ivens S, Lapilover E, Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *J*

- Neurosci. 2009 Aug 26;29(34):10588-99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2323-09.2009. PMID: 19710312; PMCID: PMC2875068.
- de Graaf RA, Mason GF, Patel AB, Rothman DL, Behar KL. Regional glucose metabolism and glutamatergic neurotransmission in rat brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 24;101(34):12700-5. doi: 10.1073/pnas.0405065101. Epub 2004 Aug 13. PMID: 15310848; PMCID: PMC515118.
  - de Lanerolle NC, Lee TS. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2005 Sep;7(2):190-203. doi: 10.1016/j.yebeh.2005.06.003. PMID: 16098816.
  - de Lima E, Soares JM Jr, del Carmen Sanabria Garrido Y, Gomes Valente S, Priel MR, Chada Baracat E, Abrão Cavalheiro E, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Amado D. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. *Brain Res*. 2005 May 10;1043(1-2):24-31. doi: 10.1016/j.brainres.2005.02.027. PMID: 15862514.
  - de Moraes VCS, Bernardinelli E, Zocal N, Fernandez JA, Nofziger C, Castilho AM, Sartorato EL, Paulmichl M, Dossena S. Reduction of Cellular Expression Levels Is a Common Feature of Functionally Affected Pendrin (SLC26A4) Protein Variants. *Mol Med*. 2016 Sep;22:41-53. doi: 10.2119/molmed.2015.00226. Epub 2016 Jan 4. PMID: 26752218; PMCID: PMC5004711.
  - Dell'Orco JM, Pulst SM, Shakkottai VG. Potassium channel dysfunction underlies Purkinje neuron spiking abnormalities in spinocerebellar ataxia type 2. *Hum Mol Genet*. 2017 Oct 15;26(20):3935-3945. doi: 10.1093/hmg/ddx281. PMID: 29016852; PMCID: PMC5886219.
  - Delmoe M, Secomb TW. Conditions for Kir-induced bistability of membrane potential in capillary endothelial cells. *Math Biosci*. 2023 Jan;355:108955. doi: 10.1016/j.mbs.2022.108955. Epub 2022 Dec 10. PMID: 36513149; PMCID: PMC9845148.
  - Derst C, Karschin C, Wischmeyer E, Hirsch JR, Preisig-Müller R, Rajan S, Engel H, Grzeschik K, Daut J, Karschin A. Genetic and functional linkage of Kir5.1 and Kir2.1 channel subunits. *FEBS Lett*. 2001 Mar 2;491(3):305-11. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02202-5. PMID: 11240146.
  - Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001 Nov;36(2):180-90. doi: 10.1002/glia.1107. PMID: 11596126.
  - Döring F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties. *J Neurosci*. 1998 Nov 1;18(21):8625-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-21-08625.1998. PMID: 9786970; PMCID: PMC6793533.
  - During MJ, Fried I, Leone P, Katz A, Spencer DD. Direct measurement of extracellular lactate in the human hippocampus during pontaneous seizures. *J. Neurochem.* (62): 2356–2361. 1994, doi:10.1046/j.14714159.1994.62062356.x

- Eastman CL, D'Ambrosio R, Ganesh T. Modulating neuroinflammation and oxidative stress to prevent epilepsy and improve outcomes after traumatic brain injury. *Neuropharmacology*. 2020 Aug 1;172:107907. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107907. Epub 2019 Dec 6. PMID: 31837825; PMCID: PMC7274911.
- Eid T, Tu N, Lee TS, Lai JC. Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy. *Neurochem Int*. 2013 Dec;63(7):670-81. doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.008. Epub 2013 Jun 18. PMID: 23791709; PMCID: PMC3825815.
- Fabisiak T, Patel M. Crosstalk between neuroinflammation and oxidative stress in epilepsy. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Aug 10;10:976953. doi: 10.3389/fcell.2022.976953. PMID: 36035987; PMCID: PMC9399352.
- Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppersberg JP. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J*. 1996 Aug 15;15(16):4093-9. PMID: 8861938; PMCID: PMC452131.
- Fan C, Feng J, Tang C, Zhang Z, Feng Y, Duan W, Zhai M, Yan Z, Zhu L, Feng L, Zhu H, Luo E. Melatonin suppresses ER stress-dependent proapoptotic effects via AMPK in bone mesenchymal stem cells during mitochondrial oxidative damage. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Oct 15;11(1):442. doi: 10.1186/s13287-020-01948-5. PMID: 33059742; PMCID: PMC7560057.
- Fernandes CAH, Zuniga D, Fagnen C, Kugler V, Scala R, Péhau-Arnaudet G, Wagner R, Perahia D, Bendahhou S, Vénien-Bryan C. Cryo-electron microscopy unveils unique structural features of the human Kir2.1 channel. *Sci Adv*. 2022 Sep 23;8(38):eabq8489. doi: 10.1126/sciadv.abq8489. Epub 2022 Sep 23. PMID: 36149965; PMCID: PMC9506730.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation*. 1998 May-Aug;5(3-4):143-59. doi: 10.1159/000026331. PMID: 9730680.
- Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature*. 2007 Aug 16;448(7155):767-74. doi: 10.1038/nature05985. PMID: 17700693.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Apr;55(4):475-82. doi: 10.1111/epi.12550. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24730690.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005 Apr;46(4):470-2. doi: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x. PMID: 15816939.

- Fisher RS. Cellular mechanisms of the epilepsies. In: Hopkins A, Shorvon S, Cascino G, eds. *Epilepsy*, 2nd edn. London: Chapman & Hall; 1995: 35–58.
- Freitas RM. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. *Neurosci Lett*. 2009 Oct 25;462(3):225-9. doi: 10.1016/j.neulet.2009.07.037. Epub 2009 Jul 16. PMID: 19616071.
- Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 1970 Aug 25;245(16):4053-7. PMID: 5496991.
- Gadea A, López-Colomé AM. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J Neurosci Res*. 2001 Mar 15;63(6):461-8. doi: 10.1002/jnr.1040. PMID: 11241581.
- Galano A, Medina ME, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis. *J Pineal Res*. 2015 Jan;58(1):107-16. doi: 10.1111/jpi.12196. Epub 2014 Dec 12. PMID: 25424557.
- Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. *Molecules*. 2018 Feb 27;23(3):530. doi: 10.3390/molecules23030530. PMID: 29495460; PMCID: PMC6017920.
- Galanopoulou AS. GABA(A) receptors in normal development and seizures: friends or foes? *Curr Neuropharmacol*. 2008 Mar;6(1):1-20. doi: 10.2174/157015908783769653. PMID: 19305785; PMCID: PMC2645547.
- Gao J, Chi ZF, Liu XW, Shan PY, Wang R. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rat. *Neurosci Lett*. 2007 Jan 10;411(2):152-7. doi: 10.1016/j.neulet.2006.10.022. Epub 2006 Nov 7. PMID: 17092649.
- Geronzi U, Lotti F, Grosso S. Oxidative stress in epilepsy. *Expert Rev Neurother*. 2018 May;18(5):427-434. doi: 10.1080/14737175.2018.1465410. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29651881.
- Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J Pharm Pharmacol*. 2001 Oct;53(10):1393-401. doi: 10.1211/0022357011777747. PMID: 11697548.
- Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*. 2017 Sep 26;398(10):1095-1108. doi: 10.1515/hsz-2017-0131. PMID: 28384098.
- Gomes-Marcondes MC, Tisdale MJ. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett*. 2002 Jun 6;180(1):69-74. doi: 10.1016/s0304-3835(02)00006-x. PMID: 11911972.

- González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, Latorre R. K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol*. 2012 Jul;2(3):2087-149. doi: 10.1002/cphy.c110047. PMID: 23723034.
- Gradogna A, Gavazzo P, Boccaccio A, Pusch M. Subunit-dependent oxidative stress sensitivity of LRRC8 volume-regulated anion channels. *The Journal of physiology*. 2017;595(21):6719-33.
- Gunata M, Parlakpinar H, Acet HA. Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. *Rev Neurol (Paris)*. 2020 Mar;176(3):148-165. doi: 10.1016/j.neurol.2019.07.025. Epub 2019 Nov 11. PMID: 31718830.
- Hager NA, McAtee CK, Lesko MA, O'Donnell AF. Inwardly Rectifying Potassium Channel Kir2.1 and its "Kir-ious" Regulation by Protein Trafficking and Roles in Development and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Feb 9;9:796136. doi: 10.3389/fcell.2021.796136. PMID: 35223865; PMCID: PMC8864065.
- Haj-Yasein NN, Jensen V, Vindedal GF, Gundersen GA, Klungland A, Ottersen OP, Hvalby O, Nagelhus EA. Evidence that compromised K<sup>+</sup> spatial buffering contributes to the epileptogenic effect of mutations in the human Kir4.1 gene (KCNJ10). *Glia*. 2011 Nov;59(11):1635-42. doi: 10.1002/glia.21205. Epub 2011 Jul 11. PMID: 21748805.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*. 2007 Jun 13;27(24):6473-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007. PMID: 17567808; PMCID: PMC6672436.
- Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:335-55. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135843. PMID: 20148679; PMCID: PMC3117429.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006 Jun;97(6):1634-58. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x. PMID: 16805774.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992 Nov;59(5):1609-23. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x. Erratum in: *J Neurochem*. 2012 Mar;120(5):850. PMID: 1402908.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981 Aug;391(2):85-100. doi: 10.1007/BF00656997. PMID: 6270629.
- Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*. 2011 Mar;93(3):350-84. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.12.004. Epub 2010 Dec 28. PMID: 21193011.
- Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res*. 2018 Nov;65(4):e12525. doi: 10.1111/jpi.12525. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30242884.

- Hatcher-Solis C, Fribourg M, Spyridaki K, Younkin J, Ellaithy A, Xiang G, Liapakis G, Gonzalez-Maeso J, Zhang H, Cui M, Logothetis DE. G protein-coupled receptor signaling to Kir channels in *Xenopus* oocytes. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014;15(10):987-95. doi: 10.2174/1389201015666141031111916. PMID: 25374032; PMCID: PMC4426293.
- Hauser WA. Seizure disorders: the changes with age. *Epilepsia.* 1992;33 Suppl 4:S6-14. doi: 10.1111/j.1528-1157.1992.tb06222.x. PMID: 1425495.
- Heinemann U, Lux HD. Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain Res.* 1977 Jan 21;120(2):231-49. doi: 10.1016/0006-8993(77)90903-9. PMID: 832122.
- Helms G, Ciumas C, Kyaga S, Savic I. Increased thalamus levels of glutamate and glutamine (Glx) in patients with idiopathic generalised epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006 Apr;77(4):489-94. doi: 10.1136/jnnp.2005.074682. PMID: 16543528; PMCID: PMC2077494.
- Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia.* 2014 Sep;62(9):1377-91. doi: 10.1002/glia.22683. Epub 2014 May 7. PMID: 24807023.
- Hermida-Ameijeiras A, Méndez-Alvarez E, Sánchez-Iglesias S, Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. *Neurochem Int.* 2004 Jul;45(1):103-16. doi: 10.1016/j.neuint.2003.11.018. PMID: 15082228.
- Heuser K, Szokol K, Taubøll E. The role of glial cells in epilepsy. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2014 Jan 14;134(1):37-41. English, Norwegian. doi: 10.4045/tidsskr.12.1344. Erratum in: *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2014 Feb 11;134(3):273. PMID: 24429754.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 2010 Jan;90(1):291-366. doi: 10.1152/physrev.00021.2009. PMID: 20086079.
- Hickie IB, Rogers NL. Novel melatonin-based therapies: potential advances in the treatment of major depression. *Lancet.* 2011 Aug 13;378(9791):621-31. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60095-0. Epub 2011 May 17. PMID: 21596429.
- Hill CL, Stephens GJ. An Introduction to Patch Clamp Recording. *Methods Mol Biol.* 2021;2188:1-19. doi: 10.1007/978-1-0716-0818-0\_1. PMID: 33119844.
- Hille B, Schwarz W. Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol.* 1978 Oct;72(4):409-42. doi: 10.1085/jgp.72.4.409. PMID: 722275; PMCID: PMC2228548.
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.* 2009 Jan;89(1):193-277. doi: 10.1152/physrev.00037.2007. PMID: 19126758.

- Horn R. Diffusion of nystatin in plasma membrane is inhibited by a glass-membrane seal. *Biophys J*. 1991 Aug;60(2):329-33. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82057-4. Erratum in: *Biophys J* 1991 Oct;60(4):985. PMID: 1912275; PMCID: PMC1260068.
- Hoshi T, Heinemann S. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol*. 2001 Feb 15;531(Pt 1):1-11. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0001j.x. PMID: 11179387; PMCID: PMC2278441.
- Hou J, Yun Y, Xue J, Sun M, Kim S. D-galactose induces astrocytic aging and contributes to astrocytoma progression and chemoresistance via cellular senescence. *Mol Med Rep*. 2019 Nov;20(5):4111-4118. doi: 10.3892/mmr.2019.10677. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31545444; PMCID: PMC6797969.
- Howe MW, Feig SL, Osting SM, Haberly LB. Cellular and subcellular localization of Kir2.1 subunits in neurons and glia in piriform cortex with implications for K<sup>+</sup> spatial buffering. *J Comp Neurol*. 2008 Feb 10;506(5):877-93. doi: 10.1002/cne.21534. PMID: 18076085.
- Inanobe A, Matsuura T, Nakagawa A, Kurachi Y. Structural diversity in the cytoplasmic region of G protein-gated inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Channels (Austin)*. 2007 Jan-Feb;1(1):39-45. Epub 2007 Jan 16. PMID: 19151589.
- Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1583-96. doi: 10.1089/ars.2006.8.1583. PMID: 16987013.
- Izykowska I, Cegielski M, Gebarowska E, Podhorska-Okolow M, Piotrowska A, Zabel M, Dziegiel P. Effect of melatonin on human keratinocytes and fibroblasts subjected to UVA and UVB radiation *In vitro*. *In Vivo*. 2009 Sep-Oct;23(5):739-45. PMID: 19779109.
- Jansen LA, Uhlmann EJ, Crino PB, Gutmann DH, Wong M. Epileptogenesis and reduced inward rectifier potassium current in tuberous sclerosis complex-1-deficient astrocytes. *Epilepsia*. 2005 Dec;46(12):1871-80. doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.00289.x. PMID: 16393152.
- Jin X, Wu Y, Cui N, Jiang C, Li SS. Methylglyoxal-induced miR-223 suppresses rat vascular KATP channel activity by downregulating Kir6.1 mRNA in carbonyl stress. *Vascul Pharmacol*. 2020 May-Jun;128-129:106666. doi: 10.1016/j.vph.2020.106666. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32151743.
- Johnson EW, de Lanerolle NC, Kim JH, Sundaresan S, Spencer DD, Mattson RH, Zoghbi SS, Baldwin RM, Hoffer PB, Seibyl JP, et al. "Central" and "peripheral" benzodiazepine receptors: opposite changes in human epileptogenic tissue. *Neurology*. 1992 Apr;42(4):811-5. doi: 10.1212/wnl.42.4.811. PMID: 1314342.
- Kabuto H, Yokoi I, Ogawa N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. *Epilepsia*. 1998 Mar;39(3):237-43. doi: 10.1111/j.1528-1157.1998.tb01367.x. PMID: 9578039.

- Kang SJ, Cho SH, Park K, Yi J, Yoo SJ, Shin KS. Expression of Kir2.1 channels in astrocytes under pathophysiological conditions. *Mol Cells*. 2008 Feb 29;25(1):124-30. PMID: 18319624.
- Kann O, Kovács R, Njunting M, Behrens CJ, Otáhal J, Lehmann TN, Gabriel S, Heinemann U. Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans. *Brain*. 2005 Oct;128(Pt 10):2396-407. doi: 10.1093/brain/awh568. Epub 2005 Jun 15. PMID: 15958506.
- Karmažinová M, Lacinová L. Measurement of cellular excitability by whole cell patch clamp technique. *Physiol Res*. 2010;59 Suppl 1:S1-S7. doi: 10.33549/physiolres.932000. PMID: 20626213.
- Katz B. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 3: 285-299, 1949.
- Katzman R. Maintenance of a constant brain extracellular potassium. *Fed Proc*. 1976 May 1;35(6):1244-7. PMID: 770198.
- Kerr DS, Campbell LW, Applegate MD, Brodish A, Landfield PW. Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *J Neurosci*. 1991 May;11(5):1316-24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-05-01316.1991. PMID: 2027050; PMCID: PMC6575317.
- Kharade SV, Kurata H, Bender AM, Blobaum AL, Figueroa EE, Duran A, Kramer M, Days E, Vinson P, Flores D, Satlin LM, Meiler J, Weaver CD, Lindsley CW, Hopkins CR, Denton JS. Discovery, Characterization, and Effects on Renal Fluid and Electrolyte Excretion of the Kir4.1 Potassium Channel Pore Blocker, VU0134992. *Mol Pharmacol*. 2018 Aug;94(2):926-937. doi: 10.1124/mol.118.112359. Epub 2018 Jun 12. PMID: 29895592; PMCID: PMC6041953.
- Khaspekov LG, Frumkina LE. Molecular Mechanisms Mediating Involvement of Glial Cells in Brain Plastic Remodeling in Epilepsy. *Biochemistry (Mosc)*. 2017 Mar;82(3):380-391. doi: 10.1134/S0006297917030178. PMID: 28320280.
- Kim JE, Yeo SI, Ryu HJ, Kim MJ, Kim DS, Jo SM, Kang TC. Astroglial loss and edema formation in the rat piriform cortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *J Comp Neurol*. 2010 Nov 15;518(22):4612-28. doi: 10.1002/cne.22482. PMID: 20886625.
- Kim JH, Jang BG, Choi BY, Kim HS, Sohn M, Chung TN, Choi HC, Song HK, Suh SW. Post-treatment of an NADPH oxidase inhibitor prevents seizure-induced neuronal death. *Brain Res*. 2013 Mar 7;1499:163-72. doi: 10.1016/j.brainres.2013.01.007. Epub 2013 Jan 10. PMID: 23313582.
- Kodama I, Kamiya K, Honjo H, Toyama J. Acute and chronic effects of amiodarone on mammalian ventricular cells. *Jpn Heart J*. 1996 Sep;37(5):719-30. doi: 10.1536/ihj.37.719. PMID: 8973384.
- Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia*. 2002 Sep;39(3):292-303. doi: 10.1002/glia.10112. PMID: 12203395.

- Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*. 2004;129(4):1045-56. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.06.008. PMID: 15561419; PMCID: PMC2322935.
- Kovács R, Heinemann U, Steinhäuser C. Mechanisms underlying blood-brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: role of astroglia. *Epilepsia*. 2012 Nov;53 Suppl 6:53-9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03703.x. PMID: 23134496.
- Krumova K, Cosa G. Overview of reactive oxygen species. In *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*; Nonell, S., Cristina Flors, C., Eds.; The Royal Society of Chemistry: London, UK, 2016; (1):1–21.
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol*. 1966 Jul;29(4):768-87. doi: 10.1152/jn.1966.29.4.768. PMID: 5966434.
- Kume-Kick J, Mazel T, Vorisek I, Hrabětová S, Tao L, Nicholson C. Independence of extracellular tortuosity and volume fraction during osmotic challenge in rat neocortex. *J Physiol*. 2002 Jul 15;542(Pt 2):515-27. doi: 10.1113/jphysiol.2002.017541. PMID: 12122149; PMCID: PMC2290424.
- Lalanne S, Fougereux-Leurent C, Anderson GM, Schroder CM, Nir T, Chokron S, Delorme R, Claustrat B, Bellissant E, Kermarrec S, Franco P, Denis L, Tordjman S. Melatonin: From Pharmacokinetics to Clinical Use in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 2;22(3):1490. doi: 10.3390/ijms22031490. PMID: 33540815; PMCID: PMC7867370.
- Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr*. 2007 Oct;26(5 Suppl):613S-623S. doi: 10.1080/07315724.2007.10719667. PMID: 17921474.
- Leis JA, Bekar LK, Walz W. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia*. 2005 Jun;50(4):407-416. doi: 10.1002/glia.20145. PMID: 15846795.
- Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Mar;28(3):468-81. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600546. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17726492.
- Liang LP, Patel M. Mitochondrial oxidative stress and increased seizure susceptibility in *Sod2*(-/+)  
mice. *Free Radic Biol Med*. 2004 Mar 1;36(5):542-54. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.029. PMID: 14980699.
- Liang LP, Patel M. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 15;40(2):316-22. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.026. Epub 2005 Oct 14. PMID: 16413413.

- Liang LP, Waldbaum S, Rowley S, Huang TT, Day BJ, Patel M. Mitochondrial oxidative stress and epilepsy in SOD2 deficient mice: attenuation by a lipophilic metalloporphyrin. *Neurobiol Dis.* 2012 Mar;45(3):1068-76. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.025. Epub 2011 Dec 16. PMID: 22200564; PMCID: PMC3418969.
- Liu W, Wei Z, Ma H, Cai A, Liu Y, Sun J, DaSilva NA, Johnson SL, Kirschenbaum LJ, Cho BP, Dain JA, Rowley DC, Shaikh ZA, Seeram NP. Anti-glycation and anti-oxidative effects of a phenolic-enriched maple syrup extract and its protective effects on normal human colon cells. *Food Funct.* 2017 Feb 22;8(2):757-766. doi: 10.1039/c6fo01360k. PMID: 28112327; PMCID: PMC5818990.
- Liu Y, Gutterman DD. Oxidative stress and potassium channel function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002 Apr;29(4):305-11. doi: 10.1046/j.1440-1681.2002.03649.x. PMID: 11985541.
- Liu Y, Shen X, Zhang Y, Zheng X, Cepeda C, Wang Y, Duan S, Tong X. Interactions of glial cells with neuronal synapses, from astrocytes to microglia and oligodendrocyte lineage cells. *Glia.* 2023 Jun;71(6):1383-1401. doi: 10.1002/glia.24343. Epub 2023 Feb 17. PMID: 36799296.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- Lopatin AN, Nichols CG. [K<sup>+</sup>] dependence of open-channel conductance in cloned inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1). *Biophys J.* 1996 Aug;71(2):682-94. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79268-8. PMID: 8842207; PMCID: PMC1233525.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039. PMID: 23746838; PMCID: PMC3836174.
- Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* 2010 Oct;24(10):3603-24. doi: 10.1096/fj.10-154450. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20534884.
- Łukawski K, Czuczwar SJ. Oxidative Stress and Neurodegeneration in Animal Models of Seizures and Epilepsy. *Antioxidants (Basel).* 2023 May 5;12(5):1049. doi: 10.3390/antiox12051049. PMID: 37237916; PMCID: PMC10215527.
- Luo J, Mills K, le Cessie S, Noordam R, van Heemst D. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Res Rev.* 2020 Jan;57:100982. doi: 10.1016/j.arr.2019.100982. Epub 2019 Nov 13. PMID: 31733333.
- Lv WJ, Liu C, Yu LZ, Zhou JH, Li Y, Xiong Y, Guo A, Chao LM, Qu Q, Wei GW, Tang XG, Yin YL, Guo SN. Melatonin Alleviates Neuroinflammation and Metabolic Disorder in DSS-Induced Depression Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Jul 30;2020:1241894. doi: 10.1155/2020/1241894. PMID: 32802257; PMCID: PMC7415091.
- Madadi A, Wolfart J, Lange F, Brehme H, Linnebacher M, Bräuer AU, Büttner A, Freiman T, Henker C, Einsle A, Rackow S, Köhling R, Kirschstein T, Müller S. Correlation between Kir4.1 expression

- and barium-sensitive currents in rat and human glioma cell lines. *Neurosci Lett*. 2021 Jan 10;741:135481. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135481. Epub 2020 Nov 5. PMID: 33161102.
- Maghbooli M, Alyan NajafAbadi S, MalekMahmoudi G, Molseghi MH. Effect of add-on melatonin on seizure outcomes and quality of sleep in epilepsy with idiopathic generalized tonic-clonic seizures alone in adult patients: Cross-sectional, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Brain Behav*. 2023 Feb;13(2):e2860. doi: 10.1002/brb3.2860. Epub 2023 Jan 1. PMID: 36588283; PMCID: PMC9927842.
  - Mahmood D. Pleiotropic Effects of Melatonin. *Drug Res (Stuttg)*. 2019 Feb;69(2):65-74. doi: 10.1055/a-0656-6643. Epub 2018 Jul 30. PMID: 30060265.
  - Manford M. Recent advances in epilepsy. *J Neurol*. 2017 Aug;264(8):1811-1824. doi: 10.1007/s00415-017-8394-2. Epub 2017 Jan 24. PMID: 28120042; PMCID: PMC5533817.
  - Mao L, Franke J. Hormesis in aging and neurodegeneration-a prodigy awaiting dissection. *Int J Mol Sci*. 2013 Jun 25;14(7):13109-28. doi: 10.3390/ijms140713109. PMID: 23799363; PMCID: PMC3742177.
  - Mareš J, Stopka P, Nohejlová K, Rokyta R. Oxidative stress induced by epileptic seizure and its attenuation by melatonin. *Physiol Res*. 2013;62(Suppl 1):S67-74. doi: 10.33549/physiolres.932576. PMID: 24329705.
  - Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Nov 15;827(1):65-75. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.04.023. Epub 2005 Sep 23. PMID: 16183338.
  - Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Dec;79(24):7634-8. doi: 10.1073/pnas.79.24.7634. PMID: 6961438; PMCID: PMC347402.
  - Martinc B, Grabnar I, Vovk T. The role of reactive species in epileptogenesis and influence of antiepileptic drug therapy on oxidative stress. *Curr Neuropharmacol*. 2012 Dec;10(4):328-43. doi: 10.2174/157015912804143504. PMID: 23730257; PMCID: PMC3520043. Shekh-Ahmad T, Kovac S, Abramov AY, Walker MC. Reactive oxygen species in status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2019 Dec;101(Pt B):106410. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.07.011. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31378559.
  - Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature*. 1987 Jan 8-14;325(7000):156-9. doi: 10.1038/325156a0. PMID: 2433601.
  - McDonald JW, Garofalo EA, Hood T, Sackellares JC, Gilman S, McKeever PE, Troncoso JC, Johnston MV. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 1991 May;29(5):529-41. doi: 10.1002/ana.410290513. PMID: 1650160.

- Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT, Mizioro H, Epstein CJ, Wallace DC. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 2;96(3):846-51. doi: 10.1073/pnas.96.3.846. PMID: 9927656; PMCID: PMC15313.
- Mendanha SA, Anjos JL, Silva AH, Alonso A. Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. *Braz J Med Biol Res*. 2012 Jun;45(6):473-81. doi: 10.1590/s0100-879x2012007500050. Epub 2012 Apr 5. PMID: 22473321; PMCID: PMC3854297.
- Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, Rodríguez-Martínez E, Gómez PY. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:293689. doi: 10.1155/2014/293689. Epub 2014 Dec 29. PMID: 25614776; PMCID: PMC4295154.
- Meyer JS, Gotoh F, Favale E. Cerebral metabolism during epileptic seizures in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1966 Jul;21(1):10-22. doi: 10.1016/0013-4694(66)90054-x. PMID: 4165360.
- Mitterauer BJ. Significance of the astrocyte domain organization for qualitative information structuring in the brain. *Adv. biosci. biotechnol.* 2010 Dec;1(5):391-397. doi: 10.4236/abb.2010.15052.
- Morabito R, Remigante A, Marino A. Melatonin Protects Band 3 Protein in Human Erythrocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress. *Molecules*. 2019 Jul 28;24(15):2741. doi: 10.3390/molecules24152741. PMID: 31357737; PMCID: PMC6695615.
- Morabito R, Remigante A, Marino A. Melatonin Protects Band 3 Protein in Human Erythrocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress. *Molecules*. 2019 Jul 28;24(15):2741. doi: 10.3390/molecules24152741. PMID: 31357737; PMCID: PMC6695615.
- Morabito R, Remigante A, Spinelli S, Vitale G, Trichilo V, Loddo S, Marino A. High Glucose Concentrations Affect Band 3 Protein in Human Erythrocytes. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Apr 27;9(5):365. doi: 10.3390/antiox9050365. PMID: 32349441; PMCID: PMC7278607.
- Morimoto M, Satomura S, Hashimoto T, Ito E, Kyotani S. Oxidative Stress Measurement and Prediction of Epileptic Seizure in Children and Adults With Severe Motor and Intellectual Disabilities. *J Clin Med Res*. 2016 Jun;8(6):437-44. doi: 10.14740/jocmr2534w. Epub 2016 May 25. PMID: 27222671; PMCID: PMC4852776.
- Newman EA. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci*. 1993 Aug;13(8):3333-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-08-03333.1993. PMID: 8340811; PMCID: PMC6576530.

- Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*. 2010 May;51(5):883-90. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x. Epub 2010 Jan 7. PMID: 20067507; PMCID: PMC3410521.
- Nicholson C, Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci*. 1998 May;21(5):207-15. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01261-2. PMID: 9610885.
- Nishida M, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J*. 2007 Sep 5;26(17):4005-15. doi: 10.1038/sj.emboj.7601828. Epub 2007 Aug 16. PMID: 17703190; PMCID: PMC1994128.
- Ogura K, Ogawa M, Yoshida M. Effects of ageing on microglia in the normal rat brain: immunohistochemical observations. *Neuroreport*. 1994 Jun 2;5(10):1224-6. doi: 10.1097/00001756-199406020-00016. PMID: 7919169.
- Ohno Y, Kinboshi M, Shimizu S. Inwardly Rectifying Potassium Channel Kir4.1 as a Novel Modulator of BDNF Expression in Astrocytes. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 24;19(11):3313. doi: 10.3390/ijms19113313. PMID: 30356026; PMCID: PMC6274740.
- Olsen ML, Sontheimer H. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J Neurochem*. 2008 Nov;107(3):589-601. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05615.x. Epub 2008 Aug 8. PMID: 18691387; PMCID: PMC2581639.
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol*. 1966 Jul;29(4):788-806. doi: 10.1152/jn.1966.29.4.788. PMID: 5966435.
- Orkand RK. Extracellular potassium accumulation in the nervous system. *Fed Proc*. 1980 Apr;39(5):1515-8. PMID: 7364046.
- Papatheodoropoulos C, Kostopoulos G. Age-related changes in excitability and recurrent inhibition in the rat CA1 hippocampal region. *Eur J Neurosci*. 1996 Mar;8(3):510-20. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01235.x. PMID: 8963442.
- Parsons ALM, Bucknor EMV, Castroflorio E, Soares TR, Oliver PL, Rial D. The Interconnected Mechanisms of Oxidative Stress and Neuroinflammation in Epilepsy. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan 14;11(1):157. doi: 10.3390/antiox11010157. PMID: 35052661; PMCID: PMC8772850.
- Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*. 2004 Dec 15;37(12):1951-62. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.021. PMID: 15544915.
- Pattnaik BR, Hughes BA. Regulation of Kir channels in bovine retinal pigment epithelial cells by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Oct;297(4):C1001-11. doi: 10.1152/ajpcell.00250.2009. Epub 2009 Jul 29. PMID: 19641096; PMCID: PMC2770741.

- Perrone P, Spinelli S, Mantegna G, Notariale R, Straface E, Caruso D, Falliti G, Marino A, Manna C, Remigante A, Morabito R. Mercury Chloride Affects Band 3 Protein-Mediated Anionic Transport in Red Blood Cells: Role of Oxidative Stress and Protective Effect of Olive Oil Polyphenols. *Cells*. 2023 Jan 27;12(3):424. doi: 10.3390/cells12030424. PMID: 36766766; PMCID: PMC9913727.
- Pinault D, O'Brien TJ. Cellular and network mechanisms of genetically-determined absence seizures. *Thalamus Relat Syst*. 2005;3(3):181-203. doi: 10.1017/S1472928807000209. Epub 2007 Jan 22. PMID: 21909233; PMCID: PMC3168114.
- Pitkänen A, Engel J Jr. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics*. 2014 Apr;11(2):231-41. doi: 10.1007/s13311-014-0257-2. PMID: 24492975; PMCID: PMC3996117.
- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res*. 1993 May;14(4):151-68. doi: 10.1111/j.1600-079x.1993.tb00498.x. PMID: 8102180.
- Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed Res Int*. 2015;2015:745613. doi: 10.1155/2015/745613. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25650148; PMCID: PMC4306378.
- Qi J, Liu X, Xu N, Wang Q. The Clinical Characteristics of New-Onset Epilepsy in the Elderly and Risk Factors for Treatment Outcomes of Antiseizure Medications. *Front Neurol*. 2022 Feb 22;13:819889. doi: 10.3389/fneur.2022.819889. PMID: 35273558; PMCID: PMC8901571.
- Quintana A, Kruse SE, Kapur RP, Sanz E, Palmiter RD. Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 15;107(24):10996-1001. doi: 10.1073/pnas.1006214107. Epub 2010 Jun 1. PMID: 20534480; PMCID: PMC2890717.
- Ramsay RE, Rowan AJ, Pryor FM. Special considerations in treating the elderly patient with epilepsy. *Neurology*. 2004 Mar 9;62(5 Suppl 2):S24-9. doi: 10.1212/wnl.62.5\_suppl\_2.s24. PMID: 15007161.
- Ransom B, Behar T, Nedergaard M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci*. 2003 Oct;26(10):520-2. doi: 10.1016/j.tins.2003.08.006. PMID: 14522143.
- Rao MS, Hattiangady B, Reddy DS, Shetty AK. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res*. 2006 May 1;83(6):1088-105. doi: 10.1002/jnr.20802. PMID: 16493685.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*. 2016 Oct;61(3):253-78. doi: 10.1111/jpi.12360. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27500468.

- Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz RM, Mayo JC, Ramos S. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recept.* 1999 Jan-Apr;8(1-2):56-63. doi: 10.1159/000014569. PMID: 10085463.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997 Dec;20(12):570-7. doi: 10.1016/s0166-2236(97)01139-9. Erratum in: *Trends Neurosci* 1998 Feb;21(2):80. PMID: 9416670.
- Roesch S, Bernardinelli E, Nofziger C, Tóth M, Patsch W, Rasp G, Paulmichl M, Dossena S. Functional Testing of SLC26A4 Variants-Clinical and Molecular Analysis of a Cohort with Enlarged Vestibular Aqueduct from Austria. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 10;19(1):209. doi: 10.3390/ijms19010209. PMID: 29320412; PMCID: PMC5796158.
- Rosholm KR, Boddum K, Lindquist A. Perforated Whole-Cell Recordings in Automated Patch Clamp Electrophysiology. *Methods Mol Biol.* 2021;2188:93-108. doi: 10.1007/978-1-0716-0818-0\_5. PMID: 33119848.
- Sakmann B, Trube G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol.* 1984 Feb;347:641-57. doi: 10.1113/jphysiol.1984.sp015088. PMID: 6323703; PMCID: PMC1199469.
- Samani NJ, van der Harst P. Biological ageing and cardiovascular disease. *Heart.* 2008 May;94(5):537-9. doi: 10.1136/hrt.2007.136010. PMID: 18411343.
- Sanya EO. Peculiarity of epilepsy in elderly people: a review. *West Afr J Med.* 2010 Nov-Dec;29(6):365-72. doi: 10.4314/wajm.v29i6.68260. PMID: 21465442.
- Schröder W, Seifert G, Hüttmann K, Hinterkeuser S, Steinhäuser C. AMPA receptor-mediated modulation of inward rectifier K<sup>+</sup> channels in astrocytes of mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci.* 2002 Mar;19(3):447-58. doi: 10.1006/mcne.2001.1080. PMID: 11906215.
- Shang F, Taylor A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011 Jul 1;51(1):5-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.031. Epub 2011 Apr 8. PMID: 21530648; PMCID: PMC3109097.
- Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, Surmeier DJ. Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci.* 2007 Nov;10(11):1458-66. doi: 10.1038/nn1972. Epub 2007 Sep 30. PMID: 17906621.
- Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev.* 2014 Apr 9;114(7):3854-918. doi: 10.1021/cr4005296. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24684599; PMCID: PMC4317059.
- Sherman-Gold R. *The Axon guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques.* 1993, Axon Instruments, Inc., Foster City, CA.

- Shi Y, Wu Z, Cui N, Shi W, Yang Y, Zhang X, Rojas A, Ha BT, Jiang C. PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by beta-adrenergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Sep;293(3):R1205-14. doi: 10.1152/ajpregu.00337.2007. Epub 2007 Jun 27. PMID: 17596331; PMCID: PMC2258221.
- Shin HJ, Koo BW, Yoon J, Kim H, Do SH, Na HS. Melatonin reduces the endoplasmic reticulum stress and polyubiquitinated protein accumulation induced by repeated anesthesia exposure in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep*. 2022 Apr 6;12(1):5783. doi: 10.1038/s41598-022-09853-y. PMID: 35388108; PMCID: PMC8986834.
- Shorvon SD. The causes of epilepsy: changing concepts of etiology of epilepsy over the past 150 years. *Epilepsia*. 2011 Jun;52(6):1033-44. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03051.x. Epub 2011 Apr 11. PMID: 21480878.
- Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. 2011 Jun;52(6):1052-7. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03041.x. Epub 2011 Mar 30. PMID: 21449936.
- Shwe T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Exp Gerontol*. 2018 Jan;101:13-36. doi: 10.1016/j.exger.2017.10.029. Epub 2017 Nov 10. PMID: 29129736.
- Sloane JA, Hollander W, Moss MB, Rosene DL, Abraham CR. Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiol Aging*. 1999 Jul-Aug;20(4):395-405. doi: 10.1016/s0197-4580(99)00066-4. PMID: 10604432.
- Solmaz I, Gürkanlar D, Gökçil Z, Göksoy C, Ozkan M, Erdoğan E. Antiepileptic activity of melatonin in guinea pigs with pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurol Res*. 2009 Nov;31(9):989-95. doi: 10.1179/174313209X385545. Epub 2009 Jan 9. PMID: 19138464.
- Somjen GG. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 1979;41:159-77. doi: 10.1146/annurev.ph.41.030179.001111. PMID: 373587.
- Somjen GG. Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. *Neuroscientist*. 2002 Jun;8(3):254-67. doi: 10.1177/1073858402008003011. PMID: 12061505.
- Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1065-96. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1065. PMID: 11427692.
- Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Apr;928:22-38. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05632.x. PMID: 11795513.
- Steinhäuser C, Seifert G, Bedner P. Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: K<sup>+</sup> channels and gap junction coupling. *Glia*. 2012 Aug;60(8):1192-202. doi: 10.1002/glia.22313. Epub 2012 Feb 10. PMID: 22328245.

- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):44784-90. doi: 10.1074/jbc.M207217200. Epub 2002 Sep 16. PMID: 12237311.
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*. 2004 Jan 15;45(2):208-12. doi: 10.1002/glia.10319. PMID: 14730714.
- Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta*. 2001 Jan;303(1-2):19-24. doi: 10.1016/s0009-8981(00)00337-5. PMID: 11163018.
- Sun H, Gusdon AM, Qu S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. *Curr Opin Lipidol*. 2016 Aug;27(4):408-13. doi: 10.1097/MOL.0000000000000314. PMID: 27075419; PMCID: PMC4947538.
- Takano M, Kuratomi S. Regulation of cardiac inwardly rectifying potassium channels by membrane lipid metabolism. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003 Jan;81(1):67-79. doi: 10.1016/s0079-6107(02)00048-2. PMID: 12475570.
- Talib WH. Melatonin and Cancer Hallmarks. *Molecules*. 2018 Feb 26;23(3):518. doi: 10.3390/molecules23030518. PMID: 29495398; PMCID: PMC6017729.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Galano A, Reiter RJ. Cyclic-3-hydroxymelatonin (C3HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. *Curr Med Chem*. 2014;21(13):1557-65. doi: 10.2174/0929867321666131129113146. PMID: 24304286.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res*. 2003 May;34(4):249-59. doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.00037.x. PMID: 12662346.
- Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*. 2015 Oct 16;20(10):18886-906. doi: 10.3390/molecules201018886. PMID: 26501252; PMCID: PMC6332205.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*. 2007 Jan;42(1):28-42. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x. PMID: 17198536.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2002 Feb;2(2):181-97. doi: 10.2174/1568026023394443. PMID: 11899100.
- Tanaka A, Akamatsu N, Shouzaki T, Toyota T, Yamano M, Nakagawa M, Tsuji S. Clinical characteristics and treatment responses in new-onset epilepsy in the elderly. *Seizure*. 2013 Nov;22(9):772-5. doi: 10.1016/j.seizure.2013.06.005. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23849689.

- Tchekalarova J, Petkova Z, Pechlivanova D, Moyanova S, Kortenska L, Mitreva R, Lozanov V, Atanasova D, Lazarov N, Stoynev A. Prophylactic treatment with melatonin after status epilepticus: effects on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral changes in a kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2013 Apr;27(1):174-87. doi: 10.1016/j.yebeh.2013.01.009. Epub 2013 Feb 28. PMID: 23435277.
- Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet.* 2019 Feb 16;393(10172):689-701. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0. Epub 2019 Jan 24. PMID: 30686584.
- Todoriki S, Hosoda Y, Yamamoto T, Watanabe M, Sekimoto A, Sato H, Mori T, Miyazaki M, Takahashi N, Sato E. Methylglyoxal Induces Inflammation, Metabolic Modulation and Oxidative Stress in Myoblast Cells. *Toxins (Basel).* 2022 Apr 7;14(4):263. doi: 10.3390/toxins14040263. PMID: 35448872; PMCID: PMC9030564.
- Traverso S, Zifarelli G, Aiello R, Pusch M. Proton sensing of CLC-0 mutant E166D. *J Gen Physiol.* 2006 Jan;127(1):51-65. doi: 10.1085/jgp.200509340. PMID: 16380443; PMCID: PMC2151479.
- Tretter L, Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci.* 2004 Sep 8;24(36):7771-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1842-04.2004. PMID: 15356188; PMCID: PMC6729921.
- Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein DH. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia.* 2015 Oct;56(10):1515-23. doi: 10.1111/epi.13121. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26336950.
- Tsuboi T, Lippiat JD, Ashcroft FM, Rutter GA. ATP-dependent interaction of the cytosolic domains of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel Kir6.2 revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 6;101(1):76-81. doi: 10.1073/pnas.0306347101. Epub 2003 Dec 17. PMID: 14681552; PMCID: PMC314141.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478. PMID: 14561818; PMCID: PMC2343396.
- Vaddi DR, Piao L, Khan SA, Wang N, Prabhakar NR, Nanduri J. Hypoxia induced hERG trafficking defect linked to cell cycle arrest in SH-SY5Y cells. *PLoS One.* 2019 Apr 24;14(4):e0215905. doi: 10.1371/journal.pone.0215905. PMID: 31017964; PMCID: PMC6481834.
- Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998 Jul;78(3):687-721. doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.687. PMID: 9674691.
- Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res.* 2012 Mar;52(2):217-27. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x. Epub 2011 Sep 2. PMID: 21884551.

- Verkhatsky A, Steinhäuser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Apr;32(2-3):380-412. doi: 10.1016/s0165-0173(99)00093-4. PMID: 10760549.
- Verma N, Maiti R, Mishra BR, Jha M, Jena M, Mishra A. Effect of add-on melatonin on seizure outcome, neuronal damage, oxidative stress, and quality of life in generalized epilepsy with generalized onset motor seizures in adults: A randomized controlled trial. *J Neurosci Res.* 2021 Jun;99(6):1618-1631. doi: 10.1002/jnr.24820. Epub 2021 Feb 27. PMID: 33641195.
- Vishnoi S, Raisuddin S, Parvez S. Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress in Epilepsy: Modulatory Role of Melatonin. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2016;35(4):365-374. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2016016399. PMID: 27992316.
- von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol.* 2016 Dec 15;524(18):3865-3895. doi: 10.1002/cne.24040. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27187682; PMCID: PMC5063692.
- Waldbaum S, Liang LP, Patel M. Persistent impairment of mitochondrial and tissue redox status during lithium-pilocarpine-induced epileptogenesis. *J Neurochem.* 2010 Dec;115(5):1172-82. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07013.x. Epub 2010 Oct 26. PMID: 21219330; PMCID: PMC4878708.
- Wallace H, Shorvon S, Tallis R. Age-specific incidence and prevalence rates of treated epilepsy in an unselected population of 2,052,922 and age-specific fertility rates of women with epilepsy. *Lancet.* 1998 Dec 19-26;352(9145):1970-3. doi: 10.1016/S0140-6736(98)04512-7. PMID: 9872246.
- Walz W. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int.* 2000 Apr;36(4-5):291-300. doi: 10.1016/s0197-0186(99)00137-0. PMID: 10732996.
- Wang C, Zhang J, Schroeder JI. Two-electrode Voltage-clamp Recordings in *Xenopus laevis* Oocytes: Reconstitution of Abscisic Acid Activation of SLAC1 Anion Channel via PYL9 ABA Receptor. *Bio Protoc.* 2017 Jan 20;7(2):e2114. doi: 10.21769/BioProtoc.2114. PMID: 28516122; PMCID: PMC5432015.
- Wang CL, Tsai ML, Wu SN. Evidence for mitoxantrone-induced block of inwardly rectifying K(+) channels expressed in the osteoclast precursor RAW 264.7 cells differentiated with lipopolysaccharide. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30(3):687-701. doi: 10.1159/000341449. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22854649.
- Wang F, Qi X, Zhang J, Huang JH. Astrocytic modulation of potassium under seizures. *Neural Regen Res.* 2020 Jun;15(6):980-987. doi: 10.4103/1673-5374.270295. PMID: 31823867; PMCID: PMC7034283.
- Wojtala A, Karkucinska-Wieckowska A, Sardao VA, Szczepanowska J, Kowalski P, Pronicki M, Duszyński J, Wieckowski MR. Modulation of mitochondrial dysfunction-related oxidative stress in fibroblasts of patients with Leigh syndrome by inhibition of prooxidative p66Shc pathway.

- Mitochondrion. 2017 Nov;37:62-79. doi: 10.1016/j.mito.2017.07.002. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28739512.
- Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J*. 2007 Dec 15;93(12):4225-36. doi: 10.1529/biophysj.107.112565. Epub 2007 Aug 31. PMID: 17766354; PMCID: PMC2098729.
  - Wu SB, Ma YS, Wu YT, Chen YC, Wei YH. Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol Neurobiol*. 2010 Jun;41(2-3):256-66. doi: 10.1007/s12035-010-8123-7. Epub 2010 Apr 23. PMID: 20411357.
  - Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*. 2016 Nov 10;539(7628):180-186. doi: 10.1038/nature20411. PMID: 27830812; PMCID: PMC5172605.
  - Yang N, Guan QW, Chen FH, Xia QX, Yin XX, Zhou HH, Mao XY. Antioxidants Targeting Mitochondrial Oxidative Stress: Promising Neuroprotectants for Epilepsy. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Nov 25;2020:6687185. doi: 10.1155/2020/6687185. PMID: 33299529; PMCID: PMC7710440.
  - Yildirim M, Marangoz C. Anticonvulsant effects of melatonin on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain Res*. 2006 Jul 12;1099(1):183-8. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.093. Epub 2006 Jun 9. PMID: 16764841.
  - Yiş U, Seçkin E, Kurul SH, Kuralay F, Dirik E. Effects of epilepsy and valproic acid on oxidant status in children with idiopathic epilepsy. *Epilepsy Res*. 2009 Apr;84(2-3):232-7. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2009.02.003. Epub 2009 Mar 3. PMID: 19261443.
  - Zangerl-Plessl EM, Qile M, Bloothoof M, Sary-Weinzinger A, van der Heyden MAG. Disease Associated Mutations in KIR Proteins Linked to Aberrant Inward Rectifier Channel Trafficking. *Biomolecules*. 2019 Oct 25;9(11):650. doi: 10.3390/biom9110650. PMID: 31731488; PMCID: PMC6920955.
  - Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, Qin X, Ji Y, Yang X, Wang H. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol*. 2019 Sep;26:101284. doi: 10.1016/j.redox.2019.101284. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31400697; PMCID: PMC6831867.
  - Zheng S, Zhou C, Yang H, Li J, Feng Z, Liao L, Li Y. Melatonin Accelerates Osteoporotic Bone Defect Repair by Promoting Osteogenesis-Angiogenesis Coupling. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Feb 22;13:826660. doi: 10.3389/fendo.2022.826660. PMID: 35273570; PMCID: PMC8902312.