



Glutamat Eksitotoksitesisi Oluşturulan Primer Kortikal Nöron Kültürlerinde Parietinin Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi

Gülşah GÜNDOĞDU¹, Ali TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ², Betül ÇİÇEK¹, Onur ŞENOL³, Kemal
Alp NALCI⁴, Alper Kürşat DEMİRKAYA^{5✉}, Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU⁴

1. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
2. Atatürk Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
3. Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
4. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
5. Bilecik Şeyh Edebalı Üniversitesi, Meslek Yükseokulu, Gıda İşleme Bölümü, Bilecik, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
08.12.2017	29.12.2017	25.10.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Gündoğdu G, Taghizadehghalehjoughi A, Çiçek B, Şenol O, Nalcı KA, Demirkaya AK, Hacımüftüoğlu A: Glutamat Eksitotoksitesisi Oluşturulan Primer Kortikal Nöron Kültürlerinde Parietinin Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 13 (2): 165-173, 2018. DOI: 10.17094/ataunivbd.363858

Öz: Glutamat merkezi sinir sisteminin en önemli nörotransmitter maddesidir. Aşırı glutamat salınımı, glutamat reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonuna neden olarak eksitotoksisteye yol açar. Parietin, *Rheum ribes* L.'den izole edilen çeşitli farmakolojik özelliklere sahip bir antrakinondur. Bu çalışmada glutamat eksitotoksitesisine maruz bırakılan primer kortikal nöron kültürlerinde parietinin nöroprotektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Primer kortikal nöronlar, yeni doğan Sprague Dawley cinsi sıçanlardan elde edildi. Glutamat eksitotoksitesisini stimüle etmek için, kültür medyumuna 10^{-5} M konsantrasyonda glutamat uygulandı. Daha sonra hücrelere 2.5-500 μ M konsantrasyonda parietin uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücre canlılık oranı MTT yöntemi ile belirlendi. Aynı zamanda hücrelerde oluşan reaktif oksijen türleri total antioksidan seviyesi (TAS)- total oksidan seviyesi (TOS) yöntemi ile değerlendirildi. MTT analiz sonuçlarına göre 10 μ M parietinin glutamat eksitotoksitesisine karşı nöronlarda anlamlı düzeyde koruyucu etkiye sahip olduğu tespit edildi. TAS-TOS analiz sonuçlarına göre 10 μ M parietinin hücrelerde antioksidan seviyesini anlamlı ölçüde artırırken, parietinin yüksek konsantrasyonlarının hücrelerdeki oksidan seviyesini anlamlı ölçüde arttırdığı gözlemlendi. Bu çalışma sonucuna göre parietinin primer kortikal nöron hücrelerinde glutamat eksitotoksitesisine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu ve glutamat eksitotoksitesisine karşı teropatik bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glutamat, Parietin, Primer nöron kültürü.

Investigation of Protective Effect of Parietin Against Glutamate Excitotoxicity in Primary Cortical Neuron Culture

Abstract: Glutamate is the most important neurotransmitter in the central nervous system. Excitotoxicity is induced by excessive release of glutamate followed by overstimulation of glutamate receptor. Parietin is an anthraquinone from *Rheum ribes* L. and has been reported to have a variety of pharmacological properties. The present study investigated the neuroprotective effects of parietin in primary cortical neuron cultures against glutamate excitotoxicity. Primary rat cortical neuronal cultures were obtained from new born Sprague Dawley rats. Cultures were subject to 10^{-5} M glutamate to stimulate glutamate excitotoxicity. After that, cells were treated with 2.5-500 μ M concentrations of parietin during 24 h in dose dependent manner. Cell viability was determined using MTT assay. Reactive oxygen species generation was assessed using the total antioxidant status (TAS)-total antioxidant status (TOS) assays. The results of MTT analysis showed that 10 μ M parietin effectively protected neuron from glutamate toxicity. According to the results of TAS-TOS analysis, it showed that 10 μ M parietin significantly increased the antioxidant level in the cells, whereas high concentrations of parietin significantly increased the oxidant level in the cells. The results of this study suggest that parietin had neuroprotective effect against glutamate excitotoxicity in primary rat cortical neuron cultures and it may be conceive that parietin can be used as a therapeutic agent for glutamate excitotoxicity.

Keywords: Glutamate, Parietin, Primary neuron culture.

✉ Alper Kürşat DEMİRKAYA
Bilecik Şeyh Edebalı Üniversitesi, Meslek Yükseokulu, Gıda İşleme Bölümü, Bilecik, TÜRKİYE.
e-posta: alperkursorat.demirkaya@bilecik.edu.tr

GİRİŞ

Glutamat merkezi sinir sisteminin en önemli eksitator nörotransmitter maddesi olup sinaptik plastisite, öğrenme, hafıza ve diğer bilişsel işlevleri içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (1-3). Glutamat, memeli santral sinir sisteminde milimolar konsantrasyonlarda bulunmaktadır (4). Sinaptik aktivite, sinaptik aralıkta glutamat konsantrasyonunda artışa yol açmakta fakat glutamat taşıyıcıları tarafından glutamatın geri alınımı ile ekstraselüler glutamat konsantrasyonu korunmaktadır (5-7). Glutamat beyin fonksiyonlarında önemli rol oynamasına rağmen merkezi sinir sistemindeki yüksek konsantrasyonu glutamatın nörotoksik etkisinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (8). Aşırı glutamat salınımı sonucu, glutamat reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonuna bağlı oluşan kalsiyumun aşırı yüklenmesi eksitotoksisteye yol açar ve bu durum nörodejenerasyonda önemli role sahiptir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış sonucu proteaz aktivasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve reaktif oksijen türlerinde artış görülmekle birlikte nöronal hücre ölümü gerçekleşmektedir (9,10). Oksidatif stres, nöropatolojik süreçlerde nöronal hücre ölümünü tetikleyen önemli bir faktördür. Glutamat konsantrasyonundaki artış, glutatyon sentezini engelleyerek ve aşırı reaktif oksijen üretimi (ROS)'ne yol açarak oksidatif strese neden olmaktadır (8,11,12). Glutamatın yol açtığı toksisite; huntington, amyotrofik lateral skleroz, alzheimer, parkinson gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (10,13). Bu nedenle, nöronal hücrelerin glutamata bağlı eksitotoksisteye karşı korunması, nörodejeneratif hastalıklar için etkili bir terapötik yaklaşım olabilir (8). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, antrakinin yapıları bioaktif bileşiklerin oksidatif strese karşı antioksidan aktivitelerine yoğunlaşmakta ve bu özellikleri nöronal proteksiyon ile ilişkilendirilmektedir (14,15). Işkın (*Rheum ribes* L.) geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan kuzukulağigiller (Polygonaceae) familyasına ait bir ravent türüdür

(16). Parietin, *Rheum ribes* L.'den izole edilen turuncu renkte antrakinin özelliğine sahip bir bileşiktir. Antrakinin bir bileşik olan parietin; laksatif, hepatoprotektif, anti-inflamatuar ve anti-mikrobiyal gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Aynı zamanda parietin, apoptozu indükleyerek, hücre siklusunun blokajı ve metastazı suprese ederek antikanser özellik göstermektedir (17-20). Literatürde parietinin glutamat eksitotoksistisine karşı nöroprotektif etkisini inceleyen bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle çalışmada, primer kortikal nöron hücre kültüründe, *Rheum ribes* L.'den izole edilen antrakinin bir bileşik olan parietinin glutamat toksistisine karşı nöroproteksiyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada, in vitro koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak, sıçanlardan elde edilen primer kortikal nöron kültüründe oluşturulan glutamat toksistisine karşı, Işkından (*Rheum ribes* L.) izole edilen parietinin sitotoksik ve antioksidan etkileri incelendi. Parietin, *Rheum ribes* L. bitkisinden izole edildi. Glutamat, Cayman Chemical'den sağlandı.

Primer Kortikal Nöron Kültürünün Hazırlanması

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda (Erzurum, Türkiye) yürütülmüştür. Çalışmada "Laboratuvar Hayvanlarının Kullanılması ve Bakımı Kılavuzunda" belirtilen hükümlere uyulmuş olup Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyle Yerel Etik Kurulundan 27.03.2017 tarih ve 42190979-945-E.1700095549 sayılı etik kurul onayı alındı. Çalışmada korteks nöronlarının elde edilmesi için Sprague-Dawley cinsi yeni doğmuş 24 saati doldurmamış sıçan yavrusu kullanıldı. Kısaca sıçanlar hızlıca dekapite edildikten sonra çıkarılan korteksler 5 mL Hanks'Balanced Salt solution (HBSS) solüsyonuna aktarılarak bistüri yardımıyla makro parçalanma ve daha sonra Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit

(EDTA) (%0.25 tripsin-% 0.02 EDTA) ile mikro parçalamaya yapıldı. Sonra, hücreler 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Dibe çöken hücreler hücresel medyum (%88 NBM (Nöro bazal medyum, Gibco, USA), %10 FBS (Fetal sığır solüsyonu, Gibco, USA), %2 B-27 (Supliment, Thermo Fisher, Germany), %0.1 antibiyotik (Penicillin–Streptomycin) ve amfotrisin B (Thermo Fisher, Germany) eklendi. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C'e sıcaklıkta, 3 gün ara ile besiyeri değiştirilerek 10 gün inkübe edildi.

Glutamat Eksitotoksitesinin Oluşturulması ve Test Ajanlarının Uygulanması

Eksitotoksik hasarı oluşturabilmek için, primer kortikal nöronlar 10⁻⁵ M konsantrasyonda glutamata 5 dk süreyle maruz bırakıldı. Daha sonra parietinin glutamat eksitotoksitesini üzerindeki etkisini değerlendirmek için, farklı konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µM) parietin uygulanarak 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid, sarı tetrazol (MTT) analiz yöntemi ile hücre canlılığı (sitotoksiste durumu) değerlendirildi.

MTT Analizi

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT analiz yöntemi ile belirlendi. Yöntem, canlı hücreler tarafından aktif olarak absorbe edilen MTT'nin tetrazolium halkasının mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısının göstergesi olarak kabul edilen mavi-mor renkli insolubl formazana indirgenmesine dayanmaktadır. Parietinin, glutamat toksitesini oluşturulan primer kortikal hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkisi MTT kiti ile üretici firmanın (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) kullanım talimatına göre uygulandı. Steril PBS içinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan %10'luk konsantrasyonda 96 well-plate'lere ilave edildi. 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 4 saat inkübasyona

bırakıldıktan sonra 100 µL DMSO ilave edilerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Formazan absorbansı ELISA reader (MicroQuant, Reader, BioTek, Winooski, VT, USA) ile 570 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Ölçümü

Medium TAS düzeyi Rel Assay Total Antioksidan Status (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey) ticari kiti kullanılarak ölçüldü. Bu yöntem, hidrojen peroksit varlığında ABTS (2,2'-Azino-di-[3-aethylbenzthiazolinesulphonate) molekülünün ABTS⁺ molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. ABTS radikali, antioksidan varlığına göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Örnekte bulunan antioksidanlar konsantrasyonları ile orantılı olarak renkteki açılmayı hızlandırır. Renk değişikliği, 660 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirildi. Sonuçlar µmol Trolox Equiv/mg protein başına ifade edildi.

Total Oksidan Seviyesi (TOS) Ölçümü

Medium TOS düzeyi Rel Assay Total Oksidan Status (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey) ticari kiti kullanılarak ölçüldü. Bu yöntem, örnekte bulunan oksidanların, Fe⁺²-o-dianisidine kompleksini Fe⁺³ iyonuna okside etmesine dayanmaktadır. Fe⁺³ iyonu asidik ortamda ksilenol oranı ile renkli bir kompleks yapar ve renk değişimi, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin konsantrasyonu ile orantılı olup spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Renk değişikliği 530 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirildi. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar µmol H₂O₂ Equiv/mg protein başına ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

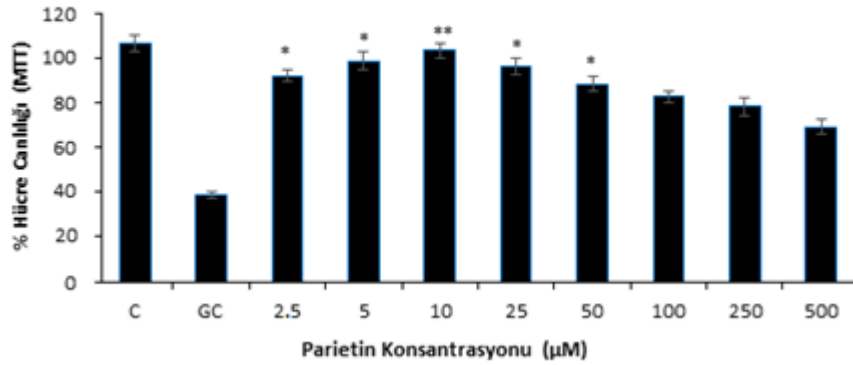
Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma One-way ANOVA ve tukey HSD yöntemi kullanılarak hesaplandı. Tüm hesaplamalar, istatistiksel analiz için SPSS 20 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel önemi göstermek için P<0.05 değerleri dikkate alındı.

BULGULAR

MTT Test Sonuçları

Parietin sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Primer kortikal nöron kültüründe oluşturulmuş olan glutamat toksisitesi üzerine çeşitli konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μM) uygulanan parietinin sitotoksik etkisi şekil 1'de gösterildi. Parietin uygulanan glutamat toksisitesi oluşturulmuş primer nöron hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon süreci sonunda elde edilen hücre canlılığı değerlendirilmesinde,

$10^5\mu\text{M}$ glutamat uygulamasını takiben hücre canlılık oranının %36.6'ya düştüğü gözlemlendi. Parietin uygulamasına takiben hücre canlılığında artış olduğu tespit edildi. En belirgin artış 5-10 μM parietin uygulamasına takiben gözlenirken (sırasıyla %92 ve %96.87), en az artış 500 μM parietin uygulamasına takiben (%67) görüldü. 2.5-50 μM konsantrasyonda parietin uygulanan grupların glutamat kontrole göre hücre canlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı derecede koruyucu etkiye sahip olduğu gözlenirken ($P<0.05$), en belirgin koruyucu etki 10 μM parietin uygulanan grupta tespit edildi ($P<0.001$) (Şekil 1).



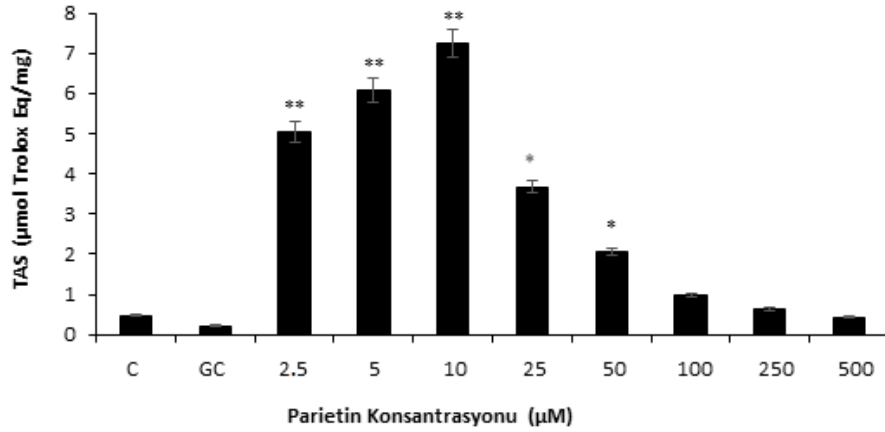
Şekil 1. Primer kortikal nöron kültüründe çeşitli konsantrasyonlardaki parietinin sitotoksik etkileri [$*P<0.05$; $**P<0.001$ istatistiksel olarak glutamat kontrole göre anlamlılık; C: kontrol (Herhangi bir madde ile tedavi edilmemiş hücre), GC: Glutamat kontrol ($10^{-5}\mu\text{M}$ glutamat maruz bırakılmış hücre)].

Figure 1. The cytotoxicity effect of parietin in primary cortical neuron cultures [$*P<0.05$; $**P<0.001$ difference from glutamate control; C: control (untreated cells), GC: Glutamate control (cells treated with $10^{-5}\mu\text{M}$ glutamate)].

Total Antioksidan Seviyesi ve Total Oksidan Seviyesi Sonuçları

Primer nöron kültüründe oluşturulmuş olan glutamat toksisitesi üzerine 24 saat süreyle çeşitli konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μM) parietin uygulamasını takiben hücre kültür ortamı alındı ve ticari kit yardımı ile antioksidan ve oksidan kapasiteleri ölçüldü. TAS sonuçları 2.5, 5, 10 μM parietinin hem pozitif hem negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında antioksidan kapasitesini

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığını gösterdi ($P<0.001$). Yüksek doz parietin uygulaması ile 25 ve 50 μM parietin uygulanan gruplarda glutamat kontrole göre anlamlı artış ($P<0.05$) olmakla beraber antioksidan kapasitede doz artışı ile paralel azalma tespit edildi. Aynı zamanda TAS sonuçlarının MTT sonuçları ile paralel olduğu ve 10 μM parietinin hem hücre canlılığında hem de antioksidan kapasitede en yüksek etkiye sahip olduğu tespit edildi (Şekil 2).

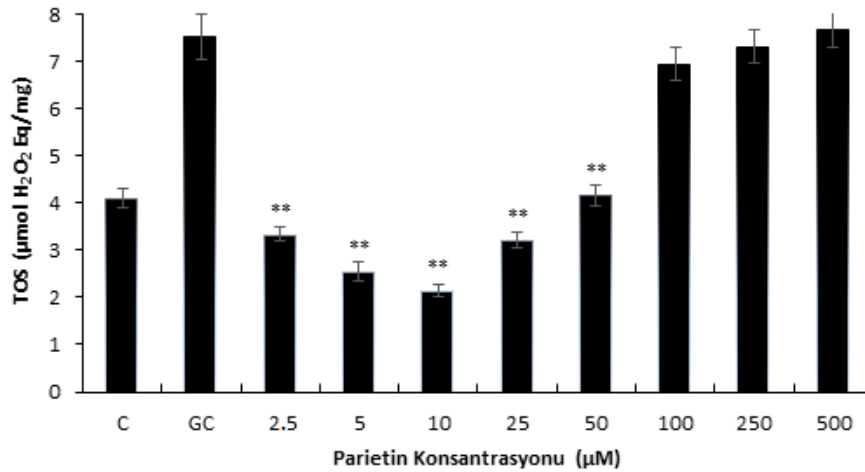


Şekil 2. 24 saat çeşitli konsantrasyonlarda parietin ile tedavi edilen primer kortikal nöron kültüründe ortalama total antioksidan seviyesi [*P<0.05; **P<0.001 istatistiksel olarak glutamat kontrole göre anlamlılık; C: kontrol (Herhangi bir madde ile tedavi edilmemiş hücre), GC: Glutamat kontrol (10^{-5} µM glutamat maruz bırakılmış hücre)].

Figure 2. Medium total antioxidant status for cortical neuron culteres were treated different concentration parietin for 24 hours [*P<0.05; **P<0.001 difference from glutamate control; C: control (untreated cells), GC: Glutamate control (cells treated with 10^{-5} µM glutamate)].

TOS sonuçları hücre kültür ortamında oksidan ve serbest radikal seviyesini gösterir. Elde edilen bulgular, 100-500 µM parietin uygulanan grupların glutamat kontrol grubuna göre en yüksek oranda oksidan kapasiteye sahip olduğunu ve bunun da intrasellüler stres faktörünün toksisiteyi ve artan hücre ölümünü indüklediğini gösterdi. TAS sonuçları

ile uyumlu olarak 2.5-50 µM parietin uygulanan gruplarda glutamat kontrol grubuna göre TOS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi (P<0.001). Bununla birlikte hem MTT hem de TAS sonuçlarımızla uyumlu olarak 10 µM parietin uygulamasını takiben oksidan seviyenin (stres faktör seviyesinin) en düşük olduğu tespit edildi.



Şekil 3. 24 saat çeşitli konsantrasyonlarda parietin ile tedavi edilen primer kortikal nöron kültüründe ortalama total oksidan seviyesi [**P<0.001 istatistiksel olarak glutamat kontrole göre anlamlılık; C: kontrol (Herhangi bir madde ile tedavi edilmemiş hücre), GC: Glutamat kontrol (10^{-5} µM glutamat maruz bırakılmış hücre)].

Figure 3. Medium total oxidant status for cortical neuron culteres were treated different concentration parietin for 24 hours [**P<0.001 difference from glutamate control; C: control (untreated cells), GC: Glutamate control (cells treated with 10^{-5} µM glutamate)]

TARTIşMA ve SONUÇ

Eksitotoksiste terimi genellikle MSS'de glutamat reseptörlerinin eksitatör amino asitler tarafından aşırı veya uzun süreli aktivasyonu ile tetiklenen nöronal dejenerasyon olarak tanımlanmıştır (21,22). Glutamat eksitotoksitesi aynı zamanda oksidatif strese yol açarak nöronal hücre ölümünü hızlandırmaktadır (6,23,24). Alzheimer, Parkinson, Huntington ve multiple skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde, glutamat eksitotoksitesi önemli bir rol oynamaktadır (25,26). Bir antrakinin türevi olan parietinin; hepatoprotektif, anti-mikrobik, anti-inflamatuar, anti-kanser ve anti-metastatik gibi çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (17-19,27). Fakat parietinin glutamat eksitotoksitesine karşı nöroprotektif etkisini inceleyen herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir. Bu çalışma, glutamat toksisitesine maruz bırakılan primer kortikal nöron hücrelerinde parietinin sitotoksik ve antioksidan etkisinin incelenmesi bakımından literatürde bir ilktir. Kolorimetrik bir analiz olan MTT, proliferatif ve sitotoksik çalışmalarda hücre canlılık miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. MTT hızlı, kullanışlı ve ekonomik bir teknik olduğu için hücre kültür çalışmalarında hücre canlılık miktarının belirlenmesi bakımından oldukça popüler bir yöntem haline gelmiştir (28). Wang ve ark. (29) tarafından yapılan bir çalışmada parietinin hepatosellüler karsinom hücre hattında (HepG2) sitotoksiteye neden olurken normal dermal fibroblast hücre hattında herhangi bir sitotoksik etkiye yol açmadığı bildirilmiştir.

Araştırmada, glutamat toksisitesi oluşturulmuş primer kortikal nöron hücrelerinde hücre canlılığında anlamlı derecede azalma tespit edildi. Glutamat toksisitesi oluşturulmuş primer kortikal nöron hücrelerine parietin uygulamasını takiben hücre canlılığında artış tespit edildi. Bu artış düşük dozlarda %92-97'lere kadar çıkarken doz arttıkça çok daha düşük seviyelerde görüldü. Glutamatın neden olduğu eksitotoksiste sonucu, glutamat reseptörlerinin aşırı

aktivasyonuna bağlı olarak ROS ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda kontrolsüz bir artış görülmektedir. Aynı zamanda glutamat, mitokondriyal membranda kısmi depolarizasyona yol açarak hücre içi ROS konsantrasyonu ve oksidasyonunda artışı tetikleyerek nöronal dejenerasyona neden olmaktadır (30,31). Serbest radikallerin neden olduğu hasardan hücreyi korumak için organizmalar antioksidan sistemlerini devreye sokarak intraselüler ortamı ROS'ların etkisinden korurlar (32). Birçok çalışmada, antrakininlerin serbest radikal temizleme aktivitesine sahip güçlü bir antioksidan olduğu belirtilmiştir (33,34). Glutamat eksitotoksitesi ve antrakininler arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmaların sayısı oldukça azdır. Gu ve ark. (35) tarafından yapılan çalışmada beyin hasarı oluşturulmuş ratların hipokampus CA1 bölgesinde antrakinin yapılı emodin Ca^{+2} salınımı bloke ederek glutamat eksitotoksitesine karşı protektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda glutamat toksisitesi oluşturulmuş primer kortikal nöron hücrelerinde düşük dozlarda parietin uygulamasının, kontrole göre total antioksidan seviyesinde anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi. Fakat yüksek dozlarda parietin uygulamasının antioksidan aktivitesini azalttığı tespit edildi. Aynı zamanda düşük dozlarda parietin uygulamasının glutamat kontrole göre total oksidan seviyesinde anlamlı derecede azalma, yüksek dozlarda ise parietin uygulaması ile anlamlı derecede artma gözlemlendi. Çalışmamızda hem hücre canlılık testi hem de antioksidan ve oksidan seviye testi birbirleri ile korele olup, özellikle 10 μ M parietin uygulamasının en yüksek oranda hücre canlılığını koruduğu ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu aynı zamanda da oksidan seviyenin (stres faktör seviyesinin) en düşük olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; glutamat toksisitesi oluşturulan primer kortikal nöron kültüründe, antrakinin bir bileşik olan parietin, nöroprotektif bir etkiye sahiptir. Parietinin, bu etkiyi hücrelerde antioksidan özelliği artırırken oksidan kapasitenin azalmasını sağlayarak gösterdiği düşünülmektedir. Parietinin uygulamasının bu etkilerine bakıldığında, konsantrasyon bağımlı

olarak glutamat eksitotoksisitesine karşı koruyucu ve tedavi amaçlı olarak kullanılabilir bir ajan olabileceği görölmektedir. Parietin ve glutamat eksitotoksisitesi arasındaki ilişkiyi açıklayan herhangi bir literatür bilgisi mevcut olmayıp, çalışmamız bu alanda yapılmış ilk çalışmadır. Parietin glutamat toksisitesi üzerine etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için, hem in vitro hem de in vivo farklı kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Albright TD., Jessell TM., Kandel ER., Posner MI., 2000. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Cell*, 100, 1-55.
- Elmann A., Telerman A., Ofir R., Kashman Y., 2017. Glutamate Toxicity to Differentiated Neuroblastoma N2a Cells Is Prevented by the Sesquiterpene Lactone Achillolide A and the Flavonoid 3, 5, 4'-Trihydroxy-6, 7, 3'-Trimethoxyflavone from *Achillea fragrantissima*. *J Mol Neurosci*, 62, 99-105.
- Wen SY., Li AM., Mi KQ., Wang RZ., Li H., Liu HX., Xing Y., 2017. In vitro neuroprotective effects of ciliary neurotrophic factor on dorsal root ganglion neurons with glutamate-induced neurotoxicity. *Neural Regen Res*, 12, 1716-1721.
- Hacimuftuoglu A., Tatar A., Cetin D., Taspınar N., Saruhan F., Okkay U., Turkez H., Unal D., Stephens RL., Suleyman H., 2016. Astrocyte/neuron ratio and its importance on glutamate toxicity: an in vitro voltammetric study. *Cytotechnology*, 68, 1425-1433.
- Kanamori K., 2016. In vivo N-15 MRS study of glutamate metabolism in the rat brain. *Analytical biochemistry*, 529, 179-192.
- Zhao J., Verwer R., van Wamelen D., Qi XR., Gao SF., Lucassen P., Swaab D., 2016. Prefrontal changes in the glutamate-glutamine cycle and neuronal/glia glutamate transporters in depression with and without suicide. *Journal of psychiatric research*, 82, 8-15.
- Kostic M., Zivkovic N., Cvetanovic A., Stojanovic I., Colic M., 2017. IL-17 signalling in astrocytes promotes glutamate excitotoxicity: Indications for the link between inflammatory and neurodegenerative events in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders*, 11, 12-17.
- Song JH., Kang K., Choi Y., 2017. Protective effect of casuarinin against glutamate-induced apoptosis in HT22 cells through inhibition of oxidative stress-mediated MAPK phosphorylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 5109-5113.
- Zhao H., Ji ZH., Liu C., Yu XY., 2015. Neuroprotective mechanisms of 9-hydroxy epinootkatol against glutamate-induced neuronal apoptosis in primary neuron culture. *J Mol Neurosci*, 56, 808-814.
- Jia N., Sun Q., Su Q., Chen G., 2016. SIRT1-mediated deacetylation of PGC1 α attributes to the protection of curcumin against glutamate excitotoxicity in cortical neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, 478, 1376-1381.
- Floyd RA., Hensley K., 2002. Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging*, 23, 795-807.
- Kim HT., Prochiantz A., Kim JW., 2016. Donating Otx2 to support neighboring neuron survival. *BMB reports*, 49, 69-70.
- Mehta A., Prabhakar M., Kumar P., Deshmukh R., Sharma P., 2013. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*, 698, 6-18.
- Verrier J., Kochanek P., Jackson T., 2013. Anthraquinone-2-sulfonic acid (AQ2S) is a novel neurotherapeutic agent. *Cell death & Disease*, 4, 451-459.
- Wei G., Wu Y., Gao Q., Zhou C., Wang K., Shen C., Wang G., Wang K., Sun X., Li X., 2017 Effect of Emodin on Preventing Postoperative Intra-Abdominal Adhesion Formation. *Oxid Med Cell Longev*, 2017.
- Turkmen O., Crka M., Suat E., 2005. Initial evaluation of a new edible wild rhubarb species

- (*Rheum ribes* L.) with a modified weighted scaling index method. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8, 763-765.
17. Hong JY., Chung HJ., Bae SY., Trung TN., Bae K., Lee SK., 2014. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by physcion, an anthraquinone isolated from rhubarb (rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of cancer prevention*, 19, 273.
18. Pang MJ., Yang Z., Zhang XL., Liu ZF., Fan J., Zhang HY., 2016. Physcion, a naturally occurring anthraquinone derivative, induces apoptosis and autophagy in human nasopharyngeal carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37, 1623-1640.
19. Li W., Li F., Zhu Y., Song D., 2017. Physcion 8-O- β -glucopyranoside regulates cell cycle, apoptosis, and invasion in glioblastoma cells through modulating Skp2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1129-1138.
20. Wang Q., Jiang Y., Guo R., Lv R., Liu T., Wei H., Ming H., Tian X., 2017. Physcion 8-O- β -glucopyranoside suppresses tumor growth of Hepatocellular carcinoma by downregulating PIM1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 451-458.
21. Michaels R., Rothman SM., 1990. Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *Journal of Neuroscience*, 10, 283-292.
22. Sasaki-Hamada S., Suzuki A., Sanai E., Matsumoto K., Oka JI., 2017. Neuroprotection by chotosan, a Kampo formula, against glutamate excitotoxicity involves the inhibition of GluN2B-, but not GluN2A-containing NMDA receptor-mediated responses in primary cultured cortical neurons. *J Pharmacol Sci*, 135, 134-137.
23. Coyle JT., Puttfarcken P., 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science-New York Then Washington*, 262, 689-699.
24. Depp C., Bas-Orth C., Schroeder L., Hellwig A., Bading H., 2017. Synaptic activity protects neurons against calcium-mediated oxidation and contraction of mitochondria during excitotoxicity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28, 530-537.
25. Lipton SA., Rosenberg PA., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, 330, 613-622.
26. Kortagere S., Mortensen OV., Xia J., Lester W., Fang Y., Srikanth YV., Salvino JM., Fontana ACK., 2018. Identification of novel allosteric modulators of glutamate transporter EAAT2. *ACS Chemical Neuroscience*, 9 (3), 522-534.
27. Gao F., Liu W., Guo Q., Bai Y., Yang H., Chen H., 2017. Physcion blocks cell cycle and induces apoptosis in human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells by downregulating HOXA5. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 850-857.
28. Sylvester PW., 2011. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols*, 32, 157-168.
29. Wang Q., Wang Y., Xing Y., Yan Y., Guo P., Zhuang J., Qin F., Zhang J., 2016. Physcion 8-O- β -glucopyranoside induces apoptosis, suppresses invasion and inhibits epithelial to mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 372-380.
30. Büyükkuroğlu ME., Gepdiremen A., Hacimüftüoğlu A., Oktay M., 2003. The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 91-94.
31. Ghezzi F., Monni L., Corsini S., Rauti R., Nistri A., 2017. Propofol Protects Rat Hypoglossal Motoneurons in an In Vitro Model of Excitotoxicity by Boosting GABAergic Inhibition and Reducing Oxidative Stress. *Neuroscience*, 367, 15-33.
32. Hara Y., McKeenan N., Dacks P.A., Fillit H.M., 2017. Evaluation of the Neuroprotective Potential of N-Acetylcysteine for Prevention and Treatment

- of Cognitive Aging and Dementia. *J Prev Alzheimers Dis*, 4, 201-206.
33. Brkanac SR., Geric M., Gajski G., Vujcic V., Garaj-Vrhovac V., Kremer D., Domijan AM., 2015. Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73, 923-929.
34. Sun YN., Li W., Lee SH., Jang HD., Ma JY., Kim YH., 2017. Antioxidant and anti-osteoporotic effects of anthraquinones and related constituents from the aqueous dissolved *Aloe* exudates. *Natural Product Research*, 23, 1-4.
35. Gu JW., Hasuo H., Takeya M., Akasu T., 2005. Effects of emodin on synaptic transmission in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *Neuropharmacology*, 49, 103-111.