






GLUTAMAT İLE İNDÜKLENEN NÖRON HASARINDA FLORETİN VE FLORIZİNİN ETKİLERİ: İN VİTRO ÇALIŞMA

Effects of Phloretin and Phlorizin on Glutamate-Induced Neuron Injury: in Vitro Study

Damla BİNNETOĞLU¹ , Muhammed YAYLA¹ , Tuğba Nurcan YÜKSEL² 

¹Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE.

²Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, TÜRKİYE.

Bu çalışmanın bir bölümü V. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Sempozyumu'nda (ISMS) sözlü olarak sunulmuştur (16-17 Kasım 2018, Ankara-Türkiye).

Öz

Amaç: Çalışmamızda eksitator bir nörotransmitter olan glutamata bağlı nörotoksitenin önlenmesi amacıyla güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik olan floretin ve florizinin etkilerini araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda yeni doğan sıçan korteksi kullanıldı. 10-5 M ve 2x10-5 M konsantrasyonlarında floretin ile 10-5 M ve 2x10-5 M konsantrasyonlarında florizin ayrı ayrı uygulandıktan 2 saat sonra 3x10-3 M ve 6x10-3 M konsantrasyonlarında glutamat uygulaması gerçekleştirildi. Glutamat uygulamasından 6 saat sonra hücrelerden mRNA izolasyonu yapıldı. 24 saat sonra ise metiltiazol difenil tetrazolium (MTT) testi, total oksidan ve antioksidan kapasite ölçümleri gerçekleştirildi.

Bulgular: Çalışmamızda glutamat artan dozlarda hücre canlılığını azaltırken floretin ve florizin uygulaması yüksek dozda en iyi nöroprotektif etkiyi ortaya koydu. Toksikiteye bağlı artan total oksidan düzey floretin ve florizin tarafından anlamlı derecede düzeltildi. Toksikite oluşturulan grupta azalan antioksidan kapasite floretin ve florizin uygulaması ile düzelmeye gösterdi. Floretin ve florizin tek başlarına uygulandığında hücre canlılığını anlamlı derecede etkilemezken, antioksidan kapasiteyi artırdı, oksidan düzeyi ise azalttı. Glutamat uygulaması sonrası artan tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α) mRNA ekspresyonu, floretin ve florizin uygulaması ile anlamlı derecede azaldı. Glutamat uygulamasına bağlı artan kaspaz 9 ve kaspaz 3 mRNA ekspresyonu ise floretin ve florizin uygulaması ile anlamlı derecede düzelmeye gösterdi.

Sonuç: Bu bulgular, güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik olan floretin ve florizinin glutamata bağlı gelişen nörotoksistide koruyucu olabileceğini ve glutamatın neden olduğu nörolojik bozuklukların önlenmesi için terapötik ajanlar olarak kullanılabileceğini gösterir.

Anahtar Kelimeler: Nörotoksiste, Floretin, Florizin, Glutamat, Hücre kültürü.

Abstract

Aim: In this study, we aimed to investigate the effects of phloretin and phlorizin which are potent antioxidants, anti inflammatory and antiapoptotic agents on the prevention of glutamate-induced neurotoxicity which is an excitatory neurotransmitter.

Materials and Methods: In our study, the newly born rat cortex was used. Glutamate was applied in concentration 3x10-3 and 6x10-3 M 2 hours after application of phloretin in concentrations 10-5 M and 2x10-5 M and phlorizin in concentrations 10-5 and 2x10-5 M. mRNA isolation was performed from the cells 6 hours after glutamate administration. 24 hours later, metiltiazol difenil tetrazolium (MTT) test, total oxidant and antioxidant capacity measurements were performed.

Results: In our study, phloretin and phlorizin showed the best neuroprotective effect in high dose, while glutamate reduced cell viability in increased doses. Increased total oxidant capacity due to toxicity has been significantly improved by phloretin and phlorizin. Decreased antioxidant capacity in the toxicity group showed improvement with the application of phloretin and phlorizin. When phloretin and phlorizin were applied alone, they did not affect cell viability significantly, they increased antioxidant capacity and decreased oxidant capacity. Increased tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) mRNA expression after glutamate administration decreased significantly with the application of phloretin and phlorizin. Increased caspase 9 and caspase 3 mRNA expression due to glutamate showed improvement with the application of phloretin and phlorizin.

Conclusion: These findings suggest that phloretin and phlorizin, potent antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic agents, may be protective in glutamate-induced neurotoxicity and can be used as therapeutic agents for preventing glutamate-induced neurological disorders.

Keywords: Neurotoxicity, Phloretin, Phlorizin, Glutamate, Cell culture

GİRİŞ

Florizin, ilk olarak De Koninck tarafından elma ağacının kabuklarından izole edilmiştir¹.

Floretin ve onun glikozil ürünü olan floretin-2-β-d-glikoz da aynı zamanda florizin olarak adlandırılır. Doğada en fazla florizin içeren bitki

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Tuğba Nurcan YÜKSEL
Adres: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, TÜRKİYE.
E-posta: tnyuksel@nku.edu.tr

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 02.10.2019
Date Accepted / Kabul Tarihi: 21.11.2019

elma olmakla birlikte nar, çilek, kuşburnu gibi çok az türde de düşük miktarlarda florizin bulunmaktadır. Florizin diyabet, obezite, stres ve hiperglisemi durumlarında klinik uygulama potansiyeline sahiptir. Ancak yeteri kadar ilgili mekanizma bildirilmemiştir. Floretin ve florizin antioksidan aktivite, glikoz taşıyıcılarının düzenlenmesi ve tümör hücrelerinde apoptozisi indüklemeye gibi birçok biyolojik fonksiyona sahiptir^{2,3,4}. Bu nedenle floretin ve florizin yeni farmasötik ajan olarak ilgi çekici bir hedefdir.

Santral sinir sistemini ilgilendiren birçok hastalığın fizyopatolojisinde birincil hasar iskemik ve travmatik olayları kapsarken ikincil hasar hücre seviyesinde dakikalar içinde gelişmeye başlayan kompleks olayları içerir. İkincil nöral hasarın patogeneğinde eksitatör nörotransmitterlerin rol oynadığı bilinmektedir⁵. Glutamat ve aspartat gibi eksitatör aminoasitler memeli santral sinir sisteminin ana nörotransmitterleridir. Glutamat sinaptik geçişi yönlendirir ve iyon geçişini kontrol eder. Ayrıca glutamat nörotoksitenin kaynağını oluşturur. Eksitatör aminoasit toksisitesi ile akut değişiklikler nöronun depolarizasyonu ile başlar. Hücre dışı Cl⁻ hücre içine girer. İyon dengesinin devam etmesi için Na⁺ girişi olur ve hücre şişer. Nöronal kalsiyum kanallarını NMDA reseptörü düzenler. Glutamat plazma membran depolarizasyonu ile Ca⁺⁺ 'nın hücre içine girişine, nitrik oksit sentaz gibi serbest radikal oluşturan sistemlerin aktivasyonuna ve sonuçta oksidatif strese bağlı olarak nöral ve glial ölüme neden olur. Hücrede Ca⁺⁺ artışı lipolitik enzimleri aktive eder. Bu enzimler nöron membranındaki fosfolipidlerden araşidonik asit salınımına neden olur. Prostaglandin, tromboksan ve lökotrienler sentezlenir ve serbest radikal ve lipid peroksidleri ile nöronun ölümüne kadar sürer⁶. Glutamata bağlı gelişen nörodejeneratif

hastalıklara karşı halen spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Glutamata bağlı gelişen nöron hasarına karşı floretin ve florizin etkisine yönelik herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkinliği olan floretin ve florizinin glutamata bağlı gelişen nörotoksitenin üzerindeki etkilerini biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar ile ortaya koymayı amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Deney Hayvanı Temini: Çalışmamızda 10 adet yenidoğan sprague dawley cinsi erkek sıçanlar Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (ATADEM) temin edildi. Çalışmamızın etik kurallara uygunluğu Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADYEK) birimi tarafından 10.10.2018 tarihli 2018-078 numaralı etik kurul kararı ile onaylandı. Çalışmamız herhangi bir maddi destek alınmadan gerçekleştirildi.

Primer Nöron Kültürü: Yenidoğan sprague dawley sıçan yavruları hızlı bir şekilde dekapite edilerek korteks nöronları alındı ve hazır olan solüsyonda bekletildi. 1:1 tripsin ilave edildi ve inkübatörde 30 dakika süreyle bekletildikten sonra 3 defa santrifüj yapıldı ve her defasında süpernatant atıldı. Bir tüpe nörobasal medyum, 1000:1 penisilin, 50:1 B27 ve 10:1 fetal bovin serum (Gibco-Invitrogen Inc., New York, USA) ilave edilerek medyum hazırlandı. Hazırlanan medyumun içine hücreler eklendi. Hücreler, odacıkların tabanına yapışması, tabanını kaplaması ve büyümesi için 10 gün inkübatörde bekletildi.

İlaç Uygulaması: Her grupta 10 kuyucuk olacak şekilde gruplar Tablo 1'deki gibi dizayn edilerek kurulan korteks primer kültürüne

glutamatın daha önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz toksisite dozları olan 3×10^{-3} M ve 6×10^{-3} M glutamat ⁷ (49621-Sigma-Aldrich, Missouri, USA) uygulanarak toksisite oluşturuldu. Toksikite oluşturulmadan 2 saat önce daha önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz 10^{-5} M ve 2×10^{-5} M konsantrasyonlarında floretin ⁸ (P7912-Sigma-Aldrich, Missouri, USA) ile 10^{-5} M ve 2×10^{-5} M konsantrasyonlarında florizin ⁸ (PHL80513-Sigma-Aldrich, Missouri, USA) ayrı ayrı 0,001'lik metanol ile çözümlenerek uygulandı.

Tablo 1. Gruplar

Grup 1 - Saf kontrol	Grup 7 - Floretin 10^{-5} M + G2
Grup 2 - Metanol (0,001'lik)	Grup 8 - Florizin 10^{-5} M + G2
Grup 3 - Glutamat 3×10^{-3} M (G1)	Grup 9 - Floretin 2×10^{-5} M + G1
Grup 4 - Glutamat 6×10^{-3} M (G2)	Grup 10 - Florizin 2×10^{-5} M + G1
Grup 5 - Floretin 10^{-5} M + G1	Grup 11 - Floretin 2×10^{-5} M + G2
Grup 6 - Florizin 10^{-5} M + G1	Grup 12 - Florizin 2×10^{-5} M + G2

Hücre canlılığı testi: İlaç uygulamasından 24 saat sonra hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) proliferasyon kiti (10009365-Cayman, USA) ile ölü/canlı hücre sayısı ortaya kondu. Ölçümler EPOC ELİSA reader cihazı ile 570nm dalga boyunda ve kitte yer alan direktiflere uygun bir şekilde yapıldı.

Oksidatif stresin belirlenmesi: Toksikite uygulamasından 24 saat sonra hücre medyumları toplanarak Total Oksidan Düzeyini (TOD) belirlemek amacı ile ticari TOD kiti (Mega 02-Rel Assay-TURKEY) kullanıldı. Diğer yandan floretin ve florizinin glutamata bağlı gelişen nörotoksistide primer nöron kültür hücreleri üzerindeki Total Antioksidan Kapasitesini (TAK) belirlemek amacı ile ticari TAK kiti (Mega 01-Rel Assay-TURKEY) kullanıldı. Ölçümler kitte yer alan direktiflere uygun olarak ikişerli tekrar olacak şekilde yapıldı.

Moleküler Analizler

RNA izolasyonu: Çalışmamızda TNF- α , kaspaz 9 ve kaspaz 3 mRNA ekspresyon

düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılabilmesi için toksisiteden 6 saat sonra hücrelerden RNA ekstraksiyonu yapıldı. Hücre örneklerinden RNeasy Mini Kit (74104-Qiagen, GERMANY) kullanılarak QiaCube RNA izolasyon cihazında (Qiagen) total RNA izolasyonu aşamaları üreticinin tavsiye ettiği şekilde sürdürüldü.

cDNA sentezi ve RT-PCR ile gen ekspresyonu analizi:

cDNA Reverse Transcription Kit (4896866001-Roche,TURKEY) enzimi kullanımı ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Her reaksiyon 10 μ l RNA ile gerçekleştirilerek cDNA sentezi belirlenen sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 Well Roch Light Cyclus ile sağlandı. cDNA miktarı nano drop spektrofotometri (EPOCH Plate, Biotek) ile ölçülerek belirlendi. Gene Expression Master Mix kiti (04535286001-Roche, TURKEY) kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi Roche light Cyclus cihazında yapıldı. 100ng cDNA için Roche Gene Expression Assays'ler pipetlendi ve 40 siklus ile yürütüldü. Cycle threshold (C_t) değerleri cihazda otomatik olarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 'ye çevrildi ve çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler:

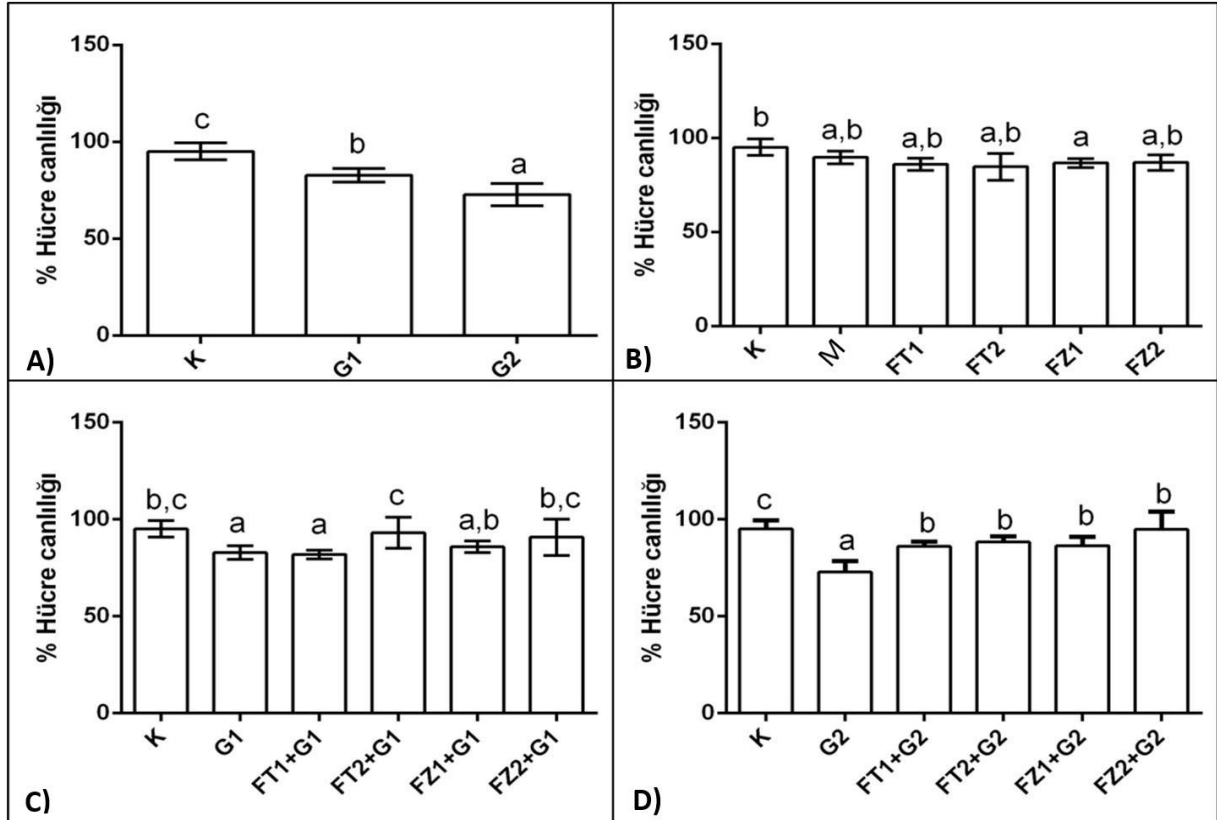
Çalışmamızın biyokimyasal ve moleküler verileri IBM 25.00 SPSS paket programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki farkı analiz etmek için One Way ANOVA çoklu karşılaştırma testinden Post Hoc Tukey testi kullanıldı. Verilerin ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Şekillerde sütunlardaki harflerin aynı olması istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını,

harflerin farklı olması ise istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

BULGULAR

Hücre Canlılığı Bulguları: Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre MTT sonuçlarımız incelendiğinde glutamatın yüksek doz uygulanması ile düşük doza ve kontrole göre istatistiksel olarak en anlamlı farkı oluşturacak şekilde hücre canlılığının azaldığı görüldü (Şekil 1-A) ($p<0,05$). Kontrole göre kıyaslandığında metanol uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı derecede herhangi bir toksik etki göstermediği görüldü (Şekil 1-B) ($p>0,05$). Floretin ve florizin çözeltilerinin

metanolde çözülerek hazırlanmış şekilde uygulanmasının istatistiksel olarak yine anlamlı derecede herhangi bir toksik etki göstermediği görüldü (Şekil 1-B) ($p>0,05$). Düşük doz glutamat uygulaması ile oluşturulan toksisiteye karşı düşük ve yüksek doz floretin ve florizin uygulanmasında sadece yüksek doz floretin ve florizinin toksisiteyi önlemede istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturduğu görüldü (Şekil 1-C) ($p<0,05$). Yüksek doz glutamat uygulaması ile oluşturulan toksisiteye karşı uygulanan tüm floretin ve florizin dozlarının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturarak toksisiteyi önlediği görüldü (Şekil 1-D) ($p<0,05$).



Şekil 1: MTT sonuçları **A)** Glutamatın düşük ve yüksek dozunun kontrole göre kıyaslanması **B)** Metanol ile çözülen floretin ve florizin dozlarının metanol ve kontrole göre kıyaslanması **C)** Düşük doz glutamat uygulaması ile oluşturulan toksisiteye karşı floretin ve florizinin düşük ve yüksek dozlarının etkisi. **D)** Yüksek doz glutamat uygulaması ile oluşturulan toksisiteye karşı floretin ve florizinin düşük ve yüksek dozlarının etkisi. Sütunlardaki harflerin aynı olması istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını, harflerin farklı olması ise istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. K:Kontrol, M:Metanol G1: Glutamat düşük doz G2: Glutamat yüksek doz FT1: Floretin düşük doz FT2: Floretin yüksek doz FZ1: Florizin düşük doz FZ2: Florizin yüksek doz.

Oksidatif Stres Bulguları: Canlılık testleri ile ortaya konan bilgiler ışığında toksisitenin en şiddetli olduğu doz olan yüksek doz glutamat toksisitesine karşı hücre canlılığını en çok

artıran yüksek doz floretin ve florizin ile total oksidan ve antioksidan kapasite belirlenmesi yapıldı. Belirlenen sonuçlara göre yüksek doz glutamat uygulaması ile TAK seviyesi kontrole

göre anlamlı derecede azalırken bu azalmanın yüksek doz floretin ve florizin uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturacak şekilde düzeltildiği görüldü (Tablo 2) ($p<0,05$). TOD seviyeleri incelendiğinde ise yüksek doz glutamat uygulamasının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturacak şekilde artışa neden olduğu ve bu artan TOD seviyelerinin yüksek doz floretin ve florizin uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturacak şekilde düzeltildiği görüldü (Tablo 2) ($p<0,05$). Hem TAK hem de TOD grafikleri incelendiğinde; yüksek doz glutamat toksisitesine karşı yüksek doz floretin ve florizin uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturduğu görüldü (Tablo 2) ($p<0,05$).

Tablo 2. Floretin ve florizinin oksidatif stres üzerindeki etkilerinin gösterilmesi

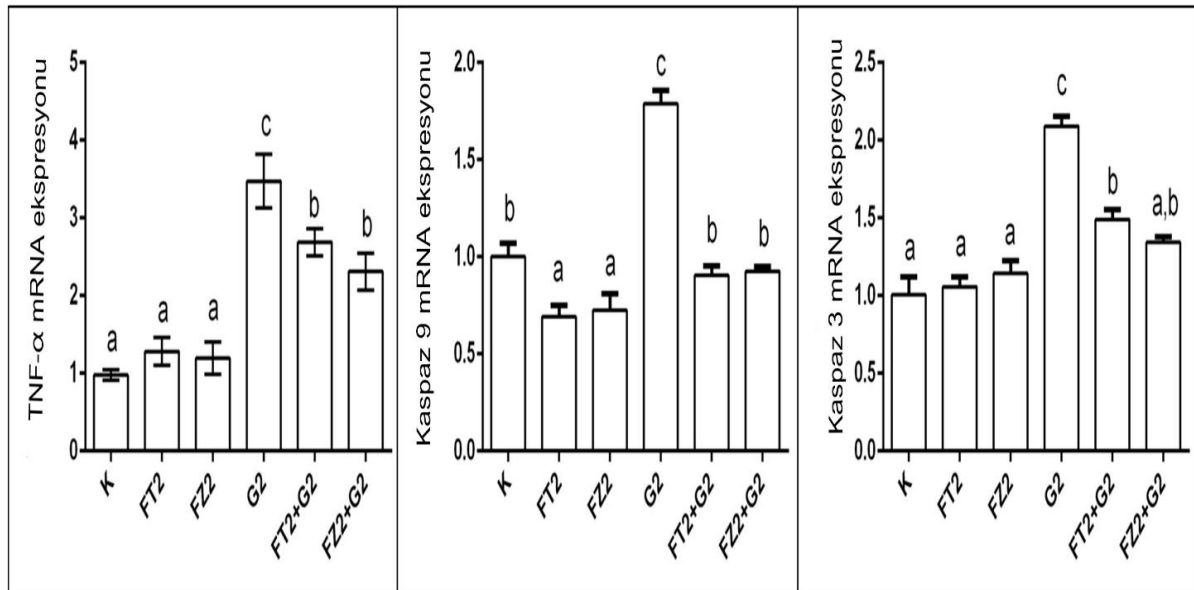
Gruplar	TOD mmol/L	TAK mmol/L
Kontrol	1,49±0,11 (a)	2,17±0,12 (c,d)
FT2	1,69±0,09 (a,b)	2,12±0,07 (b,d)
FZ2	1,59±0,15 (a)	2,37±0,06 (c,d)
G2	2,49±0,17 (c)	1,49±0,14 (a)
FT2+G2	2,05±0,11 (b)	1,77±0,15 (a,b)
FZ2+G2	1,95±0,08 (b)	2,02±0,04 (b,c)

FT: Floretin, FZ: Florizin, G: Glutamat, TOD: Total Oksidan Düzeyi, TAK: Total Antioksidan Kapasite

İnflamatuar Bulgular: Çalışmamızda inflammatuar belirteç olan TNF- α ölçümleri

incelendiğinde toksisiteye neden olan yüksek doz glutamatın TNF- α düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı görüldü ($p<0,05$). Floretin ve florizin uygulanan gruplar tek başına TNF- α düzeylerini etkilemezken glutamat toksisitesine karşı uygulanan yüksek doz floretin ve florizin artan TNF- α düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürdü (Şekil 2) ($p<0,05$).

Apoptozis Bulguları: Çalışmamızda toksisiteye neden olan yüksek doz glutamatın nöron hücrelerinde kaspaz 9 ve kaspaz 3 mRNA ekspresyonlarını kontrole göre anlamlı derecede artırdığı görüldü (Şekil 2) ($p<0,05$). Floretin ve florizin uygulamasının tek başına kaspaz 3 mRNA ekspresyonunu değiştirmezken kaspaz 9 mRNA ekspresyonunu anlamlı derecede baskıladığı görüldü (Şekil 2) ($p<0,05$). Ayrıca toksisiteye neden olan yüksek doz glutamata bağlı olarak artan apoptotik kaspaz 9 ve kaspaz 3 mRNA ekspresyonunun floretin ve florizin uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı derecede düzeldeği görüldü (Şekil 2) ($p<0,05$).



Şekil 2. Yüksek doz glutamat toksisitesine karşı yüksek doz floretin ve florizinin TNF- α , kaspaz 9 ve kaspaz 3 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi. Sütunlardaki harflerin aynı olması istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını, harflerin farklı olması ise istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

TARTIŞMA

Çalışmamızda öncelikli olarak metanolde çözülen floretin ve florizinin olası toksik ve protektif etkilerini ortaya koymak için canlılık testi yapılmıştır. Floretin ve florizinin hücre canlılığını artırıcı ya da azaltıcı bir etkinliği olmadığı görülmüştür. Diğer yandan glutamatın belirlenen iki farklı dozunda toksisite çalışması yapılmış ve her iki dozda da glutamatın toksisite oluşturduğu özellikle yüksek dozda ciddi toksik etki gösterdiği görülmüştür.

Bazal gangliyadan salınan uyarıcı nörotransmitterlerden biri olan glutamat, glutamik asidin anyonudur ve bir sinir hücresinin başka hücrelere sinyal olarak gönderdiği kimyasallardan biridir. Omurgalı sinir sistemi içerisinde büyük farkla en fazla bulunan nörotransmitterdir. Glutamatın aşırı miktarda aktivasyonu eksitoksisiteye yol açmaktadır⁹. Kronik nörodejeneratif hastalıklarda eksitotoksik bulgular, uyarıcı amino asit reseptörlerindeki bir anormallik ve/veya enerji metabolizmasının bozulmasının sonucu olarak meydana gelebilir. Glutamatın sinaptogenez, öğrenme ve hafızada rol oynadığı, ayrıca iskemi, epilepsi ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik pek çok durumda da etkili olduğu bilinmektedir¹⁰. Çalışmamızda da hücre proliferasyonu sonuçlarımıza göre glutamat artan dozlarda daha fazla nöronal ölüme yol açmaktadır. Bu aşırı miktardaki hücre dışı glutamat seviyesi, nörotransmitter reseptörlerinin aşırı uyarılması nedeniyle hücrenin sağlığı ve yaşamı üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Bunun yanında, yüksek seviyedeki hücre dışı glutamat, glutamat/sistin antiporterlerin fonksiyonunu engelleyerek GSH oluşumunu durdurur ve sonuç olarak hücre içi serbest radikal artışı ve hücrel toksisite meydana gelir^{11, 12}. Reaktif

oksijen artışı nöron hücre membranında lipit peroksidasyonuna yol açarak hücre ölümünü tetiklemektedir.

Oksidatif stres ve antioksidan sistemin varlığını göstermek için farklı belirteçler kullanılmaktadır. Bunlardan özellikle ülkemizde üretilen ve toplam oksidan ve antioksidan düzeyi belirlememize yardımcı olan TAK ve TOD ölçümleri bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır¹³. Glutamat nörotoksisitesinde, toksisiteye bağlı olarak oksidatif stres artarken, normal şartlarda sağlıklı hücrelerin sahip oldukları TAK'da ise azalma olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur¹⁴. Glutamat ile indüklenen nörotoksisite oksidatif stres kaynaklı nörotoksisitenin önemli bir mekanizmasıdır^{15, 16, 17}. Hücre dışı glutamat seviyesinin fazlalığı antiport sisteminin inhibe edilmesi ile sistin geri alınımını engeller. Glutasyon prekürsörü olan sistin alınımının inhibisyonu intrasellüler glutasyon seviyelerinde önemli derecede azalışa sebep olur ve buna bağlı olarak hücrelerde oksidatif stres indüklenir^{18, 19}. Çalışmamız sonucunda da; glutamat toksisitesi oluşturulan primer hücre kültürlerinde doza bağlı olarak oksidatif stresin arttığı, antioksidan aktivitenin ise azaldığı görülmektedir.

Floretin ve onun glikozillenmiş türevi olan florizin başta elma olmak üzere pek çok bitkide bulunan güçlü antioksidan maddelerdir. Floretin ve florizinin pek çok deneysel modelde antifungal, antimalarial, antibakteriyel, antikanser, antioksidan ve anti-inflamatuar etkileri gösterilmiştir^{20, 21}. Antioksidan özelliğinden dolayı cilt bakım ürünlerine de eklenen floretin ve florizerin antidiyabetik ajan olarak da bilinmektedir²². Antidiyabetik etkinliğini sodyum glukoz ilişkili transport (SGLT2) inhibitör etkinliği ile oluşturmaktadır

21. Ayrıca overektomi yapılmış sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, menopoz döneminde kemik erimesine karşı koruyucu özelliği olduğu saptanmıştır. Floretinin östrojenik etkisi ve östrojen almalarına bağlanma afinitesi in vitro testlerle belirlenmiştir ²³. Çalışmamızda floretin ve florizin primer nöronlar üzerinde tek başına uyguladıklarında proliferasyona yol amamış aksine anlamlı olmasa bile sayısal olarak azalmaya neden olmuştur. Ancak yüksek dozlarda glutamat toksisitesine karşı güçlü protektif etki ortaya koymuşlardır. Bu durumda floretin ve florizinin stres şartları altında etki edebileceği düşünülmektedir. Barreca ve ark. ²⁴ nöroblastoma hücre kültüründe rotenon ile indükledikleri nörotoksistide floretin ile birlikte florizinin de nroptektif olabileceğini göstermiştir. Yine yapılan bir çalışmada bitkisel birçok madde test edilmiş ve test edilen bileşiklerden floretin neredeyse tamamen 2-kloroheksadekanol kaynaklı beyin mikrovasküler endotel hücre (BMVEC) lmn ortadan kaldırmıştır ²⁵. Hücre koruması için yapısal gereklilikler hakkında bir fikir edinmek için yapılan bir çalışmada, floretinin etkinliği, doğal olarak oluşan glikozile edilmiş prekürsörü olan florizin ile karşılaştırılmıştır. Glikozile edilmemiş floretinin aksine, glikozile edilmiş analoğu olan florizinin BMVEC'nin metabolik aktivitesini etkilemediği ve hatta azalttığı görülmüştür. Bizim alışma bulgularımızda ise glutamat ile indüklenmiş nrotoksisteye karşı floretine göre glikolize analoğu olan florizinin daha koruyucu etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Yine floretin ve florizin uygulaması glutamat toksisitesine bağlı olarak azalmış olan antioksidan kapasiteyi düzeltirken, artmış oksidatif stresi de anlamlı derecede azaltmayı başarmıştır. Floretin ve florizin birbirlerine göre oksidatif stres üzerine anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Barreca ve

ark.'nın ²⁴ yaptığı bir çalışmada ise florizinin floretine oranla lipid peroksidasyonunu daha fazla azalttığı gösterilmiştir.

Glutamata bağlı gelişen nörotoksistide ikinci önemli olay ise inflamasyonun gelişmesidir. İnflamasyon ile oksidatif stres arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır ²⁶. nceki çalışmalarda glutamat toksisitesinin proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırdığı ve nöronal hasarın şiddetlenmesine yol açtığı gösterilmiştir ²⁷. Proinflamatuvar bir sitokin olan TNF-'nın artması inflamatuvar süreci başlatmakta ve devamında pek çok patofizyolojik olaylar zinciri gelişmektedir. Çalışmamızda oksidatif stres ile birlikte TNF-  ekspresyonunun da anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. Floretin ve florizinin anti-inflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada floretin ile tedavinin lipopolisakkarit ile uyarılmış insan akut monositik lösemi türevi hücre dizisinde (MonoMac 6) IL-8, CXCL10 ve TNF- mRNA'larının ekspresyonunu inhibe ettiği görülmüştür ^{2, 28}. Bizim alışmamızda ise glutamat uygulaması ile artan TNF- ekspresyon seviyesi yüksek doz floretin ve florizin uygulaması ile gerilemiştir. Sadece yüksek doz floretin ve florizin uygulaması ise TNF- düzeyini etkilememiştir.

Glutamata nrotoksistesindeki diğer önemli mekanizma ise hücrelerin apoptoza uğramasıdır ²⁹. Glutamata, etkilerine aracılık eden reseptörler olan iGluR'yi ve mGluR'yi aktive eder. iGluR, iyon kanallarını kontrol eder ve santral sinir sisteminde eksitotoksik nörotransmisyonun büyük bölümünden sorumludur. mGluR ise hücre içi enzimlerin G proteini aracılı yol ile kontrolünü sağlar. iGluR, NMDAR ve NMDAR olmayan reseptörler olarak ikiye ayrılır. Santral sinir sisteminde iGluR aracılığı ile meydana gelen nöron

ölümlerinin moleküler mekanizması gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Glutamat uygulamasına bağlı olarak kaspaz protein kaskadı aktive olur. Kaspaz proteinleri apoptozisi kontrol eden şef proteinlerdir. Mitokondri membranından sitokrom c salınımı ile birlikte apoptozu başlatan kaspaz proteinleri de (kaspaz 9 ve kaspaz 3) aktive olmaya başlar³⁰. Aynı zamanda oksidatif strese bağlı olarak da kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivitesinde artma meydana gelmektedir³¹. Kaspaz 9 apoptozun başlamasında rol alırken pro-kaspaz 3 aktivasyonuna yol açar ve kaspaz 3 apoptozun geç fazında rol alarak hücre ölümüne neden olur. Proinflamatuvar sitokin olan TNF- α da aynı zamanda apoptozisi indükleyen öncü maddeler arasında yer almaktadır. Çalışmamızda kaspaz 9 ekspresyonu ve kaspaz 3 ekspresyonu toksisiteye bağlı olarak anlamlı derecede artmıştır. Floretinin kaspaz 3 aktivasyonunu sitotoksosite durumunda nasıl etkilediğini ortaya koymak için yapılan bir çalışmada bazal kaspaz 3 aktivitesini etkilemediği görülmüştür. Floretin varlığının endotel hücreleri üzerinde belirgin bir koruyucu fonksiyona sahip olduğu ve hücre içi ATP içeriğini kısmen koruduğu sonucuna varılmıştır³². Çalışmamız sonucunda floretin ve florizinin tek başlarına kaspaz 3 ekspresyonunu değiştirmedikleri ancak kaspaz 9 ekspresyonunda azalmaya sebep oldukları görülmektedir. Bu durumda floretin ve florizin apoptozisin ilk fazında kaspaz 9 inhibisyonuna yol açarak apoptozun oluşmasını önlemiş olabilir. Aynı zamanda glutamata bağlı gelişen artmış kaspaz 9 ve kaspaz 3 ekspresyonu floretin ve florizin tarafından anlamlı derecede baskılanmıştır.

SONUÇ

Çalışmamızda artan dozlarda glutamat uygulaması hücre canlılığını azaltırken floretin ve florizin uygulaması yüksek dozda en iyi nöroprotektif etkiyi ortaya koymuştur. Toksikiteye bağlı artan total oksidan düzey floretin ve florizin tarafından anlamlı derecede düzeltilmiştir. Yine toksite oluşturulan grupta azalan antioksidan kapasite floretin ve florizin uygulaması ile düzelmeye göstermiştir. Floretin ve florizin tek başlarına uygulandığında hücre canlılığını anlamlı derecede etkilemezken antioksidan kapasiteyi artırmış, oksidan düzeyi ise azaltmıştır. Ayrıca, glutamat uygulaması sonrası artan TNF- α mRNA ekspresyonu, floretin ve florizin uygulaması ile anlamlı derecede azalmıştır. Yine gelişen apoptozisin önlenmesinde floretin ve florizin etki göstererek nöron canlılığını korumuştur. Çalışmamızda en iyi sonuçlar florizinin yüksek dozunda elde edilmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında; güçlü antioksidan ve anti inflamatuvar olan floretin ve florizin glutamat ile indüklenen nörotoksiteyi önlemiştir.

Kaynaklar

1. Shao X, Bai N, He K, Ho CT, Yang CS, Sang S. Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. *Chemical research in toxicology*. 2008;21(10):2042-50.
2. Zhao Y, Liu C, Lai X, Hou S, Zeng X, Li X. Immunomodulatory activities of phlorizin metabolites in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;91:49-53.
3. Duge de Bernonville T, Guyot S, Paulin JP, Gaucher M, Loufrani L, Henrion D, et al. Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochemistry*. 2010;71(4):443-52.
4. Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2005;21(1):31-8.
5. Aşkın Görgülü, Talat Kırış. Eksitator aminoasitler ve eksitotoksite. *Türk Nöroşir Derg* 2005;15(1):33-8.
6. Ömer Faruk Aydın, Aslı Kurne, Rana Karabudak. MS patogeneğinde basamaklar-II:nörodejenerasyonda biyolojik göstergeler, sodyum kanalları ve glutamatın rolü. *Türk Nöroşir Derg*. 2006;12(2):98-105.

7. Binnetoğlu D, Yayla M, ÇINAR İ, DEMİRBAĞ Ç, KILIÇLE PA. Sıçan primer nöron kültüründe glutamat eksitotoksitesisine karşı nar kabuğu ekstresinin etkileri. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2019;16(2):186-92.
8. Yayla M. Phloretin ve phloridzin'nin paklitakselle indüklenen primer nöron hasarına karşı etkilerinin araştırılması. 5Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Kongresi Tam Metin kitabı; 02-03 Kasım 2018; Antalya: Akademisyen Kitabevi; 2018. p. 175-80.
9. Sharma A, Kaur G. *Tinospora cordifolia* as a potential neuroregenerative candidate against glutamate induced excitotoxicity: an in vitro perspective. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18(1):268.
10. Li JM, Zeng YJ, Peng F, Li L, Yang TH, Hong Z, et al. Aberrant glutamate receptor 5 expression in temporal lobe epilepsy lesions. *Brain research*. 2010;1311:166-74.
11. Hirata Y, Yamamoto H, Atta MS, Mahmoud S, Ohhashi K, Kiuchi K. Chloroquine inhibits glutamate-induced death of a neuronal cell line by reducing reactive oxygen species through sigma-1 receptor. *J Neurochem*. 2011;119(4):839-47.
12. Chen J, Chua KW, Chua CC, Yu H, Pei A, Chua BH, et al. Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neurosci Lett*. 2011;499(3):181-5.
13. Aslan R, Kutlu R, Civi S, Tasyurek E. The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking. *Clinical biochemistry*. 2014;47(6):393-7.
14. Nampoothiri M, Reddy ND, John J, Kumar N, Kutty Nampurath G, Rao Chamallamudi M. Insulin blocks glutamate-induced neurotoxicity in differentiated SH-SY5Y neuronal cells. *Behav Neurol*. 2014;2014:674164.
15. Kanki R, Nakamizo T, Yamashita H, Kihara T, Sawada H, Uemura K, et al. Effects of mitochondrial dysfunction on glutamate receptor-mediated neurotoxicity in cultured rat spinal motor neurons. *Brain research*. 2004;1015(1-2):73-81.
16. Hirata Y, Yamamoto H, Atta MSM, Mahmoud S, Ohhashi K, Kiuchi K. Chloroquine inhibits glutamate-induced death of a neuronal cell line by reducing reactive oxygen species through sigma-1 receptor. *Journal of neurochemistry*. 2011;119(4):839-47.
17. Chen J, Chua K-W, Chua CC, Yu H, Pei A, Chua BH, et al. Antioxidant activity of 7, 8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neuroscience letters*. 2011;499(3):181-5.
18. Ma S, Liu H, Jiao H, Wang L, Chen L, Liang J, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells via inhibition of ROS generation and Ca²⁺ influx. *Neurotoxicology*. 2012;33(1):59-69.
19. Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x_c⁻: cystine supplier and beyond. *Amino acids*. 2012;42(1):231-46.
20. Wang G, Gao Y, Wang H, Wang J, Niu X. Phloretin reduces cell injury and inflammation mediated by *Staphylococcus aureus* via targeting sortase B and the molecular mechanism. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018;102(24):10665-74.
21. Xu M, Gu W, Shen Z, Wang F. Anticancer Activity of Phloretin Against Human Gastric Cancer Cell Lines Involves Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Inhibition of Cell Invasion and JNK Signalling Pathway. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:6551-8.
22. Cho SJ, Moon JS, Lee CM, Choi AM, Stout-Delgado HW. Glucose Transporter 1-Dependent Glycolysis Is Increased during Aging-Related Lung Fibrosis, and Phloretin Inhibits Lung Fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017;56(4):521-31.
23. Puel C, Quintin A, Mathey J, Obled C, Davicco MJ, Lebecque P, et al. Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions. *Calcified tissue international*. 2005;77(5):311-8.
24. Barreca D, Curro M, Bellocco E, Ficarra S, Lagana G, Tellone E, et al. Neuroprotective effects of phloretin and its glycosylated derivative on rotenone-induced toxicity in human SH-SY5Y neuronal-like cells. *BioFactors*. 2017;43(4):549-57.
25. Ullen A, Fauler G, Bernhart E, Nussold C, Reicher H, Leis HJ, et al. Phloretin ameliorates 2-chlorohexadecanal-mediated brain microvascular endothelial cell dysfunction in vitro. *Free radical biology & medicine*. 2012;53(9):1770-81.
26. Chaparro-Huerta V, Flores-Soto ME, Gudino-Cabrera G, Rivera-Cervantes MC, Bitzer-Quintero OK, Beas-Zarate C. Role of p38 MAPK and pro-inflammatory cytokines expression in glutamate-induced neuronal death of neonatal rats. *Int J Dev Neurosci*. 2008;26(5):487-95.
27. Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med*. 2000;6(1):62-6.
28. Chang WT, Huang WC, Liou CJ. Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food chemistry*. 2012;134(2):972-9.
29. Rajabian A, Boroushaki MT, Hayatdavoudi P, Sadeghnia HR. *Boswellia serrata* Protects Against Glutamate-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in PC12 and N2a Cells. *DNA and cell biology*. 2016;35(11):666-79.
30. Wang YC, Lee CM, Lee LC, Tung LC, Hsieh-Li HM, Lee-Chen GJ, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12). *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(24):21742-54.
31. Kirkland RA, Saavedra GM, Cummings BS, Franklin JL. Bax regulates production of superoxide in both apoptotic and nonapoptotic neurons: role of caspases. *J Neurosci*. 2010;30(48):16114-27.
32. Choi BM, Chen XY, Gao SS, Zhu R, Kim BR. Anti-apoptotic effect of phloretin on cisplatin-induced apoptosis in HEI-OC1 auditory cells. *Pharmacological reports: PR*. 2011;63(3):708-16.