

Ginkgo Biloba Özütünün in Vitro Alzheimer Hastalığı Modelinde TRPV1 Kanalları Aracılığıyla Koruyucu ve Terapötik Rolü

Protective and Therapeutic Role of Ginkgo Biloba Extract Through TRPV1 Channels in an in Vitro Alzheimer's Disease Model

Ahmet ÖZŞİMŞEK¹, İshak Suat ÖVEY², Ertan KARAÇAY¹, Burak YULUĞ¹

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Türkiye

²Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Türkiye

ÖZ

Amaç: Ginkgo biloba'nın (GB) nöroblastom hücrelerinde mitokondriye bağımlı TRPV1 iyon kanalları üzerindeki etkisi Alzheimer hastalığı (AH) modeli oluşturularak araştırıldı.

Yöntem: Bir AH modeli oluşturmak için SH-SY5Y hücrelerine okadaik asit uygulandı. Hüresel farklılaşmadan sonra yedi ana gruba organize edilen çalışma, GB'nin nöroblastom hücrelerinde AH'de kalsiyuma bağlı TRPV1 kanallarına etkisinin incelendiği in vitro çalışmadır.

Bulgular: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GB+AH, AH ve AH+GB gruplarında daha yüksek Ca²⁺ konsantrasyonu saptandı (p<0,001). Ca²⁺ düzeyi GB+AH ve AH+GB gruplarında AH grubuna göre daha düşüktü (p<0,001). Ayrıca GB+AH'de sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonu AH+GB grubuna göre daha düşüktü (p<0,05), apoptoz ve hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) değerleri GB+AH, AH ve AH+GB'de kontrol grubuna

göre daha yüksekti (p<0,001). Apoptoz ve hücre içi ROS değerleri AH grubunda GB+AH ve AH+GB grubuna göre daha yüksekti (p<0,001) ve AH+GB grubunda apoptoz düzeyi GB+AH grubuna göre daha yüksekti (p<0,001) ve mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri GB+AH, AH ve AH+GB gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksekti (p<0,001). Ayrıca GB+AH+kapsazepin grubu, AH+kapsazepin grubu ve AH+GB+kapsazepin ile karşılaştırıldığında GB+AH grubu, AH grubu ve AH+GB gruplarında değerler daha düşüktü (p<0,001).

Sonuç: Bu sonuçlar bize GB'nin TRPV1 kanalı üzerinden Alzheimer hastalığında tedavi edici etkisinin yanında koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer hastalığı, Ginkgo biloba, nöroblastom hücreleri, ROS (reaktif oksijen türleri), TRPV1

ABSTRACT

Introduction: The effect of Ginkgo biloba (GB) on mitochondria-dependent TRPV1 ion channels in neuroblastoma cells was investigated by creating an Alzheimer's disease (AD) model.

Methods: Okadaic acid was applied on SH-SY5Y cells to create an AD model. After cellular differentiation, the study was organized with the seven main groups, examining the effect of GB on calcium depended TRPV1 channels in neuroblastoma cells AD, has been established in vitro.

Results: The higher Ca²⁺ concentration was detected in the GB+AD, AD and AD+GB groups when compared with the control (p<0.001). The Ca²⁺ level was lower in GB+AD and AD+GB groups than in the AD group (p<0.001). Also, cytosolic Ca²⁺ concentration was lower in the GB+AD than in the AD+GB group (p<0.05), the apoptosis and intracellular reactive oxygen species (ROS) values were higher in the GB+AD, AD and AD+GB

groups than in the control (p<0.001). The apoptosis and intracellular ROS values were higher in AD group than in the GB+AD and AD+GB group (p<0.001) and the apoptosis level was higher in AD+GB group than GB+AD group (p<0.001) and the mitochondrial depolarization, caspase 3 and caspase 9 levels were higher in the GB+AD, AD and AD+GB groups when compared to the control group (p<0.001). Also, the values were lower in the GB+AD group, AD group and AD+GB groups when compared with the GB+AD+capsazepine group, AD+capsazepine group and AD+GB+capsazepine respectively (p<0.001).

Conclusion: These results show us that GB has a protective effect besides its therapeutic effect in Alzheimer's disease via TRPV1 channel.

Keywords: Alzheimer disease, Ginkgo biloba, neuroblastoma cells, ROS (reactive oxygen species), TRPV1.

Cite this article as: Özşimşek A, Övey İS, Karacay E, Yuluğ B. Ginkgo Biloba Özütünün in Vitro Alzheimer Hastalığı Modelinde TRPV1 Kanalları Aracılığıyla Koruyucu ve Terapötik Rolü. Arch Neuropsychiatry 2023;60:207-213.

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), nörodejeneratif bozukluk olarak sınıflandırılan yaygın bir demans nedenidir. Alzheimer hastalarının sayısına ve ilgili toplumsal maliyetlere dayalı olarak, bazı klinik araştırmalar doğal ilaçların potansiyel faydalarına odaklanmıştır (1). Araştırmacılar, AH'deki potansiyel etkilerini belirlemek için çeşitli sentetik veya bitkisel bileşikler kullanmaktadır (2)

Ginkgo biloba'nın Çin'in doğusundaki Zhejiang eyaletindeki uzak dağlık vadilerde ilk olarak yetiştiğine inanılmaktadır (3). Standardize Ginkgo biloba ekstresi (GBE), kurutulmuş Ginkgo yapraklarından elde edilir ve bunama ve hafıza bozukluklarının yanı sıra Alzheimer hastalığının (AH) tedavisinde terapötik olabilir. Ginkgo biloba'nın tıbbi kullanımı Çin'de yaklaşık 5000 yıl önce ilk kez astım tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (4,5).

Öne Çıkan Noktalar

- Ginkgo biloba, in vitro AH modelinde TRPV1 kanalları aracılı antiapoptotik etki gösterir
- Ginkgo biloba, TRPV1 kanalları aracılı hücre içi Ca²⁺ ve ROS düzeylerini azaltır
- Ginkgo biloba AH oluşturulmadan önce uygulandığında hastalık koruyucu etki gösterir.

AH'nın apoptotik yolak ve mitokondriyal fonksiyonlar üzerine önemli etkileri, enerji metabolizması gelişmeleri, mitokondriyal membran stabilizasyonu, sitokrom c inhibisyonu, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin regülasyonu ve pro-apoptotik Bax proteinleri regülasyonu, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün azalması gibi öncelikle apoptotik yol ve mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki etkileri ve oksidatif stresin neden olduğu apoptozis bildirilmiştir. Birkaç temel ve klinik öncesi araştırma, standardize edilmiş Ginkgo biloba ekstraktının yaşlı vatandaşlarda AH 'nin yanı sıra diğer nörodegeneratif bozuklukların tedavisinde ve önlenmesinde yardımcı olabileceğini göstermiştir (6).

Geçici reseptör potansiyel ailesi vanilloid tip 1 kanalları (TRPV1), seçici olmayan bir katyon kanalı olan trigeminal gangliyon, duyu nöronları ve dorsal kök nöronlarında eksprese edildiği bildirilmiştir. Farklı agonistlerle uyarılma potansiyeline sahip TRPV1 kanalları, kapsaisin, protonlar ve 43°C 'den yüksek ısı ile aktive olabilir. Geçici reseptör potansiyel ailesi vanilloid tip 1 kanallarının ağrı sinyallerinin oluşum ve iletiminde önemli katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Reaktif oksijen türleri üretime bağlı aktive olan TRPV1 kanallarının inhibisyonu, aktive edilmiş mikroglianin olumsuz etkilerini ve Aβ peptidi tarafından uyarıldıktan sonra astrositlerin indüklediği enflamatuvar yanıtı önemli ölçüde azaltır (7). Aşırı ROS üretiminin ve artan Ca²⁺ konsantrasyonunun nörodegeneratif hastalıkların ilerlemesinde önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir. Antioksidanlar ve Ca²⁺ kanal blokerleri hücre içi dengesizliğin ve anormal hücre sel fonksiyonların regülasyonuna yardımcı olabilir (8).

Bu çalışmada; deneysel olarak nöroblastoma hücrelerinde oluşturulan AH modelinde Ginkgo biloba'nın TRPV1 kanalları aracılı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin in vitro olarak incelenmesi amaçlandı.

YÖNTEM

Hücre Kültürü ve Nöral Farklılaşma

SH-SY5Y (insan nöroblastoma hücre dizisi) hücreleri, American Type Culture Collection'dan (ATCC; Manassas, VA) temin edildi. Hücreler HAMS/F12 ve Dulbecco's Modified Eagle Medium 1:1 oranında ayarlanarak içine %10 FBS (fetal bovineserum) (Fisher Scientific) ve %1 pen. /strep. antibiyotik kombinasyonu ile hazırlanan mediumlar kullanılarak her bir filtrelili kapaklı T25 flaska 5 ml medium olacak şekilde kültürlendi. Hücreler, steril inkübatörde 37°C'de %5 CO₂'de inkübe edildi. Farklılaşma için hücreler inkübatörde 5 µM retinoik asit (Sigma) içeren mediumlarda 7 gün süre ile tutuldu (9). Farklılaşma periyodundan sonra, nöroblastom hücreleri, grup açıklamaları kısmında bildirildiği gibi GB ekstresi ve okadaik asit ile inkübe edildi. Hücreler kontaminasyon kontrolü için günlük olarak incelendi. İnkübasyondan sonra, hücreler yapılacak analizler için sterilize falcon tüplerine ayrıldı.

Reaktifler/Boyalar

Fura 2 (AM) floresan kalsiyum boyası, Calbiochem'den (Darmstadt, Almanya), Pluronic® F-127, Biovision'dan (San Francisco, ABD) temin edildi. Probenecid ve bir mitokondriyal leke 5.50, 6.60-tetrakloro-1.10.3.30-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür (JC-1), Santa

Cruz'dan (Dallas, Texas, ABD) temin edildi. Kaspaz-3 (AC-DEVD-AMC) ve 9 (AC-LEHD-AMC) substratı Enzo'dan (Lozan, İsviçre) temin edildi. Programlı hücre ölümü tayini için APOpercentage kiti Biocolor'dan (Belfast, Kuzey İrlanda) temin edildi. Dihidrorhodamin-123 (DHR 123), Sigma Aldrich'ten (St. Louis, MO) temin edildi.

Gruplar

Hücre farklılaşmasından sonra, çalışma aşağıdaki yedi ana gruba ayrıldı:

Grup 1 (Kontrol): İlaç verilmedi ve SH-SY5Y aynı hücre kültürü altında bir şişede tutuldu.

Grup 2 (GB+AH): Hücreler 25 µg/ml Ginkgo biloba ekstraktı ile 24 saat, ardından 30 nm okadaik asit ile 24 saat inkübe edildi (10,11).

Grup 3 (GB+AH+Cpz): Bu gruptaki hücreler 25 µg/ml Ginkgo biloba ekstresi ile 24 saat, 30 nm okadaik asit ile 24 saat ve TRPV1 kanal antagonisti Kapsazepin (Cpz, 0,1 mM, 30 dakika) ile inkübe edildi.

Grup 4 (AH): Bu gruptaki hücreler 30 nm okadaik asit ile 24 saat inkübe edildi (10).

Grup 5 (AH+Cpz): Bu gruptaki hücreler, 24 saat boyunca 30 nm okadaik asit ile inkübe edildi ve ardından TRPV1 kanal antagonisti kapsazepin (Cpz, 0,1 mM, 30 dakika) ile inkübe edildi.

Grup 6 (AH+GB): Gruptaki hücreler 30 nm okadaik asit ile 24 saat inkübe edildi ve ardından 25 µg/ml Ginkgo biloba ekstresi ile 24 saat inkübe edildi.

Grup 7 (AH+GB+Cpz): Gruptaki hücreler 30 nm okadaik asit ile 24 saat inkübe edildi ve ardından 25 µg/ml Ginkgo biloba ekstresi ile 24 saat inkübe edildi ve ardından TRPV1 kanal antagonisti Kapsazepin (Cpz, 0,1 mM; 30 dakika) ile inkübe edildi.

Apoptozu, hücre içi reaktif oksijen türlerini, mitokondriyal depolarizasyonu ve Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 seviyelerini belirlemek için hücreler, analizden önce TRPV1 kanalını aktive etmek için TRPV1 kanal agonisti Kapsaisin (Cap, 0,1 mM; 10 dakika) ile inkübe edildi. Kalsiyum sinyal analizi (Fura-2/AM) için ise, hücreler, 1,2 mM Kalsiyum içeren ve kalsiyum içermeyen solüsyonlarda 0,1 mM Cap ile 20. siklusta uyarıldı.

Hücre İçi Kalsiyum Ölçümleri

SH-SY5Y hücrelerinin hücre içi kalsiyum seviyeleri, Fura-2 AM (asetoksimetil ester) boyası kullanılarak ölçüldü. Hücreler, 1,2 mM CaCl₂ ve kalsiyum içermeyen HEPES tamponu [HBS; 5 mM KCl, 10 mM D-glikoz, 145 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES ve %0,1 (w/v) siğir serum albümini (BSA) pH 7,4], 5 µM Fura-2 AM ve %0,05 Pluronic F-127 (w/v) içerecek şekilde karıştırılıp 37°C 'de ve 60 dakika karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra hücreler iki kez HBS ile yıkandı ve Fura-2 AM'nin de-esterifikasyonu için karanlıkta 37°C'de en az 20 dakika boyunca 2,5 mM probenecid içeren 1 ml HBS ile inkübe edildi. Floresans yoğunluğu 510 nm (emisyon) ve 340 ve 380 nm (eksitasyon) dalga boylarında her üç saniyede bir toplam 50 siklusta olacak şekilde otomatik enjeksiyon sistemine sahip plaka okuyucu cihaz (Synergy™ H1; Biotek, ABD) ile numune bulunan her kuyucuk için ölçüldü. Hücre içi kalsiyum sinyal ölçümü sırasında TRPV1 kanalları 20. siklusta 0,1 mM Kapsaisin ile cihaza ait otomatik enjektör yardımıyla uyarıldı. Kalsiyum sinyal ölçümü protokolü, Martinez ve ark. ile Uğuz ve ark.'na ait yöntemler birlikte modifiye edilerek gerçekleştirildi (12,13).

Apoptozis Testi ve Hücre İçi ROS Türleri Ölçümü

APOpercentage™ (hücre apoptosis tayin kiti) apoptozu belirlemek ve ölçmek için kullanıldı. APOpercentage, fosfatidil-serin lipidlerine aktif olarak bağlanır ve hücrelere aktarıldıkça, apoptotik hücreler kırmızı

renkte boyanır. Apoptoz analizi üretici tarafından açıklanan talimatlara göre yapıldı (13,14). SH-SY5Y hücreleri, apoptotik hücreleri belirlemek için 550 nm'de (Synergy™ H1, Biotek, ABD) spektrofotometri (multiplate okuyucu) ile analiz edildi ve sonuçlar, (deney/kontrol) taban çizgisine göre kat değişimi olarak sunuldu.

Yüksüz ve flüoresan olmayan boya [Dihidrorhodamin-123 (DHR-123)] hücre zarından kolayca geçer. SH-SY5Y hücrelerinin içinde DHR-123, mitokondride lokalize olan ve yeşil floresan gösteren katyonik rodamin-123'e (Rh-123) oksitlenir. Hücreler (her grup için 106 hücre/ml), 37°C'de 25 dakika boyunca floresan oksidan boya olarak 20 µm DHR-123 ile inkübe edildi (Öz ve Çelik 2016). Rh-123 floresan yoğunluklarını belirlemek için Synergy™ H1 otomatik mikropilaka okuyucu cihazı kullanıldı. Analizler 488 nm eksitasyon dalga boyunda ve 543 nm emisyon dalga boyunda gerçekleştirildi. Veriler, kontrole göre kat değişimi olarak sunuldu.

Kaspaz 3 Ve 9 Aktivite Testleri ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli (Jc-1) Analizleri

Kaspaz 3 (AC-DEVD-AMC) ve 9 (AC-LEHD-AMC) substratı, Synergy™ H1 mikropilaka okuyucusu (Biotek, ABD) ile 360 nm ve 460 nm dalga boylarında (eksitasyon/emisyon) belirlendi. Kaspaz 3-9 aktiviteleri daha önce bildirilen yöntemlere göre analiz edildi (14). Bulgular, floresan birimleri/mg protein olarak ve deneysel/kontrol katlarındaki değişim olarak sunuldu.

Mitokondriyal membran potansiyeli floresan boyası [JC1(1 µM)] yoğunluğu 485 nm (yeşil) eksitasyon dalga boyu ve 535 nm emisyon dalga boyu, kırmızı sinyal 540 nm (eksitasyon) ve 590 nm (emisyon) dalga boylarında (Synergy™ H1, Biotek, ABD) kontrol edildi (13) 0,14). Çalışma

verileri emisyon oranı (590/535) olarak sunuldu. Mitokondriyal membran değişiklikleri ise deney/kontrol gruplarında JC1 floresans oranındaki azalmanın integrali olarak miktar olarak belirlendi.

İstatistiksel Analizler

Tüm bulgular ortalama ± standart sapma (SD) olarak sunuldu. Grupların istatistiksel karşılaştırması one-way ANOVA ile yapıldı. İstatistiksel analizler Windows için GraphPad ve Prism sürüm 7.04 (GraphPad Software, San Diego California, ABD) ile yapıldı; p<0,05 anlamlı kabul edildi.

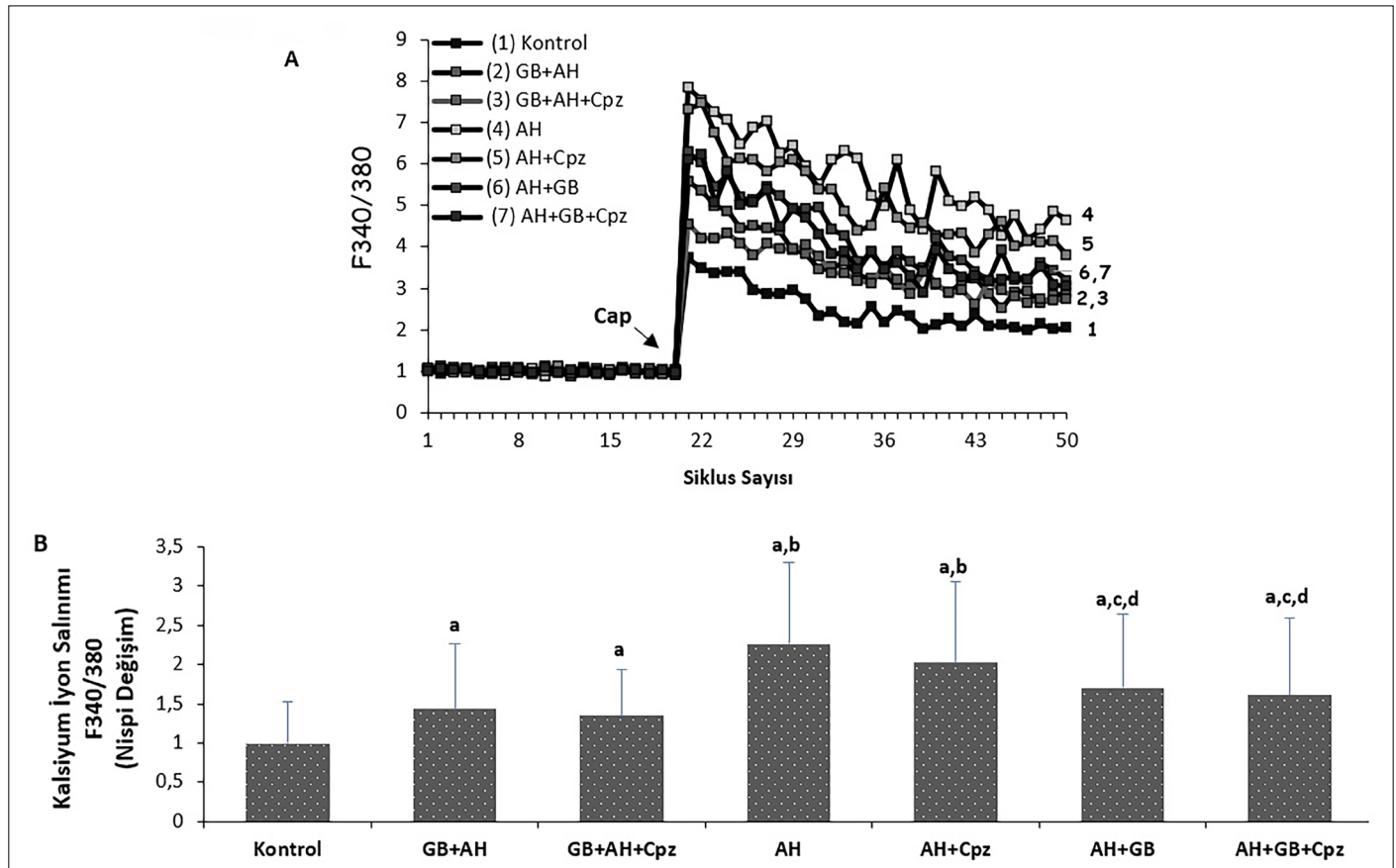
BULGULAR

Okadaik Asitle İndüklenen İn vitro AH Modelinde GB'nin Sitolik Kalsiyum Seviyelerine Etkileri

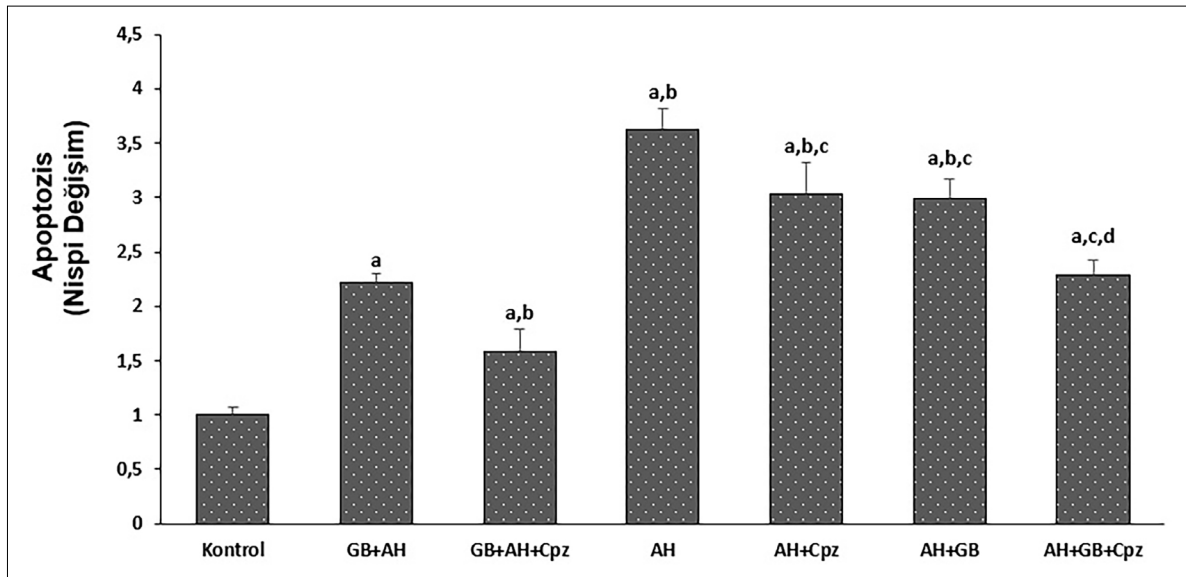
Ginkgo biloba uygulamasının nöroblastoma hücreli sitozolik kalsiyum seviyeleri üzerindeki etkisi Şekil 1'de (a, b) gösterilmektedir. Geçici reseptör potansiyel ailesi vanilloid tip 1 kanal stimülatörü kapsaisin ve bloker kapsazepin, in vitro AH modelinde TRPV1 kanalları aracılığıyla hücre içi Ca²⁺ artışını değerlendirmek için kullanıldı. Şekil 1b'de görüldüğü gibi GB+AH, AH ve AH+GB gruplarında SH-SY5Y'de Ca²⁺ konsantrasyonunun kontrole temel seviyelere göre arttığı saptandı (p<0,001). Ca²⁺ düzeyi GB+AH ve AH'de daha düşüktü. +GB grupları AH grubuna göre (p<0,001). Ayrıca GB+AH grubunda AH+GB grubuna göre daha düşük sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonu saptandı (p<0,05).

Ginkgo Biloba'nın in Vitro AH Modelinde İndüklenen Okadaik Asitte Apoptotik Aktivite ve Hücre İçi Ros Değerleri Üzerindeki Etkileri

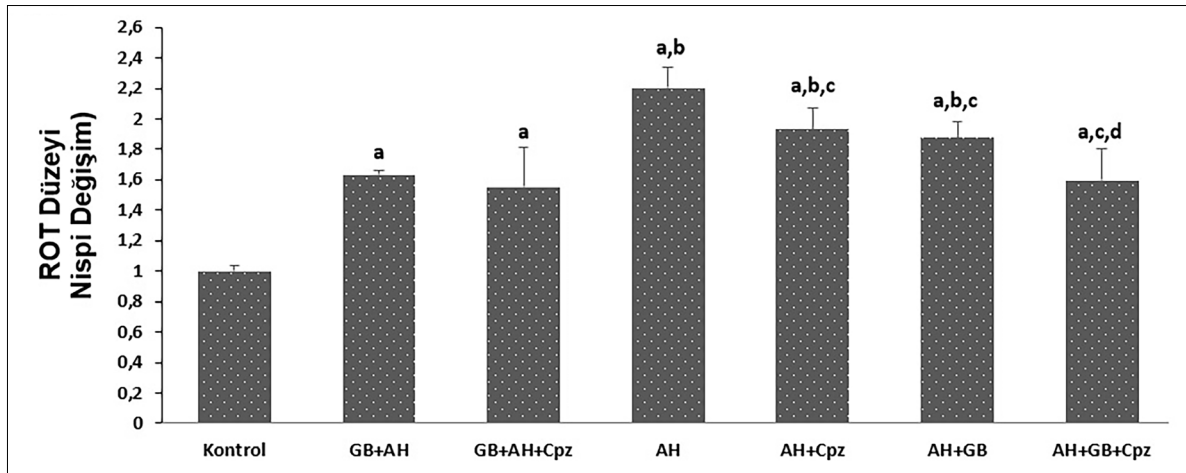
Ginkgo biloba uygulamalarının nöroblastoma hücrelerinde apoptoz ve



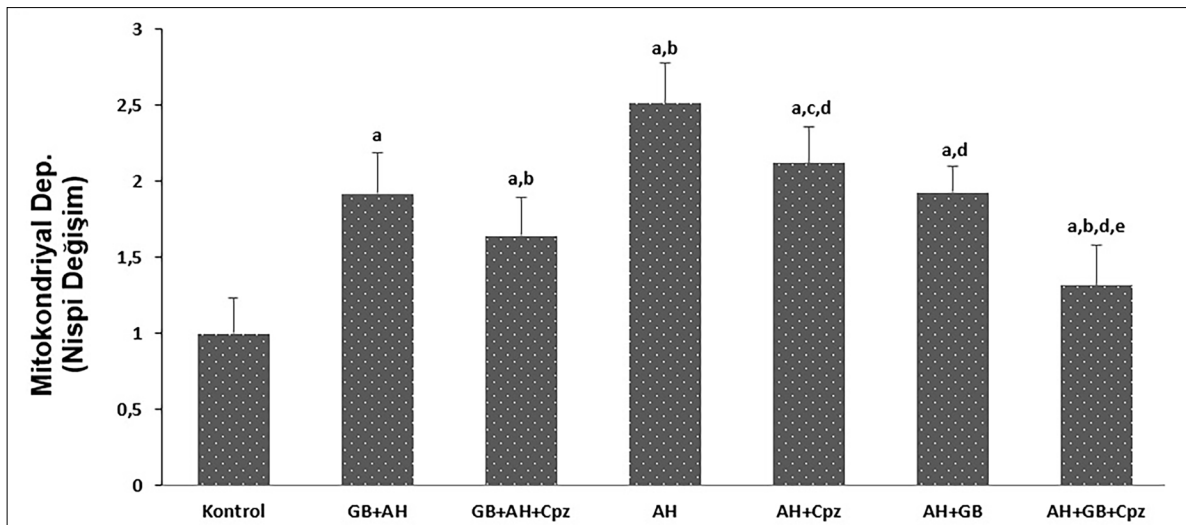
Şekil 1. a, b. Okadaik asidin (AH, 30 nM, 24 saat) ve Ginkgobiloba ekstraktının (25 µg/ml, 24 saat) in vitro AH modelinde TRPV1 kanalları aracılığıyla hücre içi serbest kalsiyum üzerindeki etkisi (n=3 ve ortalama ± SD) (a). Hücrelerin sitümülasyonu için kapsaisin (Cap ve 0,1 mM 20. sıklusta) kullanıldı ve kapsazepin (Cpz ve 0,1 mM 30 dk) kullanılarak inhibisyon sağlandı (b). GB:Ginkgo Biloba, AH:Alzheimer Hastalığı, Cpz: Kapsazepin



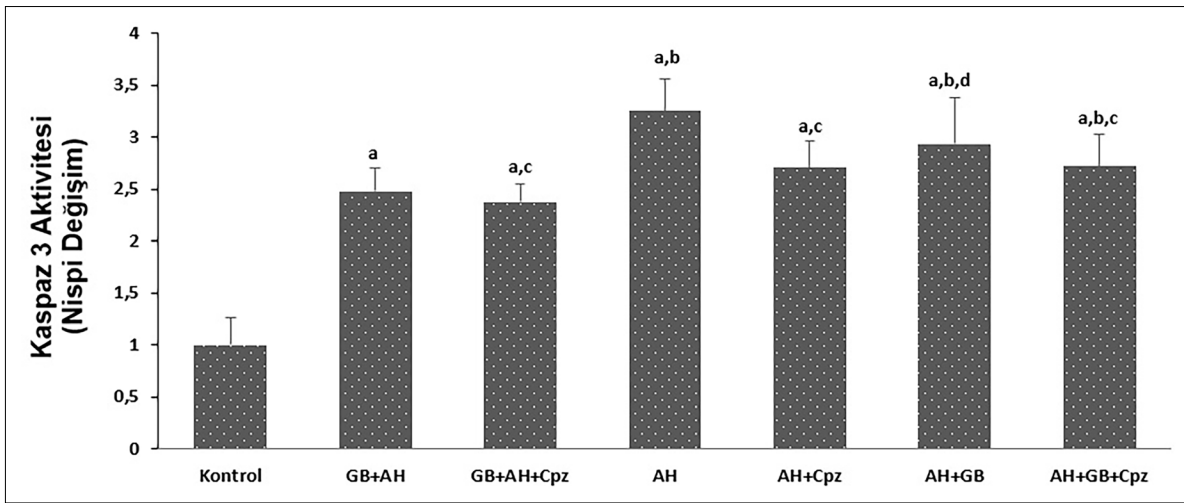
Şekil 2. Okadaik asit (AH, 30 nM, 24 saat) ve Gingko biloba ekstraktının (25 µg/ml, 24 saat) in vitro AH modelinde programlanmış hücre ölümü seviyeleri üzerindeki etkisi. Hücreler kapsazepin (Cpz, 30 dakika 0,1 mM) kullanılarak inhibe edildi ve kapsaisin (Cap ve 0,1 mM, 10 dakika) kullanılarak stimülasyon sağlandı (ortalama ± SD ve n=10). GB:Gingko Biloba, AH:Alzheimer Hastalığı, Cpz: Kapsazepin



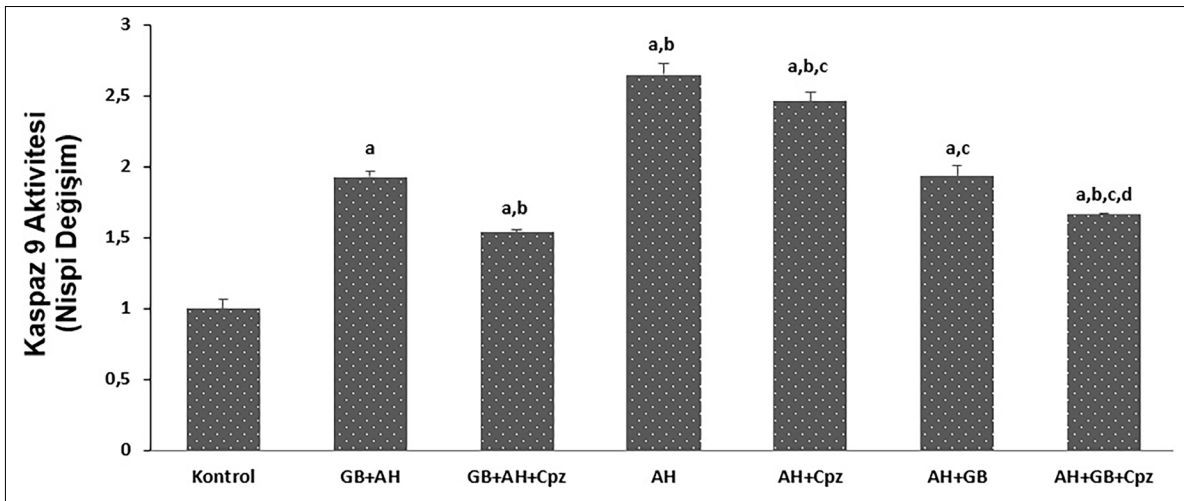
Şekil 3. Okadaik asidin (AH, 30 nM, 24 saat) ve Gingko bilobaekstraktının (25 µg/ml, 24 saat) in vitro AH modelinde reaktif oksijen türlerinin seviyeleri üzerindeki etkisi. Hücreler kapsazepin (Cpz, 30 dakika 0,1 mM) kullanılarak inhibe edildi ve kapsaisin (Cap ve 0,1 mM, 10 dakika) kullanılarak stimülasyon sağlandı (ortalama ± SD ve n=10). GB:Gingko Biloba, AH:Alzheimer Hastalığı, Cpz: Kapsazepin



Şekil 4. Okadaik asidin (AH, 30 nM, 24 saat) ve Gingkobiloba ekstraktının (25 µg/ml, 24 saat) in vitro AH modelinde mitokondriyal depolarizasyon seviyeleri üzerindeki etkisi. Hücreler kapsazepin (Cpz, 30 dakika 0,1 mM) kullanılarak inhibe edildi ve kapsaisin (Cap ve 0,1 mM, 10 dakika) kullanılarak stimülasyon sağlandı (ortalama ± SD ve n=10). GB:Gingko Biloba, AH:Alzheimer Hastalığı, Cpz: Kapsazepin



Şekil 5. Okadaik asidin (AH, 30 nM, 24 saat) ve Ginkgo biloba ekstraktının (25 µg/ml, 24 saat) in vitro AH modelinde Kaspaz-3 seviyeleri üzerindeki etkisi. Hücreler kapsazepin (Cpz, 30 dakika 0,1 mM) kullanılarak inhibe edildi ve kapsaisin (Cap ve 0,1 mM, 10 dakika) kullanılarak stimülasyon sağlandı (ortalama ± SD ve n=10). GB:Ginkgo Biloba, AH:Alzheimer Hastalığı, Cpz: Kapsazepin



Şekil 6. Okadaik asidin (AH, 30 nM, 24 saat) ve Ginkgo biloba ekstraktının (25 µg/ml, 24 saat) in vitro AH modelinde Kaspaz-9 seviyeleri üzerindeki etkisi. Hücreler kapsazepin (Cpz, 30 dakika 0,1 mM) kullanılarak inhibe edildi ve kapsaisin (Cap ve 0,1 mM, 10 dakika) kullanılarak stimülasyon sağlandı (ortalama ± SD ve n=10). GB:Ginkgo Biloba, AH:Alzheimer Hastalığı, Cpz: Kapsazepin

hücre içi ROS seviyeleri üzerindeki etkisi Şekil 2 ve 3'te gösterilmiştir. Apoptoz ve hücre içi ROS, GB+AH, AH ve AH+GB gruplarında kontroldeki bazal seviyelere göre daha yüksekti ($p < 0,001$). Hücre içi ROS değerleri ve apoptotik aktivite AH grubunda GB+AH ve AH+GB grubuna göre ($p < 0,001$), apoptoz düzeyi AH+GB grubunda GB+AH grubuna göre daha yüksekti ($p < 0,001$). Ayrıca bulgular sırasıyla GB+AH grubu, AH grubu ve AH+GB gruplarında GB+AH+kapsazepin grubu, AH+kapsazepin grubu ve AH+GB+kapsazepin grubu ile karşılaştırıldığında daha düşüktü ($p < 0,001$).

Okadaik Asit ile İndüklenen in Vitro AH Modelinde GB'nin Mitokondriyal Depolarizasyon, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Üzerindeki Etkileri

Ginkgo biloba uygulamalarının nöroblastoma hücrelerinde mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve 9 seviyeleri üzerindeki etkisi Şekil 4, 5 ve 6'da gösterilmiştir. Mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyeleri GB+AH, AH ve AH+GB'de daha yüksekti. grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$). Mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri AH grubunda GB+AH ve AH+GB gruplarına göre daha yüksekti ($p < 0,001$). Kaspaz 3 düzeyi GB+AH grubunda AH+GB grubuna göre daha düşüktü ($p < 0,001$), ancak aynı gruplarda mitokondriyal depolarizasyon ve kaspaz 9 sonuçlarında istatistiksel olarak fark yoktu. Ayrıca değerler GB+AH grubunda, AH grubunda ve AH+GB gruplarında

sırasıyla GB+AH+kapsazepin, AH+kapsazepin ve AH+GB+kapsazepin gruplarına göre daha düşüktü ($p < 0,001$; $p < 0,05$).

TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı, nörodejenerasyon ile seyreden ve bilişsel becerilerini tamamen kaybettiği bir demanstürüdür. Nörodejeneratif süreç, temel olarak nöronların Ca^{2+} konsantrasyonlarını yeterli şekilde düzenleyememesidir. AH'de, insan, hayvan ve hücre kültürü çalışmalarında AH'nin patolojik özellikleri (amiloid plaklar ve nörofibriller yumaklar) ile bozulan hücresel Ca^{2+} homeostazı arasındaki korelasyonlar belirlendi. Özellikle yüksek amiloid β -peptit (Ab) seviyeleri, hücresel Ca^{2+} homeostazını inhibe eden ve nöronların apoptoz ve eksitotoksisteye karşı savunmasızlığını artıran ROS ve sitokinler gibi nörotoksik ajanları indüktör (15).

Geçici reseptör potansiyel ailesi vanilloid tip 1 kanalı, birçok araştırma disiplininde araştırılan en popüler memeli TRP kanalıdır. Afferent duyu nöronlarında ifade edilen bir nosiseptif iyon kanalı rolüne ek olarak (16), birkaç çalışma TRPV1'in sinaptik plastisite ve bilişsel işlevlerin modülasyonunda yer alan beyinde de ifade edildiğini (17,18) ortaya çıkarmıştır (19). Nörodejeneratif hastalıklar, TRPM2 ve TRPV1 kanal aktivitesinin aracılık ettiği mitokondriyal membranın kararsızlığı yoluyla

Ca²⁺ girişinin birikmesiyle artan oksidatif stres ile karakterize edilir (20). Sonuçlarımız, GB'nin Alzheimer'ın modellenmiş nöroblastoma hücrelerinde TRPV1 yoluyla oksidatif hasarla ilişkili eksitotoksitesiyi önlediğini doğrulamaktadır.

Ca²⁺ birikimi hücre sağkalımında çok önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, birkaç çalışma, bu iyonun mitokondri yoluyla suprafizyolojik seviyelerinde apoptozu da indükleyebileceğini öne sürdü. Burada, artan Ca²⁺ mitokondri konsantrasyonu, birkaç apoptotik proteinin ve sitokrom c, kaspaz 3 ve kaspaz 9 ve ROS (21,22,23) gibi oksidatif radikallerin salınımını indükleyerek apoptotik kaskadı aktive edebilir. Çalışmamız, GB uygulamasının in vitro AH modelinde mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve kaspaz dokuz aktivasyonunu önemli ölçüde iyileştirdiğini ortaya koydu (Şekil 1-6).

Çalıştığımız yedi grupta, GB'nin sitozolik kalsiyum seviyeleri, apoptoz ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin seviyeleri üzerindeki etkileri, bir invitro okadaik asit kaynaklı AH modelinde tarif edildi. Ca²⁺ konsantrasyonu Grup 1, 2, 4 ve 6'da kontrole göre daha yüksekti (p<0,001). Ca²⁺ düzeyi Grup 2 ve Grup 6'da Grup 4'e göre daha düşüktü (p<0,001). Ayrıca, sitosolik Ca²⁺ konsantrasyonu Grup 2'de Grup 1 ve Grup 6 grubuna göre daha düşüktü (p<0,05) (Şekil 1. a, b). Apoptoz ve hücre içi ROS değerleri Grup 2, 4 ve 6'da kontrol grubuna göre daha yüksekti (p<0,05) <0,001). Apoptoz ve hücre içi ROS değerleri Grup 4'te Grup 2 ve 6'ya göre (p<0,001), apoptoz düzeyi Grup 6, Grup 2'de (p<0,001) (Şekil 2 ve 3) ve mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve 9 düzeyi Grup 2, Grup 4 ve Grup 6'da kontrol grubuna göre daha yüksekti (p<0,001). Ayrıca bu değerler sırasıyla GB+AH grubu, AH grubu ve AH+GB gruplarında GB+AH+kapsazepin, AH+kapsazepin ve AH+GB+kapsazepin gruplarına göre daha düşüktü (p<0,001; p<0,05) (Şekil 4-6). Bu bize GB'nin TRPV1 kanalları aracılığıyla hareket ettiğini gösterir. Ca²⁺ birikimi, mitokondriyal membranların şişmesi ve yırtılması yoluyla mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olur (8). Çalışmamızda GB'nin mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve kaspaz 9 üzerindeki etkilerinin GB uygulamasından sonra azaldığını saptadık (Şekil 4-6).

Ovey ve arkadaşlarına göre, Hcy'nin farelerin hipokampusünde oksidatif strese ve apoptozu neden olduğunu ve MEM tedavisinin dolaylı olarak hipokampal nöronlardaki TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanallarını aktive ettiğini ve Hcy ve Memantine'in regülasyonda fizyolojik olarak ilgili roller oynadığını gösterdiler. Alzheimer hastalığının tedavisinde rutin olarak kullanılan memantine, sitozolik kalsiyum ve reaktif oksijen türlerinin miktarını ve NMDA kanal inhibisyonunu azalttığı için dolaylı olarak TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal inhibisyonuna neden olduğunu bulmuşlardır (8). Çalışmamızda da benzer bulgular elde edilmiş ve GB'nin in vitro AH modelinde oksidatif stresin hafifletilmesi ve hücre canlılığı gibi hücre fonksiyonları üzerinde olumlu etkiler bulunmuştur. Ayrıca GB+AH'de sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonunun AH+GB grubuna göre daha düşük olması (Şekil 1. a, b) GB'nin koruyucu etkisinin terapötik etkisinden daha fazla olduğunu bize gösterdi.

Deneysel bellek bozukluğu modelinde, Balaban ve arkadaşları TRPM2 ve TRPV1 kanallarının, hipokampal ve DRG (dorsal kök ganglion) nöronlarına Ca²⁺ girişi nedeniyle nöronal ölüme anahtar rol oynadığını göstermiştir; bu arada, selenyum tedavisi ile apoptozu ve Ca²⁺ girişine karşı önemli bir nöroprotektif etki ile ilişkili azalmış kanal aktivitesi tanımlanmıştır. Selenyum tedavisi ayrıca hafıza bozukluğu göstergelerini artırdı, nöronlarda glutatyon seviyesini ve glutatyon peroksidaz aktivitesini azalttı. Kopolamin ile indüklenen nöron ölümü ve selenyumun endojen oksidatif stres yolları yolu ile hafıza bozulmasını azalttığını bildirmişlerdir (20,21,24). Bu raporlar, çalışmamızda GB tedavisinin TRPV1 yoluyla apoptozu azaltması ile uyumlu bulunmuştur.

SONUÇ

Çalışma sonuçlarımız in vitro AH modelinde GB'nin TRPV1 kanal inhibisyonunu yoluyla hücre içi sitozolik kalsiyum ve reaktif oksijen türlerinin miktarını azalttığını ve apoptozu azalttığını göstermektedir. Ginkgo biloba uygulamasından sonra AH'li hücrelerde apoptoz ve hücre içi ROS ve sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonu, apoptoz ve hücre içi ROS değerlerinin daha fazla azaldığı görüldü. Bu sonuçlar bize GB'nin TRPV1 kanalı aracılığıyla Alzheimer hastalığında terapötik etkisinin yanı sıra koruyucu bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

Bildiğimiz kadarıyla in vitro AH modelinde Ginkgo biloba'nın rolüne ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, TRPV1 kanallarının rolü, Ginkgo biloba tarafından potansiyel modülasyon açısından bir in vitro AH modelinde araştırılmalıdır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağlıdır.

Yazar Katkıları: Fikir- AÖ, İSÖ, EK, BY; Tasarım- AÖ, İSÖ, EK, BY; Denetleme- AÖ, İSÖ, EK, BY; Kaynaklar- AÖ, İSÖ, EK, BY; Malzemeler- AÖ, İSÖ, EK, BY; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- AÖ, İSÖ, EK, BY; Analiz ve/veya Yorum- AÖ, İSÖ, EK, BY; Literatür Taraması- AÖ, İSÖ, EK, BY; Yazıyı Yazan- AÖ, İSÖ, EK, BY; Eleştirel İnceleme- AÖ, İSÖ, EK, BY.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Taslağın tasarımı, toplanması, analizi, yorumlanması veya yazılmasında hiçbir finansman kuruluşu yer almamıştır.

KAYNAKLAR

- Liu H, Ye M, Guo H. An updated review of randomized clinical trials testing the improvement of cognitive function of Ginkgo biloba extract in healthy people and Alzheimer's patients. *Front Pharmacol.* 2020;10:1688. [Crossref]
- Singh SK, Srivastav S, Castellani RJ, Plascencia-Villa G, Perry G. Neuroprotective and antioxidant effect of Ginkgo biloba extract against AD and other neurological disorders. *Neurotherapeutics.* 2019;16:666-674. [Crossref]
- Hori T, Ridge RW, Tulecke W, Del Tredici P, Trémouillaux-Guiller J, Tobe H, editors. *Ginkgo Biloba a Global Treasure: From Biology to Medicine.* Tokyo: Springer-Verlag; 1997.
- Oken BS, Storzbach DM, Kaye JA. The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in AD. *Arch Neurol.* 1998;55:1409-1415. [Crossref]
- Vellas B, Coley N, Ousset P-J, Berrut G, Dartigues J-F, Dubois B, et al. Long-term use of standardized Ginkgo biloba extract for the prevention of Alzheimer's disease (GuidAge): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2012;11:851-859. [Crossref]
- Eckert A, Keil U, Kressmann S, Schindowski K, Leutner S, Leutz S, et al. Effects of EGb 761 Ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry.* 2003;36 Suppl 1:S15-23. [Crossref]
- Duitama M, Vargas-López V, Casas Z, Albarracín SL, Sutachan J-J, Torres YP. TRP channels role in pain associated with neurodegenerative diseases. *Front Neurosci.* 2020;14:782. [Crossref]
- Koşar PA, Nazıroğlu M, Övey İS, Çiğ B. Synergic effects of doxorubicin and melatonin on apoptosis and mitochondrial oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells: involvement of TRPV1 channels. *J Membr Biol.* 2016;249:129-140. [Crossref]
- Um M, Gross AW, Lodish HF. A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal.* 2007;19:634-645. [Crossref]
- Romero A, Egea J, González-Muñoz GC, de Saavedra MD, del Barrio L, Rodríguez-Franco MI, et al. ITH12410/SC058: a new neuroprotective compound with potential in the treatment of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5:770-775. [Crossref]
- Di Meo F, Cuciniello R, Margurucci S, Bergamo P, Petillo O, Peluso, et al. Ginkgo biloba prevents oxidative stress-induced apoptosis blocking p53 activation in neuroblastoma cells. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2020;9:279. [Crossref]
- Martinez NA, Ayala AM, Martinez M, Martinez-Rivera FJ, Miranda JD, Silva WJ. Caveolin-1 regulates the P2Y2 receptor signaling in human 1321N1 astrocytoma cells. *J Biol Chem.* 2016;291:12208-12222. [Crossref]
- Övey İS, Nazıroğlu M. Effects of homocysteine and memantine on oxidative stress related TRP cation channels in in vitro model of Alzheimer's disease. *J Recept Signal Transduct Res* 2021;41:273-283. [Crossref]

14. Öz A, Çelik Ö. Curcumin inhibits oxidative stress-induced TRPM2 channel activation, calcium ion entry and apoptosis values in SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of transfection procedure. *Mol Membr Biol.* 2016;33:76–88. [\[Crossref\]](#)
15. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:958–967. [\[Crossref\]](#)
16. Sawamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S. TRP channels in the brain: what are they there for? In: Emir TL, editor. *Neurobiology of TRP channels.* Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis; 2017. p.295–322. [\[Crossref\]](#)
17. Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2000;97:3655–3660. [\[Crossref\]](#)
18. Tóth A, Boczán J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;135:162–168. [\[Crossref\]](#)
19. Fu M, Xie Z, Zuo H. TRPV1: A potential target for antiepileptogenesis. *Med Hypotheses* 2009;73:100–102. [\[Crossref\]](#)
20. Balaban H, Nazıroğlu M, Demirci K, Övey İS. The protective role of selenium on scopolamine-induced memory impairment, oxidative stress, and apoptosis in aged rats: the involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Mol Neurobiol* 2017;54:2852–2868. [\[Crossref\]](#)
21. Nazıroğlu M, Özgül C, Küçükayaz M, Çiğ B, Hebeisen S, Bal R. Selenium modulates oxidative stress-induced TRPM2 cation channel currents in transfected Chinese hamster ovary cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2013;112:96–102. [\[Crossref\]](#)
22. Hajnóczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Roy SS, et al. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium.* 2006;40:553–560. [\[Crossref\]](#)
23. Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem.* 2007;45:481–506. [\[Crossref\]](#)
24. Köse SA, Nazıroğlu M. Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2014;158:136–142. [\[Crossref\]](#)