

# SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Oluşturulan Glutamat Eksitotoksitesisi Modelinde Vilazodonun Etkisinin Araştırılması

## Investigation of the Effect of Vilazodone in Glutamate Excitotoxicity model on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells

 Talha ÖZSARI<sup>1</sup>,

 Bilal ŞAHİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dönem 3, Sivas,  
Türkiye

<sup>2</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi  
Tıp Fakültesi, Fizyoloji  
Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

### Corresponding author:

Talha ÖZSARI, Sivas Cumhuriyet  
Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dönem 3,  
Sivas, Türkiye

### E-mail:

[talhaozsari@gmail.com](mailto:talhaozsari@gmail.com)

Received/Accepted: May 2022

Conflict of interest: There is not  
a conflict of interest.

### How to Cite

Ozsari, T., Şahin, B. (2022). SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Oluşturulan Glutamat Eksitotoksitesisi Modelinde Vilazodonun Etkisinin Araştırılması. *Health Sciences Student Journal*, 2(2), 35-39. <https://www.healthssj.com/sh-sy5y-noroblastoma-hucrelerinde-olusturulan-glutamat-eksitotoksitesisi-modelinde-vilazodonun-etkisinin-arastirilmesi/>

### ÖZET

**Amaç:** Antidepresan ilaçlar son zamanlarda toksisite üzerine olan etkisi ile ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada amacımız bir antidepresan olan vilazodonun glutamat toksisitesindeki etkisini SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerinde araştırmaktır.

**Yöntem:** SH-SY5Y hücre kültüründe kontrol grubu, ilaç grubu, glutamat grubu ve ilaç+glutamat grubu olmak üzere 4 grup planlanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken ilaç grubuna çeşitli konsantrasyonlarda (1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 ng/ml) vilazodon 24 saat boyunca uygulanmıştır. XTT hücre canlılığı testi ile vilazodonun hücre proliferasyonu üzerine etkisi belirlenmiştir. Vilazodonun oksidatif stres üzerine etkilerini değerlendirmek için de nNOS, NO, TAS ve TOS ölçümü yapılmıştır.

**Bulgular:** Elde edilen veriler, vilazodonun uygulanan dozlarda, SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığı, nNOS, NO, TAS ve TOS parametrelerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

**Sonuçlar:** Bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, vilazodonun SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkisi gözlenmemiştir. Bu etkisizlik durumu uygulanan vilazodon dozu ile ilişkilendirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Toksikite, Vilazodon, Hücre canlılığı, Oksidatif stres, SH-SY5Y nöroblastom.

### ABSTRACT

**Objective:** Antidepressant drugs have recently come to the fore with their effects on toxicity. Our aim in this study is to investigate the effect of vilazodone, an antidepressant, on glutamate toxicity on SH-SY5Y neuroblastoma cells.

**Method:** In SH-SY5Y cell culture, 2 groups were planned as the control group and the drug group. While no application was made to the control group, various concentrations of vilazodon (1; 0.5; 0.25; 0.1; 0.05 ng/ml) were administered to the drug group for 24 hours. The effect of vilazodone on cell proliferation was determined by the XTT cell viability test. Furthermore; nNOS, NO, TAS and TOS measurements were made to evaluate their effects on oxidative stress.

**Results:** The data obtained showed no statistically significant effect of vilazodone at the doses we studied on the parameters of cell viability, nNOS, NO, TAS and TOS in SH-SY5Y neuroblastoma and cells ( $p>0.05$ ).

**Conclusions:** When the results of this study were evaluated, no effect of vilazodone on cell viability was observed in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line. This ineffectiveness may be related to the dose of vilazodone administered.

**Keywords:** Glutamate, Toxicity, Vilazodone, cell viability, Oxidative stress, SH-SY5Y neuroblastoma.

## GİRİŞ

### Glutamat ve Fizyolojik Etkileri

Glutamat, merkezi sinir sisteminde en fazla bulunan uyarıcı nörotransmitterdir. Glutamat iyonotropik ve/veya metabotropik glutamat reseptörlerini uyarmasına ve normal nöral fizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip olmakla birlikte aşırı miktarı eksitotoksisteye neden olarak birçok nörolojik hastalıkta nöronal hasarı artırabilmektedir.<sup>1,2</sup> Glutamat toksisitesi nöronal, oligodendroglial, astroglial ve retinal gangliyon hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre hatlarında gösterilmiştir.<sup>3</sup> Çeşitli çalışmalar, glutamat sitotoksitesinin hücre içi kalsiyum seviyelerinin yükselmesine ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini takiben mitokondriyal disfonksiyon ve endoplazmik retikulum (ER) stresine neden olduğunu ileri sürmüştür.<sup>4</sup>

Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR'ler) olarak iki ana aileye ayrılmaktadır. İyonotropik aile NMDA, AMPA ve kâinat reseptörlerini içerir. Metabotropik aile hem presinaptik glutamat salımını hem de postsinaptik NMDA akımlarını güçlendiren Grup I reseptörlerinden (mGluR1 ve mGluR5), grup II (mGluR2 ve mGluR3), Grup III reseptörlerinden (mGluR4, mGluR6, mGluR7) ve mGluR8'den oluşmaktadır. Glutamat reseptörleri beyinde geniş çapta eksprese edilmekte ve öğrenme ve hafıza gibi bilişsel işlevlerde sinaptik plastisitedeki aktivitesi nedeniyle önemli rol oynamaktadır. Uzun süreli güçlenme olarak bilinen plastisite şekli, hipokampus, neokorteks ve beynin diğer kısımlarındaki glutamaterjik sinapslar aracılığıyla gerçekleşmektedir.<sup>5</sup>

Sinaptik aktivite, sinaptik aralıkta glutamat konsantrasyonunda artışa yol açmakta fakat glutamat taşıyıcıları tarafından glutamatın geri alınımı ile ekstrasellüler glutamat konsantrasyonu korunmaktadır.<sup>6</sup>

### Glutamat Eksitotoksitesi ve İlişkili Hastalıklar

Glutamat taşıyıcıları nöronal ve glial membranlarda bulunmaktadır. Bu taşıyıcılar hücreler arası boşluktan glutamatın hızla uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Beyin hasarı gibi patolojik durumlarda, taşıyıcı sistemde meydana gelen aksaklık nedeniyle aşırı glutamat hücre dışı alanda birikebilmektedir. Bu durum  $Ca^{2+}$  iyonlarının NMDA reseptörleri aracılığıyla hücrelere girmesine neden olmaktadır. Fazla miktarda hücre içine giren  $Ca^{2+}$  nöronal hasarı tetiklemekte ve hücre ölümüne yol açmaktadır.<sup>7</sup> Bu süreç glutamata bağlı eksitotoksiste olarak adlandırılmaktadır. Eksitotoksistede hücre ölüm mekanizmaları aşağıda belirtilen basamakları içermektedir. Bunlar:

- $Ca^{2+}$  iyonu fizyolojik sınırlar içerisindeki konsantrasyonu mitokondriyal fonksiyonları düzenlemektedir. Aşırı glutamat sonrası kontrolsüz bir şekilde hücre içi  $Ca^{2+}$  artışı mitokondriye zarar vererek mitokondriyal disfonksiyona neden olmaktadır.
- $Ca^{2+}$  iyon konsantrasyonunun ani artışı, hücre içi nitrik oksit (NO) konsantrasyonunu artırır. Aşırı NO molekülleri serbest radikaller oluşmasına neden olarak hücre içi oksidatif stresi arttırmaktadır.
- Glutamat veya  $Ca^{2+}$  pro-apoptotik genler için transkripsiyon faktörlerinin desteklenmesine veya anti-apoptotik genler için transkripsiyon faktörlerinin aşağı regülasyonuna aracılık etmektedir. Dolayısıyla, artan Glu/ $Ca^{2+}$

konsantrasyonunun net etkisi hücre apoptozudur.<sup>8</sup>

Alzheimer, Parkinson, Huntington, epilepsi ve multiple skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde glutamat eksitotoksitesisi önemli bir rol oynamaktadır.<sup>9,10,11</sup>

## YÖNTEM

### *In vitro* Çalışmalar

#### Hücre kültürü

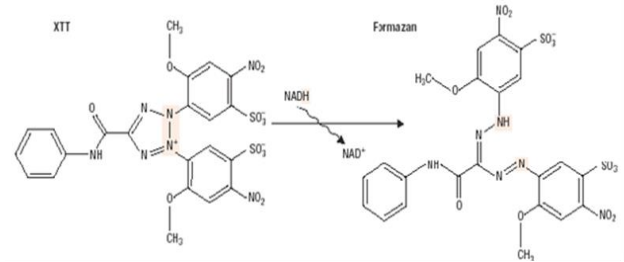
ATCC' den temin edilmiş olan SH-SY5Y hücreleri steril koşullar altında 37 °C ve %5 CO<sup>2</sup>'li ortamda, 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sıgır serumu içeren DMEM: F12 (1:1) hücre kültür besisi yerinde çoğaltılmıştır. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasaj yapılmış ve üçüncü pasajın ardından çalışmalara başlanmıştır. Çalışmada SH-SY5Y nöroblastom hücre hattının seçilmesinin nedeni NMDA aracılı glutamat toksitite modeli için yapılan çalışmalarla uygunluğunun belirlenmiş olmasıdır. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat toksitesisi için önceki çalışmalarda belirlenen 15 mM doz ve 24 saat inkübasyon süresi kullanılmıştır.<sup>12</sup> Vilazodon için kullanılan dozlar: 1; 0,5; 0,25; 0,1 ve 0,05 ng/ml olarak belirlenmiştir.<sup>13</sup>

#### Hücre canlılık değerlendirilmesi

Vilazodonun glutamat toksitesisi sonrası hücre canlılığı üzerine etkisi XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) testi ile araştırılmıştır. Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır (Şekil 1).

Oluşan boya suda çözünür özellikte olmakla birlikte boya yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla verilen dalga

boylarında okutulabilmektedir. Boya yoğunluğu (turuncu renk), metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır.



Şekil 1. XTT'nin formazana dönüşümü.

Sitotoksitite için öncelikle her kuyuda 10x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde hücre alınıp steril 96 kuyucuklu mikro plakaya ekilmiş ve hücrelerin yapışması için bir gece beklenmiştir. Ertesi gün hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış, kuyucuklar PBS ile yıkanmış, Vilazodon değişik konsantrasyonlarda hücreler üzerine uygulandıktan 1 saat sonra glutamat (15mM) uygulanmış ve 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 24. Saatin sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler üç defa PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl şeffaf (renksiz) DMEM ve bununda üzerine 50 µl XTT solüsyonu eklenerek CO<sup>2</sup>'li etüvde 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda optik dansite değeri mikropilaya okuyucuda 450 nm'de okunarak, kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilip % Hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplanmıştır.

#### nNOS ve NO Seviyelerinin Ölçümü

Hücrelere işlem sonrası Vilazodonun oksidatif stres üzerine etkilerini değerlendirmek için nNOS ve NO ölçümü ticari kitler ile yapılmıştır. Uygulanacak prosedür üretici firmanın talimatlarına göre belirlenmiştir.

#### İstatistiksel analiz

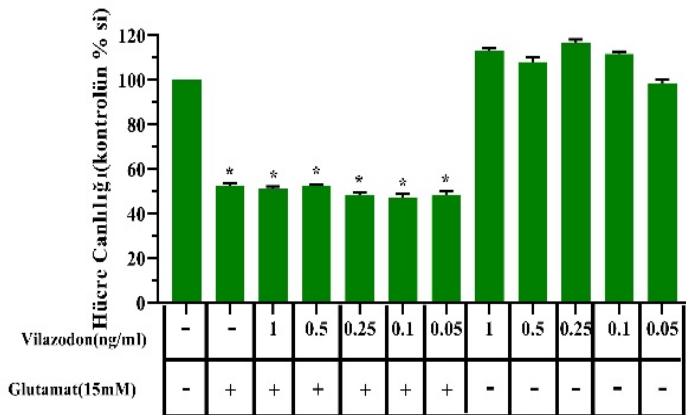
Sonuçlar, ortalamanın (SEM) ortalama ± standart hatası olarak ifade edildi. Veri analizleri Windows için SPSS Sürüm 23.0

ile yapılmıştır. Veriler, tek yönlü bir varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için post hoc Tukey testi kullanıldı ve  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

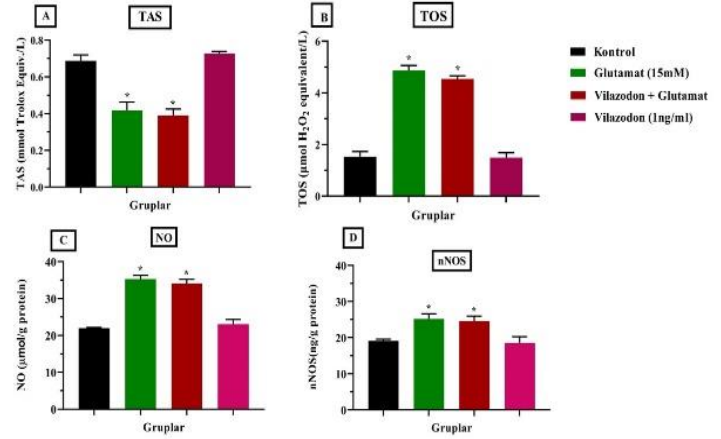
## BULGULAR

Çalışmamızda iki temel amaç mevcuttu. Sonuçlarımızı amaçlarımız doğrultusunda ifade edebiliriz:

- İlk amacımız vilazodonun SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında glutamatla oluşturulan toksite üzerine etkisini ortaya koymak ve bunu XTT yöntemiyle göstermekti. Şekil 2’de görülmüş olduğu üzere bütün dozlarda her iki ilacın hücre canlılığını koruyucu antitoksik etkisi bulunmamıştır. 1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 0.25 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.05 ng/ml gibi farklı dozlarda denenmesine rağmen koruyuculukta olumlu herhangi bir etki gözlenmemiştir.
- Vilazodon’un SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde glutamat toksitesinde oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerini TAS, TOS, NO ve nNOS ölçümü ile gösterip aralarındaki ilişkiyi aydınlatmak. (Şekil 3)



**Şekil 2.** Vilazodonun SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde glutamat kaynaklı sitotoksosite sonrası hücre canlılığı üzerine etkisi. \* $p < 0.001$  kontrol grubuna göre kıyaslandığında.



**Şekil 3.** Vilazodonun, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde glutamat kaynaklı sitotoksosite sonrası NO, nNOS, TAS ve TOS seviyeleri üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SH olarak ifade edilmiştir.  $P < 0.001$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; \* $P < 0.001$ , kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

## TARTIŞMA

Daha önce yapılan çalışmalarda depresyon ve bilişsel işlev bozukluğunu tedavi etmek için glutamat nörotransmisyonun serotinerjik modülasyonu üzerindeki etkisi tanımlanmıştır.<sup>14</sup>

Bununla birlikte bir serotonin bileşiği olan vilazodonun tek başına, glutamat antagonisti olan amantadin ile kombine edilmemiş haliyle, hemiparkinson sıçanlarda I-DOPA kaynaklı diskneziyi azalttığı tespit edilmiştir.<sup>15</sup>

Majör depresif bozukluk için halihazırda onaylanmış antidepresan ilaçların etki mekanizmasına bakıldığında, esas olarak monoaminerjik mekanizmalar, örneğin serotonin, norepinefrin veya dopamin için değişen afinitelere sahip reseptör/geri alım agonistleri veya antagonistleri yoluyla işlev gördüğü söylenebilir.<sup>16</sup>

Ancak vilazodonun bizzat glutamat toksitesindeki etkisini SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı göz önüne alınarak araştırılan bir çalışma bulunmamakta idi.

Söz konusu etki üzerine vilazodonun etkisi TAS, TOS, NO ve nNOS ölçümü ile test edilmiş olup anlamlı bir veri elde edilememiştir.

## FİNANSMAN

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A (1919B012001741) projesi kapsamında destek almıştır. Proje çalışmaları Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi (CÜTFAM) katkıları ile CÜTFAM laboratuvarında yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- 1- Lai, T. W., Zhang, S., Wang, Y. T. 2014, Nisan 1. "Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection". Progress in Neurobiology. Elsevier Ltd.
- 2- Lau, A., Tymianski, M. 2010. "Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration". Pflugers Archiv European Journal of Physiology
- 3- Kritis, A. A., Stamoula, E. G., Paniskaki, K. A., Vavilis, T. D. 2015. "Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study". Frontiers in Cellular Neuroscience, 9, 91.
- 4- Chen, T., Fei, F., Jiang, X. F., Zhang, L., Qu, Y., Huo, K., Fei, Z. 2012. "Down-regulation of Homer1b/c attenuates glutamate-mediated excitotoxicity through endoplasmic reticulum and mitochondria pathways in rat cortical neurons". Free Radical Biology and Medicine, 52(1), 208–217.
- 5- Greenwood, S. M., Connolly, C. N. 2007, Aralık 1. "Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity". Neuropharmacology. Pergamon
- 6- Reiner, A., Levitz, J. 2018, Haziran 27. "Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert". Neuron. Cell Press.
- 7- Maragakis, N. J., Rothstein, J. D. 2001, Mart 1. "Glutamate transporters in neurologic disease". Archives of Neurology. American Medical Association.
- 8- Rameaut, G. A., Chiu, L. Y., Ziff, E. B. 2004. "Bidirectional Regulation of Neuronal Nitric-oxide Synthase Phosphorylation at Serine 847 by the N-Methyl-D-aspartate Receptor". Journal of Biological Chemistry.
- 9- Hynd, M. R., Scott, H. L., Dodd, P. R. 2004. "Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease". Neurochemistry International.
- 10- Pitt, D., Werner, P., Raine, C. S. 2000. "Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis". Nature Medicine.
- 11- Vincent, P., Mulle, C. 2009. "Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity". Neuroscience.
- 12- Park, E., Gim, J., Kim, D. K., Kim, C. S., Chun, H. S. 2019. "Protective effects of alpha-lipoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in c6 glioma cells". Biological and Pharmaceutical Bulletin.

- 13- Dawson, L. A., Watson, J. M. 2009. "Vilazodone: A 5-HT1A receptor agonist/serotonin transporter inhibitor for the treatment of affective disorders". CNS Neuroscience and Therapeutics, 15(2), 107–117.
- 14- Pehrson, A., & Sanchez, C. (2014). Serotonergic modulation of glutamate neurotransmission as a strategy for treating depression and cognitive dysfunction. CNS Spectrums, 19(2), 121-133. doi:10.1017/S1092852913000540
- 15- Sophie R. Cohen, Michelle L. Terry, 2022 "The multimodal serotonin compound Vilazodone alone induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats."
- 16- A.Jaso, Brittany, J. Niçin, Mark, 2017, "therapeutic modulation of glutamate reseptör in Major depressive dicorder