

# Galium Aparine Ekstresinin C6-Glioma Hücre Hattında Oluşturulan Glutamat Eksitotoksitesisi Üzerine Etkisinin Araştırılması

## Investigation of the Effect of Galium Aparine Extract on Glutamate Excitotoxicity Induced in C6-Glioma Cell Line

 Roumina YOUSEFZADEH<sup>1</sup>,  
 Mohaddeseh HASSANPOUR<sup>1</sup>,  
 Ayşegül ÖZTÜRK<sup>2</sup>,  
 Sebahattin KARABULUT<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp

Fakültesi Dönem 3, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup> Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek

Okulu, Terapi ve Rehabilitasyon

Bölümü, Sivas, Türkiye

<sup>3</sup> Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek

Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler

Bölümü, Sivas, Türkiye

### Corresponding author:

Sebahattin KARABULUT, Sivas

Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık

Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu,

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler

Bölümü, Sivas, Türkiye

### E-mail:

[skarabulut@cumhuriyet.edu.tr](mailto:skarabulut@cumhuriyet.edu.tr)

Received/Accepted: Apr 2023

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

### How to Cite

Yousefzadeh, R., Hassanpour, M.,

Öztürk, A., Karabulut, S. (2023).

Galium Aparine Ekstresinin C6-

Glioma Hücre Hattında Oluşturulan

Glutamat Eksitotoksitesisi Üzerine

Etkisinin Araştırılması. *Health*

*Sciences Student Journal*, 3(1), 8-13.

<https://www.healthssj.com/galium->

[aparine-ekstresinin-c6-glioma-hucre-](https://www.healthssj.com/galium-)

[hattinda-olusturulan-glutamat-](https://www.healthssj.com/galium-)

[eksitotoksitesisi-uzerine-etkisinin-](https://www.healthssj.com/galium-)

[arastirilmesi/](https://www.healthssj.com/galium-)

### ÖZET

**Amaç:** Beynin ana uyarıcı nörotransmitteri olan glutamat'ın suprafizyolojik konsantrasyonları glutamat eksitotoksitesine yol açmaktadır. Galium Aparine (GA) Anadolu'da "yoğurt otu" olarak bilinen ve halk arasında sarılık, kanser ve epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan bir bitkidir. Bu çalışmada, GA tedavisinin C6 hücrelerinde glutamat nörotoksitesine karşı hücre sağ kalıma, oksidan-antioksidan kapasite üzerine etkisi araştırılmıştır.

**Yöntem:** C6-glioma hücreleri kültüre edildikten sonra; 1.Kontrol grubu, 2.Glutamat grubu, 3. Galium aparine grubu, 4. Galium aparine + Glutamat grubu olmak üzere 4 ayrı grup oluşturuldu. Tüm kontrol ve deney gruplarında uygulanan tedavilerin C6 hücre hattında XTT yöntemiyle nöronal sağ kalıma, Total oksidatif stres (TOS) ve Total antioksidatif stres (TAS) düzeylerine etkileri araştırıldı.

**Bulgular:** Glutamat'ın hücre sağ kalımını azaltıcı etkisi GA tarafından iyileştirildi. Ayrıca eksitotoksitesinin indüklediği TOS artışı GA tedavisi ile azaltıldı. Buna ilaveten GA hücre antioksidan düzeyleri artırdı.

**Sonuç:** Bu sonuçlar aşırı glutamatın yol açtığı hücre hasarlarına karşı GA'nin nöroprotektif etkisine ve bu etkide oksidan-antioksidan dengedeki iyileşmenin yer aldığına işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** C6 glioma, Galium aparine, Glutamat.

### ABSTRACT

**Aim:** Supraphysiological concentrations of glutamate, the brain's main excitatory neurotransmitter, leads to glutamate excitotoxicity. Galium aparine (GA) is a plant known as a "yogurt herb" in Anatolia and is used in the treatment of diseases such as jaundice, cancer, and epilepsy. This study investigated the effects of GA treatment on cellular viability and oxidant-antioxidant capacity against glutamate neurotoxicity in C6 cells.

**Method:** C6-glioma cells were cultured and 4 groups were divided into 1. control group, 2. glutamate group, 3. Galium aparine group, 4. Galium aparine + glutamate group. The effects of the treatments administered in all control and experimental groups on neuronal survival, Total oxidative stress (TOS), and Total antioxidative stress (TAS) levels in the C6 cell line were investigated.

**Results:** The reducing effect of glutamate cytotoxicity on cell survival was ameliorated by GA. In addition, the increase in TOS induced by excitotoxicity was decreased by GA treatment. In addition, GA increased cellular antioxidant levels.

**Conclusion:** These results indicate that GA has a neuroprotective effect against cellular damage caused by excess glutamate and that the improvement in oxidant-antioxidant balance is involved in this effect.

**Keywords:** C6 glioma, Galium aparine, Glutamate.

## GİRİŞ

Beyinde en fazla bulunan serbest amino asit olan glutamat (5-15 mmol glutamat/kg beyin dokusu), öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik olaylarda yer alan bir biyomoleküldür.<sup>1</sup> Ayrıca glutamat beyinde ana uyarıcı nörotransmitter olarak görev alır. Etkisini beyin hücrelerinin yüzeyinde bulunan glutamat reseptörlerine (NMDA, AMPA ve Kainat reseptörleri) bağlanarak gösterir. Hücre dışında glutamatı parçalayabilecek enzimler bulunmadığından, glutamat beyinde glutamat taşıyıcıları adı verilen güçlü geri alım sistemleri tarafından sürekli olarak uzaklaştırılır ve böylece bu reseptörlerin aşırı aktivasyonunu önlenmiş olur.<sup>2</sup> Ayrıca kan-beyin bariyeri beyni kandaki glutamattan korur. Bununla birlikte, beyindeki hücre dışı glutamat aşırı salınım ve/veya yetersiz klirens gibi nedenlerle birikirse “eksitotoksisite” olarak tanımlanan ve hücreyi apoptoza kadar götürebilen bir süreç başlatılır.<sup>3</sup> Eksitotoksisitenin Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı, epilepsi, inme, amyotrofik lateral skleroz gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta yer aldığı bilinmektedir.<sup>4-7</sup> Bu yüzden, beyinde ekstraselüler aşırı glutamatın kontrol edilmesinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde bir seçenek olabileceği ileri sürülmektedir.<sup>3</sup>

Galium aparine (GA), Rubiaceae familyasına ait otsu bir bitki olup, sütün ekşitilmesinde kullanılmasına atfen Anadolu’da “yoğurt otu” olarak bilinir. Bu bitki halk arasında ateş, lenf bezlerinde şişlik, sarılık, hipertansiyon, açık yaralar gibi farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.<sup>8</sup> GA ile yapılan araştırmalar onun antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser özelliklere

sahip olduğunu göstermiştir.<sup>9-10</sup> Ancak, GA’nın glutamat eksitotoksisitesi üzerine etkisi hakkında bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada, GA tedavisinin nöronlarda glutamat nörotoksisitesine karşı hücre sağ kalıma, oksidan-antioksidan kapasite üzerine etkisi araştırılmıştır.

## YÖNTEM ve BULGULAR

### *In vitro* Çalışmalar

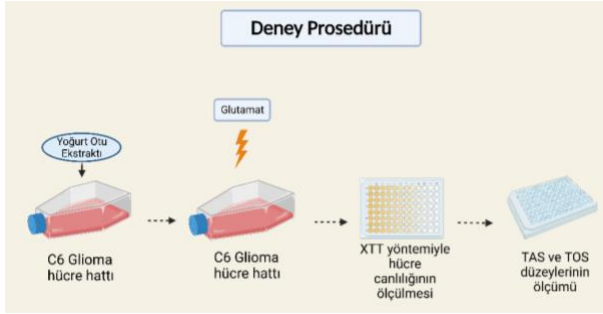
#### *Hücre kültürü*

Çalışmada kullanılan C6-glioma hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)’den temin edildi. C6 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) (fetal sığır serumu), %0,1 penisilin-streptomisin (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) içeren DMEM besiyeri (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) içinde 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda kültür edildi. Hücreler %90 yoğunluğa ulaştığında pasajlandı ve 96’lı plate içerisine her kuyucukta 1x10<sup>4</sup> yoğunlukta hücre olacak şekilde ekildi.

#### *Çalışma Grupları ve Deneysel Protokol*

C6 hücrelerden; Kontrol (herhangi bir tedavi almayan grup); Glutamat (10 mM Glutamat uygulanan grup); Galium Aparine + Glutamat (GA ön tedavisinden 24 saat sonra 10 mM Glutamat uygulanan grup) ve Galium Aparine (GA uygulanan grup) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. GA’nın ön tedavi dozları 2.5, 5, 10 ve 20 µM olarak belirlendi. İlaç uygulamaları belirtildiği şekilde uygulandıktan ve inkübasyondan sonra hücre canlılığı XTT testi (Roche Diagnostic, MA, USA) kullanılarak değerlendirildi. Bunun için 96’lı plaka çıkarılıp oyuklar PBS ile yıkandıktan sonra tüm kuyucuklara fenol kırmızısı içermeyen 100 µL DMEM ve 50 µL XTT solüsyonu ilave edilerek 4 saat 37 °C’de bekletildi.

Örneklere ait absorbanlar 450 nm'de bir ELISA mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) ile belirlendi. Kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilerek, % Hücre canlılığı = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplandı. Çalışmanın deneysel protokolü Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. Deneysel prosedür.

### TAS ve TOS ölçülmesi

Tedavilerin hücresel oksidatif stres üzerine etkisinin değerlendirilmesinde total anti oksidan (TAS) ve total oksidatif stres (TOS) ölçümleri gerçekleştirildi. TAS ölçümü serbest radikallerin reaksiyon hızını izlemek için Fenton reaksiyonunda hidroksil radikallerinin oluşmasıyla başlayan, serbest radikallerin reaksiyonu sırasında boyanmış dianisidiylin emilmesinin gözlenmesine dayanmaktadır.<sup>11</sup> TAS uygulaması firmanın belirttiği protokole göre yapılmıştır. İlk olarak tüm örnekler plakadaki kuyucuklara ekilir ve üzerine reagent-1 solüsyonu eklenerek 660 nm dalga boyunda okutulur. Ardından tüm kuyucuklara reagent-2 solüsyonu eklenir ve 10 dakika inkübe edilir sonrasında 660 nm dalga boyunda okutulur. Elde edilen absorbans değerleri kitte belirtilen formül doğrultusunda hesaplanmıştır. Örneklerde bulunan antioksidanların seviyeleri ile orantılı olarak renklenmeyi baskılamaları beklenir. TOS analizi ise ortamda yeterli oksidan mevcut olduğunda demir iyonunun ferrik

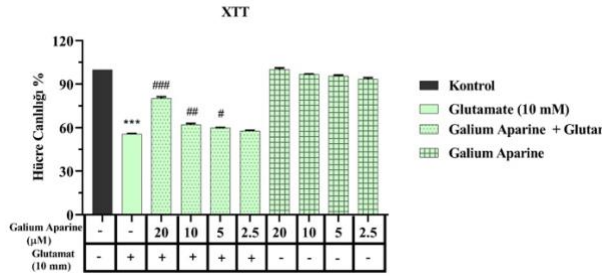
iyona oksitlenmesine ve ksilenol oranj kullanılarak ferrik iyonların hücresel seviyelerinin ölçümüne dayanmaktadır.<sup>12</sup> Ölçüm sırasında izlenen protokol üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır (Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye). Kuyucuklara önce örnekler sonra reagent-1 solüsyonu eklenir 530 nm dalga boyunda okutulur. Ardından reagent-2 solüsyonu eklenir ve 10 dakika inkübasyona bırakılır. Tüm plaka 530 nm dalga boyunda okutulur. Absorbans değerleri kitte belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

### İstatiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS 22.0 for Windows (IBM, Armonk, NY, USA) paket programı kullanıldı. Veriler ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu ve tek yönlü bir varyans analizi (tek yönlü ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Anlamlı farklılıklar elde edildiğinde post-hoc Tukey testi kullanılarak karşılaştırmalar yapıldı. Sonuçlardan  $p < 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

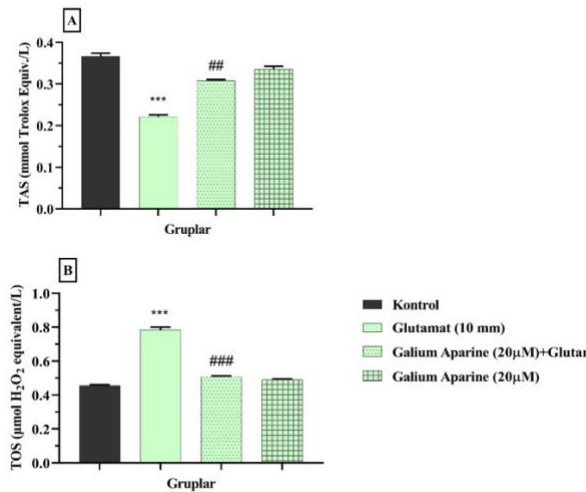
### SONUÇLAR

GA'nin C6-glioma hücreleri üzerinde glutamatın indüklediği sitotoksositeye karşı koruyucu etkinliği XTT hücre canlılığı testi kullanılarak değerlendirildi. GA uygulamaları yukarıda belirtildiği dozlarda uygulandıktan ve glutamat toksisitesine maruz bırakıldıktan sonra yapılan XTT testi sonuçları, canlı hücre oranlarının GA'nin daha yüksek dozlarının uygulandığı gruplarda yalnızca glutamat uygulanan grupla kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir. GA'nin bu nöropotektif etkisi tedavinin 20  $\mu$ M uygulandığı grup da en yüksek olarak elde edilmiştir ( $p < 0.001$ ) (Şekil 2).



**Şekil 2.** GA'nin glutamat kaynaklı sitotoksiteden sonra C6 hücrelerinde sağ kalım üzerindeki etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SH olarak ifade edildi. \*\*\* $p < 0.001$ , kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; #, ##, ###  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  sırasıyla glutamatla tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında.

GA'nin nöroprotektif etkisinde oksidatif stres parametrelerine olası iyileştirici etkisinin olup olmadığını belirlemek için hücresel oksidan ve antioksidan durum analiz edildi.



**Şekil 3.** GA'nin glutamat kaynaklı sitotoksiteden sonrası C6 hücrelerinde TAS ve TOS düzeylerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SH olarak ifade edildi. \*\*\* $p < 0.001$ , kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ###  $p < 0.001$  glutamatla tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında.

GA uygulanan grupta TAS'da artış glutamat uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı. Diğer taraftan glutamat uygulanması hücresel oksidatif stres parametrelerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırırken, GA uygulaması TOS düzeylerini glutamat

grubuna göre anlamlı şekilde azalttı ( $p < 0.05$ ). (Şekil 3).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada GA ön tedavisinin glutamat nörotoksitesine karşı olası nöroprotektif etkisi oksidan sistemlere etkisi üzerinden değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız GA'nin nöroprotektif etkisinin oksidan-antioksidan dengeyi iyileştirerek glutamat kaynaklı oksidatif hasarı azalttığına işaret etmektedir. Merkezi sinir sisteminin (MSS) ana uyarıcı nörotransmitteri olan glutamat, beyinde öğrenme ve bellek gibi önemli bilişsel fonksiyonlara aracılık ederken, suprafizyolojik konsantrasyonlarda Glutamat eksitotoksitesisi olarak adlandırılan ve hücre ölümüyle sonuçlanan patolojik olaylarla ilişkilidir.<sup>1-3</sup> Glutamat eksitotoksitesinin epilepsi, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde yer aldığı bilinmektedir.<sup>3</sup> Aşırı glutamat nöronlarda sitozolik kalsiyum artışı, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif hasarla birlikte geri dönüşü olmayan apoptotik süreçleri başlatabilir. Çalışmamızda bununla paralel olarak glutamat uygulamasının hücre sağ kalımını azalttığı görülmüştür. GA uygulamasının nöronal sağ kalımı artırması nöroprotektif etkiye sahip olduğu yönünde değerlendirilmiştir. GA'nin halk arasında epilepsi hastalarında geleneksel kullanımı ve deneysel epilepsi modellerinde antiepileptik etkiye sahip olduğunun gösterilmesi bu rolüne kanıt sağlayabilir.<sup>13</sup> Oksidatif stres çok sayıda nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisinde yer alan bir süreçtir.<sup>14</sup> Bunun yanında oksidatif hasar glutamat nörotoksitesinin önde gelen bir mekanizmasıdır.<sup>15</sup> Nöronlarda iyonotropik glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu sonucu yoğun kalsiyum girişi mitokondride ROS oluşumuna ve hücre ölümüne yol

açar.<sup>16-18</sup> Benzer şekilde, çalışmamızda glutamat uygulamasının C6 hücrelerinde oksidatif stresi artırdığı gözlemlendi. Diğer taraftan GA ön tedavisinin glutamatın indüklediği oksidatif stresi azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, GA tedavisinin antioksidan etkisinin gösterildiği diğer çalışmalarla uyumludur.<sup>8</sup> Yapısında antrakinonlar, iridoidler, alkanlar, flavonoidler, tanenler, polifenolik asitler ve C vitamini gibi çok sayıda fitokimyasal barındıran GA immünmodulator ve radikal süpürücü etkisi olduğu bildirilmiştir.<sup>8,19</sup> Buna paralel olarak, Pan ve arkadaşları GA'de bulunan rutin'in safra kanalı ligasyonunun indüklediği hepatik fibrozu, inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığını bildirmişlerdir.<sup>20</sup> GA'de bulunan başka bir flavonoid apigenin, NF-κB yolağını baskılayarak, inflamasyonu ve oksidatif stresi iyileştirerek karaciğer hasarını hafifletmiştir.<sup>21</sup>

Sonuç olarak, glutamat eksitotoksitesinin<sup>22</sup> birçok nöropatolojik sürecin ortak paydası olduğu göz önüne alındığında, nöroprotektif etkisi gösterilen GA gibi bitkisel ekstraktlar nörolojik hastalıklar için umut vadetmektedir. Bununla birlikte bu etkisinin altında yatan diğer hücrel ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması için daha fazla araştırma gerekmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 2022 yılı 1 dönem kapsamında 1919B012206193 numaralı başvurusuyla destek almaya hak kazanmıştır.

### KAYNAKÇA

1. Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate

as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996), 121(8), 799–817. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>

2. Lehre, K. P., & Danbolt, N. C. (1998). The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(21), 8751–8757. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08751.1998>
3. Lewerenz, J., & Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence?. *Frontiers in neuroscience*, 9, 469. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>
4. Behrens, P. F., Franz, P., Woodman, B., Lindenberg, K. S., & Landwehrmeyer, G. B. (2002). Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain : a journal of neurology*, 125(Pt 8), 1908–1922. <https://doi.org/10.1093/brain/awf180>
5. Cho C. H. (2013). New mechanism for glutamate hypothesis in epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 127. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00127>
6. Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P. F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., & Meininger, V. (2002). Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *Journal of the neurological sciences*, 193(2), 73–78. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(01\)00661-x](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(01)00661-x)
7. Zhang, Z., Zhang, S., Fu, P., Zhang, Z., Lin, K., Ko, J. K., & Yung, K. K. (2019). Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4391. <https://doi.org/10.3390/ijms20184391>
8. Bokhari, J., Khan, M. R., Shabbir, M., Rashid, U., Jan, S., & Zai, J. A. (2013). Evaluation of diverse antioxidant activities of Galium aparine. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 102, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.056>
9. Atmaca, H., Bozkurt, E., Cıttan, M., & Dilek Tepe, H. (2016). Effects of Galium aparine extract on the cell viability, cell cycle and cell death in breast cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*, 186, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.007>
10. Korkmaz, N., Dayanç, A. & Sevindik, M.

- (2021). ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF GALIUM APARINE. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 45 (3) , 554-564. DOI: 10.33483/jfpau.977776
11. Erel O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37(2), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014>
  12. Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
  13. Orhan, N., Deliorman Orhan, D., Aslan, M., Süküroğlu, M., & Orhan, I. E. (2012). UPLC-TOF-MS analysis of Galium spurium towards its neuroprotective and anticonvulsant activities. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.056>
  14. Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325–340. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>
  15. Parfenova, H., Basuroy, S., Bhattacharya, S., Tcheranova, D., Qu, Y., Regan, R. F., & Leffler, C. W. (2006). Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *American journal of physiology. Cell physiology*, 290(5), C1399–C1410. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2005>
  16. Duchen M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology*, 529 Pt 1(Pt 1), 57–68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x>
  17. Grilli, M., Pizzi, M., Memo, M., & Spano, P. (1996). Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5291), 1383–1385. <https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1383>
  18. Hengartner M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770–776. <https://doi.org/10.1038/35037710>
  19. Iliina, T., Kashpur, N., Granica, S., Bazylko, A., Shinkovenko, I., Kovalyova, A., Goryacha, O., & Koshovyi, O. (2019). Phytochemical Profiles and In Vitro Immunomodulatory Activity of Ethanolic Extracts from Galium aparine L. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(12), 541. <https://doi.org/10.3390/plants8120541>
  20. Pan, P. H., Lin, S. Y., Wang, Y. Y., Chen, W. Y., Chuang, Y. H., Wu, C. C., & Chen, C. J. (2014). Protective effects of rutin on liver injury induced by biliary obstruction in rats. *Free radical biology & medicine*, 73, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.001>
  21. Yue, S., Xue, N., Li, H., Huang, B., Chen, Z., & Wang, X. (2020). Hepatoprotective Effect of Apigenin Against Liver Injury via the Non-canonical NF-κB Pathway In Vivo and In Vitro. *Inflammation*, 43(5), 1634–1648. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01238-5>
  22. Ergül, M., & Taşkıran, A. Ş. (2021). Thiamine Protects Glioblastoma Cells against Glutamate Toxicity by Suppressing Oxidative/Endoplasmic Reticulum Stress. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 69(9), 832–839. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00169>