



## Investigation of the Effect of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil on Pentylentetrazole-induced Neuronal Damage in HT-22 Cell Line

Ahmet Şevki Taşkıran<sup>1,a,\*</sup>, Tuğba Yıldız Asdemir<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Departments of Physiology, School of Medicine, Cumhuriyet University, Sivas, Türkiye

\*Corresponding author

| ARTICLE INFO   | ABSTRACT  |
|--|---|
| <p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 02.10.2023<br/>Accepted : 22.12.2023</p> <p><b>Keywords:</b><br/>Pumpkin seed oil<br/>Pentylentetrazole<br/>Oxidative stress<br/>Nitrosative stress<br/>HT-22 cells</p> | <p>Recent studies have shown the positive effects of <i>Cucurbita pepo</i> L. (pumpkin) seed oil (PSO) in different disease models. However, the effect of PSO on neurological diseases has not been clarified yet. Therefore, this study aims to elucidate the effects of BBS on pentylentetrazole (PTZ)-induced neuronal damage and the possible roles of oxidative and nitrosative stress in this effect <i>in vitro</i>. The HT-22 hippocampal neuronal cell line was used in the study. Cell survival after PTZ-induced neuronal damage was evaluated with the XTT test in the groups. While the effects of BBS on total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) after PTZ were measured with colorimetric commercial kits, its effects on neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and nitric oxide (NO) levels were also determined by ELISA kits. In light of the data obtained, it was found that pre-treatment with PSO prevented the decrease in cell survival after exposure to PTZ. In addition, it has been found that PSO normalizes the increase in TOS, nNOS, and NO in neuronal cells after PTZ. As a result, it was determined that the treatment of neuronal cells with PSO prevented neuronal damage caused by PTZ and showed neuroprotective properties. It is thought that PSO may achieve these effects through oxidative and nitrosative systems. Enrichment of a daily diet with PSO might be beneficial in reducing the risks of neurological diseases.</p> |

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 11(s1): 2499-2504, 2023

## HT-22 Hücrelerinde Pentilentetrazol ile Oluşturulan Nöronal Hasarlanma Üzerine Kabak (*Cucurbita pepo* L.) Çekirdeği Yağının Etkisinin Araştırılması

| MAKALE BİLGİSİ  | ÖZ   |
|---|--|
| <p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 02.10.2023<br/>Kabul : 22.12.2023</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b><br/><i>Cucurbita pepo</i><br/>Kabak Çekirdeği Yağı<br/>Pentilentetrazol<br/>Oksidatif stress<br/>Nitrozatif stress<br/>HT-22 hücreleri</p> | <p>Güncel çalışmalar kabak (<i>Cucurbita pepo</i> L.) çekirdeği yağının (KÇY) farklı hastalık modellerinde olumlu etkilerini ortaya koymuştur. Ancak KÇY'nin nörolojik hastalıklar üzerine etkisi henüz aydınlatılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı KÇY'nin <i>in vitro</i> olarak pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan nöronal hasar üzerine etkilerini ve bu etkide oksidatif ve nitrozatif stresin olası rollerini ortaya koymaktır. Çalışmada HT-22 hipokampal nöronal hücre hattı kullanılmıştır. Gruplar arasında hücre sağ kalımına etkisi XTT testi ile değerlendirilmiştir. KÇY'nin PTZ sonrası oluşan total antioksidan durum (TAS) ve total oksidan durum (TOS) üzerine etkileri kolorometrik ticari kitler ile ölçülürken nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri üzerine etkileri ise ELISA kitleri ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, PTZ'e maruziyet sonrası ortaya çıkan hücre sağ kalımındaki azalmayı KÇY ile ön muamelenin engellediği bulunmuştur. Buna ek olarak KÇY'nin PTZ sonrası nöronal hücrelerde meydana gelen TOS, nNOS ve NO artışını normale çevirdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak nöronal hücrelerin KÇY ile muamelenin PTZ ile oluşturulan nöronal hasarlanmayı engellediği ve nöroprotektif özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu etkileri KÇY'nin oksidatif ve nitrozatif sistemler üzerinden gerçekleştirebileceği düşünülmektedir. KÇY ile günlük beslenmenin zenginleştirilmesi nörolojik hastalık risklerini azaltmada faydalı olabilir.</p> |

<sup>a</sup> [ahmettaskiran@cumhuriyet.edu.tr](mailto:ahmettaskiran@cumhuriyet.edu.tr) <sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5810-8415> | <sup>c</sup> [tugbayildizasdemir@cumhuriyet.edu.tr](mailto:tugbayildizasdemir@cumhuriyet.edu.tr) <sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4219-6203>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

## Giriş

Pentilentetrazol (PTZ) deneysel nöbet ve epilepsi modeli oluşturmak için kullanılan farmakolojik bir ajandır (Taskiran ve ark., 2021). GABA<sub>A</sub> reseptörünü bloklayıp klor akışını baskılayarak bu etkinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu özelliğinden dolayı nöbet ve nöbet sonrası nöronal hasarlanma oluşturmak için deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Taskiran ve Tastemur, 2021; Ahlatci ve ark., 2022; Yıldızhan ve ark., 2023).

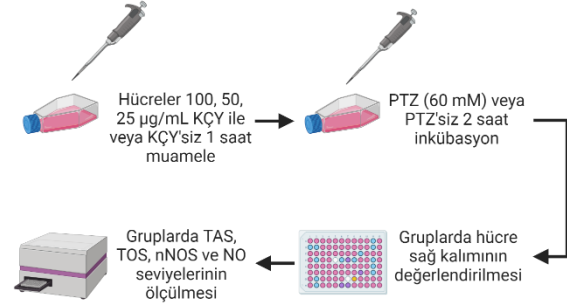
Oksidatif stres (OS) ve nitrozatif stres (NS) oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidan sistem lehine kayması sonucu oluşmaktadır. Denge halinde organizmada enerji üretimi başta olmak üzere hücreler düzeyinde önemli fizyolojik rolleri bulunmaktadır (Yıldızhan ve Naziroğlu, 2019). Dengenin bozulması sonucu OS ve NS'in ortaya çıkması protein, lipid ve DNA gibi temel hücreler yapı taşlarının hasarlanmasına neden olmaktadır. Bu hasarlanma tamir edilemeyecek düzeye geldiğinde ise hücreler ölüm meydana gelmektedir. Bu durum kanser, diyabet ve birçok nörolojik hastalıklarla yakından ilişkilidir (Pizzino ve ark., 2017; Yıldızhan, 2020). Nöbet sonrası artan elektriksel deşarjlar OS ve NS'in tetiklenmesine neden olarak nöronal hasarlanmaya neden olmaktadır (Salim, 2017).

İlk olarak 1980'li yıllarda Japonya'da ortaya çıkan "fonksiyonel gıda" kavramı, fizyolojik fonksiyonlar üzerinde olumlu etkileri olan bileşiklerle zenginleştirilmiş gıda ürünleri için kullanılmaktadır (Siró ve ark., 2008). Günümüzde fonksiyonel gıdalar, yalnızca besin ve enerji sağlamakla kalmayan, aynı zamanda belirli bir fizyolojik yanıtı neden olup hastalık riskini azaltarak vücuttaki bir veya daha fazla hedeflenen işlevi olumlu yönde etkileyen gıdalar olarak tanımlanmaktadır (Nicoletti, 2012). Gıdaların sağlıkla ilgili özelliklerine ve fonksiyonel bileşenlerine karşı artan araştırmalarla birlikte, sadece geleneksel mutfakın bir parçası olarak kullanılan gıdalar, dünya çapında tıbbi açıdan dikkat çekmeye başlamıştır. Bu bağlamda son zamanlarda farklı özellikleri ortaya çıkmaya başlayan fonksiyonel gıdalardan biri de kabak çekirdeği yağıdır (KÇY).

KÇY doymamış yağ asitlerinden ve lif açısından zengin bir besin kaynağıdır (Makni ve ark., 2008). KÇY yapısında linoleik asit, oleik asit, palmitik asit gibi doymamış yağ asitlerini barındırmaktadır. Bununla birlikte, KÇY yüksek miktarda E vitamini içermektedir (Fruhvirth ve Hermetter, 2007). Ayrıca KÇY diğer bitkisel orijinli yağlara kıyasla β-karotenin seviyesi daha yüksektir ve bu sayede güçlü antioksidan özelliği göstermektedir (Şamec ve ark., 2022). Yapılan bir çalışma, KÇY'nin bening prostat hiperplazisini engellediğini bildirmiştir (Gossell-Williams ve ark., 2006). Buna ek olarak KÇY'nin hipertansiyon ve artritin ilerlemesini engellediği, meme, mide ve akciğer kanserine yakalanma oranını düşürdüğü tespit edilmiştir (Stevenson ve ark., 2007). Bütün bu faydalarının yanı sıra, çalışmalar KÇY'nin antiviral, antibakteriyel, antifungal, antihelmintik ve antikarsinogenik özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Shaban ve Sahu, 2017). Fakat KÇY'nin sinir sistemi üzerine etkileri ve olası etki mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada KÇY'nin PTZ ile oluşturulan *in vitro* nöronal hasar üzerine etkilerini ve bu etkide OS'in ve NS'in rollerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

## Materyal ve Yöntem

Deneye ait uygulanan yöntemsel basamaklar Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Deneysel diyagramı (Biorender programı kullanılarak oluşturulmuştur).

Figure 1. Experimental Diagram (Created by Biorender)

### Hücre Hattı ve Kimyasallar

Çalışmada HT-22 (SCC129) fare hipokampal nöronal hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı Sigma Aldrich (Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)'den temin edilmiştir. Hücre büyütme ve çoğaltmada kullanılan yüksek glikoz içeren dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal sığır serumu (FBS), L-glutamin, penisilin/streptomisin (10,000U/mL), tripsin-EDTA çözeltisi ve PTZ Sigma Aldrich (Missouri, Amerika Birleşik Devletleri) firmasından alınmıştır. KÇY Zade Vital (Konya, Türkiye)'den alınmıştır.

### Hücre Kültürü Protokolü

Steril koşullar altında, 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda HT-22 nöronal hücreleri %10 FBS, %5 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM hücre kültür besiyerinde çoğaltılmıştır (Yıldızhan ve Oztürk, 2022). Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajları yapılmış ve üçüncü pasajın ardından çalışmalara başlanmıştır. Hücreler temelde dört farklı gruba ayrılmıştır. Bunlar:

**Kontrol grubu:** Bu gruptaki hücrelere herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

**PTZ grubu:** Bu gruptaki hücreler 2 saat 60 mM PTZ ile inkübe edilmiştir. PTZ doz seçimi için 240 mM, 120 mM, 60 mM, 30mM ve 15 mM konsantrasyonlar 2 saat olarak hücrelere uygulanmış, 60 mM konsantrasyon %50 öldürücü olarak bulunmuştur.

**KÇY + PTZ grubu:** Bu gruptaki hücrelere 1 saat 100, 50 ve 25 µg/mL KÇY ile muamele edildikten sonra 2 saat 60 mM PTZ ile inkübe edilmiştir.

**KÇY grubu:** Bu gruptaki hücrelere sonrasında PTZ uygulanmaksızın 1 saat 100, 50 ve 25 µg/mL KÇY ile muamele edilmiştir.

### Hücre Sağ Kalımının Değerlendirilmesi

PTZ ile oluşturulan nöronal hasar sonrası hücre sağ kalımını değerlendirmek için mitokondriyal enzimler aracılığıyla renk veren XTT (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) testi kullanılmıştır. Sitotoksitesite için 96 kuyucuklu mikropalakaya Thoma lamında ekim öncesi sayım yapılarak her bir kuyucukta 15000 hücre olacak şekilde hücre ekilmiş ve hücrelerin yapışması için 24 saat bekletilmiştir. Hücrelerin ertesi gün

üzerindeki besi yeri uzaklaştırılmış, fosfat buffer solüsyonunda (PBS, pH: 7.4) ile yıkanmış, deney gruplarında yukarıda belirtildiği şekilde PTZ (60 mM olacak şekilde) uygulanmış ve 2 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 2 saatin sonunda besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µl renksiz DMEM eklenmiş ve üzerine 50 µl XTT solüsyonu eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Hücre canlılığına bağlı meydana gelen renk değişikliği mikropılaka okuyucuda (Spectrostar Nano, Allmendgrün, Almanya) 450 nm'de okunarak, kontrol grubunun hücre sağ kalım oranı %100 olarak kabul edilip % Hücre sağ kalım = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) × 100 formülünden yararlanarak hesaplanmıştır.

### Hücre Lizatlarının Elde Edilmesi

Deney gruplarına belirtilen işlemler uygulandıktan sonra biyokimyasal analizler için hücreler tripsin ile kaldırılmış ve çöktürülmüştür. Hücreler ml'de 10<sup>6</sup> olacak şekilde PBS'da süspansiyon edilmiştir. Ardından -80 °C dondurucu yardımı ile üç kez dondurma-çözme işlemi yapılarak hücrelerin patlaması sağlanmıştır. Bu sayede hücre sitozolünde yer alan protein ve metabolitlerin PBS'ye geçmesi sağlanmıştır. Proteinlerin denatüre olmasını engellemek amacı ile dondurma-çözme işlemi üç tekrarla sınırlandırılmıştır. Sonrasında hücre süspansiyonları 10.000 rpm'de 20 dakika 4 °C'da santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlar biyokimyasal işlemler için kullanılmıştır.

### Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan (TOS) Seviyelerinin Ölçümü

Hücre lizatlarında PTZ sonrası oksidatif stres üzerine etkilerini değerlendirmek için kolorometrik TAS, TOS (Rel Assay Diagnostics, Antep, Türkiye) ölçümü ticari kitleri kullanılmıştır. TAS ölçümü hidrojen peroksit varlığında ABTS (2,2'-Azino-di-[3aehtylbenzthiazolinesulphonate) molekülünün ABTS<sup>+</sup> molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. ABTS radikali, antioksidan varlığına göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Renk değişikliği, 660 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirilmektedir. Örneklerde bulunan antioksidan konsantrasyonları ile orantılı olarak renkteki açılma hızlanmaktadır. Sonuçlar µmol Trolox Equiv/mg protein başına ifade edilmektedir. TOS ölçümü örneklerde bulunan oksidanların, Fe<sup>2+</sup>-o-dianisidine kompleksini Fe<sup>3+</sup> iyonuna okside etmesine dayanmaktadır. Fe<sup>3+</sup> iyonu asidik ortamda ksilenol oranı ile renkli bir kompleks yapar ve renk değişikimi, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin konsantrasyonu ile orantılı olup spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Renk değişikliği 530 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirilmektedir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilmekte ve sonuçlar µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/mg protein başına ifade edilmektedir.

### nNOS ve NO Seviyelerinin Ölçümü

Elde edilen hücre lizatlarında nNOS ve NO seviyeleri, spesifik fare ELISA ticari kitleri (Sunlong, Zhejiang, Çin) kullanılarak ölçülmüştür. Üreticinin talimatlarına göre, ilk olarak kit içerisinde yer alan standartlar ve hücre lizatları kuyucuklara yüklenerek 37 °C derecede 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara boyama solüsyonları eklenerek 37 °C derecede 15 dakika

tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Son aşama olarak kuyucuklara durdurma solüsyonu eklenmesini takiben, mikropılaka okuyucuda (Spectrostar Nano, Allmendgrün, Almanya) 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Standartların absorbanlarına göre doğrusal bir grafik oluşturulmuştur. Bu doğrusal grafikte elde edilen denklem yardımıyla örneklerin değerleri hesaplanmıştır. Bradford yöntemi kullanılarak, örneklerde total protein tayini gerçekleştirilmiştir (Kruger, 2009).

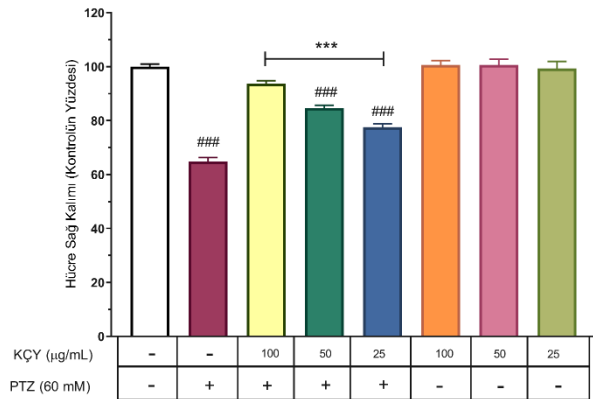
### İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 22.0 programı kullanılmıştır. Tüm gruplarda ölçülen XTT, TAS, TOS, nNOS ve NO verilerinin ortalama ± standart hatası (Ort. ± SH) alınarak değerlendirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluk göstermesinden dolayı tek yönlü varyans analizi (ANOVA), post-hoc olarak Tukey testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $P < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

#### KÇY'nın PTZ ile Oluşturulan Nöronal Hasar Sonrası Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisi

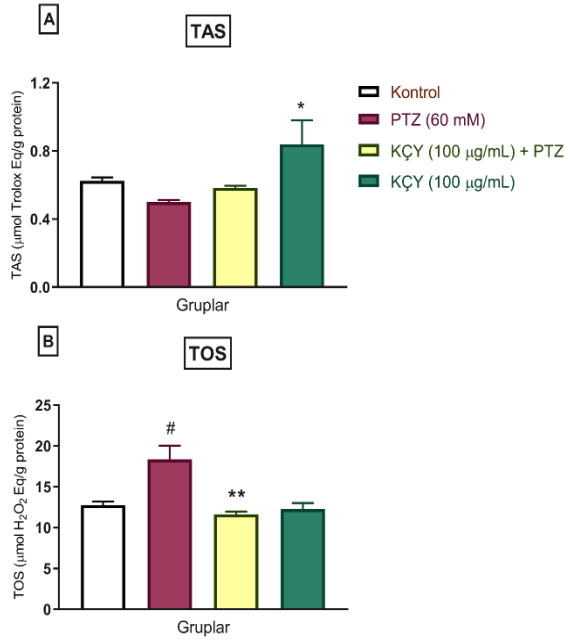
Çalışmanın bu aşamasında, artan KÇY dozlarının (25–100 µg/mL) HT-22 hipokampal nöronal hücrelerde PTZ ile oluşturulan hasar sonrası hücre sağkalımı üzerine etkisi XTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücreler başlangıçta 1 saat boyunca artan dozlarda (25, 50 ve 100 µg/mL) KÇY ile muamele edilmiş ve ardından sonraki 2 saat boyunca 60 mM PTZ ile veya PTZ'siz inkübe edilmiştir. Şekil 2'de gösterildiği gibi, HT-22 hücrelerinin 2 saat boyunca PTZ ile inkübasyonu, kontrole göre kıyasla hücre sağkalımını önemli ölçüde azaltmıştır ( $P < 0,001$ ; Şekil 2). Bununla birlikte, tüm dozlarda KÇY'nın, sadece PTZ ile muamele edilen grupla karşılaştırıldığında hücre sağkalımını arttırdığı belirlenmiştir ( $P < 0,001$ ; Şekil 2). Ayrıca tek başına KÇY'nın, uygulama dozlarında, kontrole kıyasla HT-22 hücrelerinin sağkalımı üzerine toksik bir etkisi belirlenmemiştir ( $P > 0,05$ ; Şekil 2).



Şekil 2. KÇY'nın PTZ ile oluşturulan nöronal hasarlanma sonrası hücre sağ kalımı üzerine etkisi. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. ###  $P < 0,001$  diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ve \*\*\*  $P < 0,001$  PTZ grubu ile karşılaştırıldığında.

Figure 2. Effect of PSO on cell survival after PTZ-induced neuronal damage.

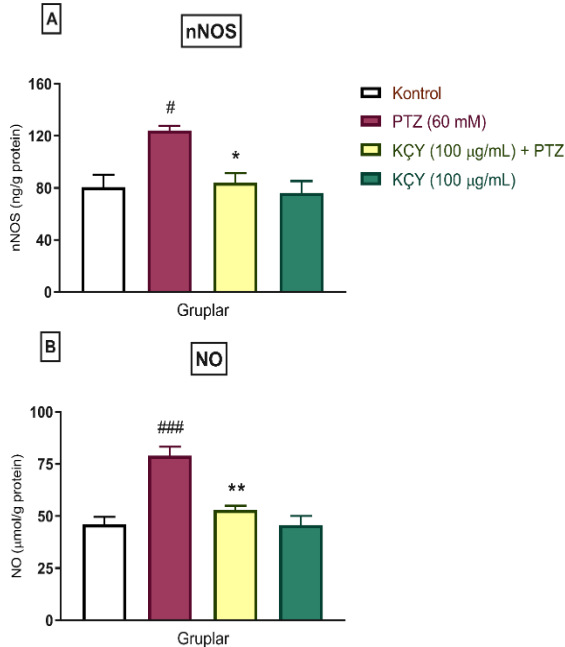
Data are presented as mean ± SEM. ###  $P < 0,001$  compared to other groups and \*\*\*  $P < 0,001$  compared to the PTZ group.



**Şekil 3.** KÇY'nın PTZ ile oluşturulan nöronal hasarlanma sonrası hüresel TAS ve TOS seviyeleri üzerine etkisi. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. <sup>#</sup>P < 0,05 diğer gruplar ile karşılaştırıldığında. \*P < 0,05 ve \*\*P < 0,01 PTZ grubu ile karşılaştırıldığında.

**Figure 3.** Effect of PSO on cellular TAS and TOS levels after PTZ-induced neuronal damage.

Data are presented as mean ± SEM. \*P<0.05 compared to other groups. <sup>#</sup>P<0.05 and \*\*P<0.01 compared to the PTZ group.



**Şekil 4.** KÇY'nın PTZ ile oluşturulan nöronal hasarlanma sonrası hüresel nNOS ve NO seviyeleri üzerine etkisi. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. <sup>#</sup>P < 0,05 ve <sup>###</sup>P < 0,001 diğer gruplar ile karşılaştırıldığında. \*P < 0,05 ve \*\*P < 0,01 PTZ grubu ile karşılaştırıldığında.

**Figure 4.** Effect of PSO on cellular nNOS and NO levels after PTZ-induced neuronal damage.

Data are presented as mean ± SEM. <sup>#</sup>P<0.05 and <sup>###</sup>P<0.001 compared to other groups. \*P<0.05 and \*\*P<0.01 compared to the PTZ group.

Bu çalışmada *in vitro* olarak oluşturulan nöronal hasarlanma üzerine KÇY'nın etkisi çalışılmıştır. Mevcut literatüre göre KÇY ile ilgili bu alanda gerçekleştirilen ilk çalışmadır. Farklı dokularda ve farklı modellere bakıldığında, *in vivo* bir çalışmada KÇY'nın sıçanlarda ince bağırsakta metotreksat kaynaklı oluşan hasara karşı koruyucu olduğu tespit edilmiştir (Yüncü ve ark., 2006). Başka bir *in vivo* çalışmada KÇY'nın kardiyoprotektif özellik gösterdiği bulunmuştur (El-Mosallamy ve ark., 2012). Bu çalışmalara ek olarak farelere diyet içerisinde KÇY verilmesinin karaciğer yağlanmasını ve ateroskleroz gelişimini önlediği belirlenmiştir (Morrison ve ark., 2015). Tüm bu çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda KÇY'nın PTZ ile oluşturulan nöronal hasarlanmaya karşı koruyucu olduğu ortaya konmuştur.

#### **KÇY'nın PTZ ile Oluşturulan Nöronal Hasar Sonrası TAS ve TOS Seviyeleri Üzerine Etkisi**

Hücreler 1 saat boyunca en etkili doz olarak belirlenen 100 µg/mL KÇY ile muamele edilmiş ve ardından 2 saat boyunca 60 mM PTZ ile veya PTZ'siz inkübe edilmiş ve kolorometrik ticari kitler ile hüresel TAS ve TOS seviyeleri belirlenmiştir.

Şekil 3'te gösterildiği gibi, tek başına PTZ alan grup, kontrol kıyaslandığında HT-22 hücrelerinde TAS seviyelerini azaltsa da bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ; Şekil 3A). Öte yandan KÇY, tek başına PTZ alan grupla kıyaslandığında HT-22 hücrelerinde TAS'ı önemli ölçüde artırmıştır ( $P < 0,05$ ; Şekil 3A).

HT-22 hücrelerini 2 saat boyunca tek başına PTZ'e maruz bırakmak, kontrole kıyasla TOS seviyelerini önemli ölçüde yükselttiği belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ; Şekil 3B). Fakat KÇY ile ön muamele görüp ardından PTZ'e maruz kalan hücrelerdeki TOS seviyesi, tek başına PTZ ile muamele gören hücrelerin TOS seviyesine kıyasla önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir ( $P < 0,01$ ; Şekil 3B).

Çalışmamızda nöronal hücrelere KÇY uygulanmasının nöronal hasarlanma sonrası TAS seviyesini arttırsa da bu anlamlı bulunmamıştır. Yapılan çalışmalarda KÇY'nın antioksidan özellik gösterdiği belirlenmiştir (Patel, 2013). Fakat bu özelliğin ekstraksiyon metodları ile değişebileceği vurgulanmıştır (Irnawati ve ark., 2022). Çalışmamızda KÇY'nın doğrudan TAS seviyesini arttırmaması endojen antioksidan sistem üzerinden değil vitamin C gibi eksojen olarak reaktif oksijen türlerini süpürücü etkisi ile açıklanabilir. Nitekim TAS seviyesini arttırmasa da nöronal hasarlanma sonrası artan TOS seviyesini düşürdüğü belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde, KÇY'nın alfatoksin zehirlenmesi sonrası karaciğer, akciğer, böbrek ve beyin gibi dokularda azalan antioksidan sistem belirteçlerini arttırdığı ve artan oksidan sistem belirteçlerini ise azalttığı bulunmuştur (Eraslan ve ark., 2013). Buna ek olarak, KÇY'nın sodyum nitrat ile oluşturulan karaciğer hasarını oksidatif stresi azaltarak hafiflettiği rapor edilmiştir (Rouag ve ark., 2020).

#### **KÇY'nın PTZ ile Oluşturulan Nöronal Hasar Sonrası nNOS ve NO Seviyeleri Üzerine Etkisi**

Hücreler KÇY (100 µg/mL) ile 1 saat boyunca muamele edilmiş ve ardından 2 saat boyunca 60 mM PTZ ile veya PTZ'siz inkübe edilmiş ve ELISA ile hücrelerde nNOS ve NO seviyeleri belirlenmiştir.

Tek başına hücreleri 2 saat boyunca PTZ'ye maruz bırakmak, kontrole kıyasla nNOS seviyelerini ve NO seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur (nNOS için  $P < 0,05$ ; Şekil 4A; NO için  $P < 0,001$ ; Şekil 4B). Öte yandan hücrelerin KÇY ile muamele edilmesi tek başına PTZ'e maruz kalan hücrelere göre nNOS ve NO seviyelerini anlamlı olarak düşürmüştür (nNOS için  $P < 0,05$ ; Şekil 4A; NO için  $P < 0,01$ ; Şekil 4B).

Çalışmamızda KÇY ile yapılan ön tedavi PTZ ile oluşturulan nöronal hasar sonrası artan nNOS ve NO seviyelerini azaltmıştır. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, çalışmamıza benzer şekilde KÇY'nın sıçanlarda metotreksat kaynaklı oluşan hasar sonrası ince bağırsakta NO seviyelerini azalttığı belirlenmiştir (Yüncü ve ark., 2006). Benzer şekilde KÇY'nın deneysel olarak oluşturulan hipertansiyon modelinde serumda yükselen NO seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir (El-Mosallamy ve ark., 2012). Buna ek olarak KÇY'nın karaciğer dokusunda sodyum nitrat ile oluşturulan hasarlanma sonrası NO seviyelerini normale çevirdiği rapor edilmiştir (Rouag ve ark., 2020). Fakat çalışmamızda KÇY'nın nNOS seviyeleri üzerine de düzenleyici etkinlik gösterebileceği ilk olarak gösterilmiştir.

## Sonuç

Bu çalışma mevcut ulaşılabilir literatür göz önünde bulundurulduğunda KÇY'nın nörolojik etkileşimi ve olası etkilerini inceleyen ilk *in vitro* çalışmadır. Çalışmamızda KÇY ile ön tedavinin nöronal hücrelerde PTZ ile oluşturulan hasarlanmayı engelleyerek hücre sağ kalımını arttırdığı belirlenmiştir. Bu nöroprotektif özelliği KÇY'nın oksidatif ve nitrozatif sistemler aracılığıyla gerçekleştirilebileceği bulunmuştur. KÇY ile beslenmenin zenginleştirilmesi nörolojik hastalık risklerini azaltmada faydalı olabileceği düşünülmektedir. KÇY'nın nörolojik sistemlerle ilgili farklı etkileşimlerini ve mekanizmalarını ortaya koymak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mevcut çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle araştırma *in vitro* olarak gerçekleştirilmiş olduğundan canlı sistemin bütününe yansıtamamaktadır. Bu amaçla *in vivo* modeller ile KÇY'nın epileptik nöbetler ve epileptogenez üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda piyasada kullanılan bir ürün tercih edilmiştir fakat bu ürünün elde edilme yöntemi ve besin özellikleri dışında kalan içerik detayları bilinmemektedir. Bu nedenle de ilerleyen çalışmalarda üretici firma ile iletişime geçilecek izin verilmesi halinde elde edilme yöntemi detayları paylaşılacak ve mevcut ürün özelliklerinin detaylı bileşenleri gaz kromatografik yöntemi ile ortaya konması sağlanacaktır.

## Teşekkür

Bu çalışmanın başarılı bir şekilde yürütülmesi için gerekli olan temel alt yapı ve olanakların sağlanmasında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi (CÜTFAM)'ne katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Bu çalışma, 3rd International Congress of the Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology) TURJAF 2023, kongresinde sunulmuştur.

## Kaynaklar

- Ahlatcı A, Yıldızhan K, Tülüce Y, Bektaş M. 2022. Valproic Acid Attenuated PTZ-induced Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in the SH-SY5Y Cells via Modulating the TRPM2 Channel. *Neurotox Res*, 40(6):1979-1988. doi: 10.1007/s12640-022-00622-3
- El-Mosallamy AE, Sleem AA, Abdel-Salam OM, Shaffie N, Kenawy SA. 2012. Antihypertensive and Cardioprotective Effects of Pumpkin Seed Oil. *J Med Food*, 15:180-189. doi: 10.1089/JMF.2010.0299
- Eraslan G, Kanbur M, Aslan Ö, Karabacak M. 2013. The antioxidant effects of pumpkin seed oil on subacute aflatoxin poisoning in mice. *Environ Toxicol*, 28:681-688. doi: 10.1002/TOX.20763
- Fruhwith GO, Hermetter A. 2007. Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *Eur J Lipid Sci Technol*, 109:1128-1140. doi: 10.1002/EJLT.200700105
- Gossell-Williams M, Davis A, O'Connor N. 2006. Inhibition of Testosterone-Induced Hyperplasia of the Prostate of Sprague-Dawley Rats by Pumpkin Seed Oil. *J Med Food*, 9:284-286. doi: 10.1089/JMF.2006.9.284
- İrnawati I, Riyanto S, Martono S, Windarsihe A, Rohman A. 2022. Physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin seed oil as affected by different origins and extraction methods. *J Appl Pharm Sci*, 12:115-122. doi: 10.7324/JAPS.2022.120312
- Makni M, Fetoui H, Gargouri NK, Garoui el M, Jaber H, Makni J, Boudawara T, Zeghal N. 2008. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in omega-3 and omega-6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food Chem Toxicol*, 46:3714-3720. doi: 10.1016/J.FCT.2008.09.057
- Morrison MC, Mulder P, Stavro PM, Suárez M, Arola-Arnal A, van Duyvenvoorde W, Kooistra T, Wielinga PY, Kleemann R. 2015. Replacement of Dietary Saturated Fat by PUFA-Rich Pumpkin Seed Oil Attenuates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Atherosclerosis Development, with Additional Health Effects of Virgin over Refined Oil. *PLoS One*, 10:e0139196. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0139196
- Nicoletti M. 2012. Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives. *Int J Food Sci Nutr*, 63:2-6. doi: 10.3109/09637486.2011.628012
- Patel S. 2013. Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seeds as nutraceutical: A review on status quo and scopes. *Med J Nutrition Metab*, 6:183-189. doi: 10.1007/S12349-013-0131-5/METRICS
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 8416763. doi: 10.1155/2017/8416763
- Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, Abdennour C, Boumendjel A, Messarah M. 2020. Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. *Afr Health Sci*, 20:413-425. doi: 10.4314/AHS.V20I1.48
- Salim S. 2017. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*, 360:201. doi: 10.1124/JPET.116.237503
- Şamec D, Loizzo MR, Gortzi O, Çankaya İT, Tundis R, Santar İ, Shirooie S, Zengin G, Devkota HP, Reboredo-Rodríguez P, Hassan STS, Manayi A, Kashani HRK, Nabavi SM. 2022. The potential of pumpkin seed oil as a functional food—A comprehensive review of chemical composition, health benefits, and safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 21:4422-4446. doi: 10.1111/1541-4337.13013
- Shaban A, Sahu RP. 2017. Pumpkin Seed Oil: An Alternative Medicine. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 9:11. doi: 10.25258/PHYTO.V9I2.8066

- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance A review. *Appetite*, 51:456–467. doi: 10.1016/J.APPET.2008.05.060
- Stevenson DG, Eller FJ, Wang L, Jane JL, Wang T, Inglett GE. 2007. Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars. *J Agric Food Chem*, 55:4005–4013. doi: 10.1021/JF0706979
- Taskiran AS, Ergul M, Gunes H, Ozturk A, Sahin B, Ozdemir E. 2021. The Effects of Proton Pump Inhibitors (Pantoprazole) on Pentylentetrazole-Induced Epileptic Seizures in Rats and Neurotoxicity in the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Cell Mol Neurobiol*, 41:173–183. doi: 10.1007/S10571-020-00956-6/FIGURES/9
- Tastemur Y, Gumus E, Ergul M, Ulu M, Akkaya R, Ozturk A, Taskiran AS. 2020. Positive effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, captopril, on pentylentetrazole-induced epileptic seizures in mice. *Trop J Pharm Res*, 19:637–643. doi: 10.4314/TJPR.V19I3.26
- Yildizhan K. 2020. Protective role of selenium against bisphenol-A induced oxidative stress, cytokine generation and apoptosis in SH-SY5Y neuronal cell line. *J Cell Neurosci Oxid Stress*, 12(3): 955-962. doi: 10.37212/jcnos.1005692
- Yildizhan K, Gunes H, Taskiran AS. 2023. Effect of Anakinra and Infliximab on Oxidative Stress and Caspase Activation in PTZ-Induced Acute Seizure in Rats. *Eastern Journal of Medicine*, 28(1): 75-81. doi: 10.5505/ejm.2023.84669
- Yildizhan K, Naziroğlu M. 2019. Microglia and its role in neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress*, 11(2): 861-873. doi: 10.37212/jcnos.683407
- Yildizhan K, Ozturk A. 2022. Quipazine treatment exacerbates oxidative stress in glutamate-induced HT-22 neuronal cells. *The European Research Journal*, 8(4): 521-528. doi: 10.18621/eurj.1027423
- Yüncü M, Eralp A, Celik A. 2006. Effect of aged garlic extract against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. *Phyther Res*, 20:504–510. doi: 10.1002/ptr.1896