



## Investigation of the Protective Role of Quercetin on Oxidative Stress and Endoplasmic Stress Pathway in 4-aminopyridine-induced Neuronal Damage

Ahmet Şevki Taşkiran<sup>1,a,\*</sup>, Ayşe Topçu<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 Accepted : 07.12.2023</p> <p><b>Keywords:</b> Quercetin 4-aminopyridine Neuronal Damage Oxidative stress Endoplasmic reticulum stress</p>	<p>Quercetin (QU) is a flavonoid found in different fruits and vegetables. Studies report that QU may have positive effects on neurological diseases. However, the effect of QU on 4-aminopyridine (4-AP)-induced neurodegeneration in neuronal cells is still not fully elucidated. In this study, the effects of QU on 4-AP-induced hippocampal neuron damage <i>in vitro</i> and the possible role of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in this effect were investigated. The study was carried out using the HT-22 hippocampal neuronal cell line. The effect of pre-treatment with QU on cell viability after 4-AP-induced neuronal damage was determined by the XTT test. Cells were evaluated histopathologically for apoptotic nuclear change (ANC) using DAPI staining. The effects of QU on oxidative stress (total oxidant state (TOS) and total antioxidant status (TAS)) occurring after neuronal damage were evaluated with colorimetric commercial kits and endoplasmic reticulum stress markers (activating transcription factor 4 (ATF-4) and C/EBP homologous protein). (CHOP) was measured with the ELISA kits. While the cell viability rate decreased in the cells treated with 4-AP, it was determined that pre-treatment with QU reversed this situation. In terms of histopathology, treatment with 4-AP increased the number of ANC, while QU pre-treatment reduced it. In addition, in terms of biochemical evaluations, TOS, ATF-4, and CHOP increased in neuronal cells after 4-AP, and QU was determined to suppress this increase. In addition, QU normalized the decreased TAS levels following the 4-AP application. As a result, in the HT-22 cell line, it was found that QU treatment had a neuroprotective effect by suppressing oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in 4-AP-induced neuronal damage.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 11(s1): 2505-2511, 2023

## 4-aminopridin ile Oluşturulan Nöronal Hasarda Oksidatif Stres ve Endoplazmik Stres Yolağı Üzerine Kuersetin'in Koruyucu Rolünün Araştırılması

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 02.10.2023 Kabul : 07.12.2023</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Kuersetin 4-aminopridin Nöronal Hasar Oksidatif stres Endoplazmik retikulum stresi</p>	<p>Kuersetin (KU) farklı meyve ve sebze bulunan bir flavonoiddir. Yapılan çalışmalar KU'in nörolojik hastalıklar üzerine olumlu etkileri olabileceğini bildirmektedir. Ancak nöronal hücrelerde KU'in 4-aminopridin (4-AP) kaynaklı nörodejenerasyon üzerine etkisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada; KU'in 4-AP ile oluşturulan <i>in vitro</i> hipokampal nöron hasarı üzerine etkilerini ve bu etkide oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresinin olası rolü araştırılmıştır. Çalışma HT-22 hipokampal nöronal hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. KU ile ön tedavinin 4-AP ile oluşturulan nöronal hasar sonrası hücre canlılığına etkisi XTT testi ile belirlenmiştir. Hücreler DAPI boyası kullanılarak apoptotik çekirdek değişikliği (AÇD) açısından histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. KU'in nöronal hasarlanma sonrası oluşan oksidatif stres (total oksidan durum (TOS) ve total antioksidan durum (TAS)) üzerine etkileri kolorometrik ticari kitler ile endoplazmik retikulum stres belirteçleri (aktifleyici transkripsiyon faktör 4 (ATF-4) ve C/EBP homolog proteini (CHOP) ELISA kitleri yardımıyla ölçülmüştür. 4-AP uygulanan hücrelerde hücre canlılık oranı azalırken, KU ile ön tedavinin bu durumu tersine çevirdiği belirlendi. Histopatolojik açıdan, 4-AP ile muamele AÇD sayısını arttırırken KU ön tedavisi bunu azalttı. Ayrıca biyokimyasal değerlendirmeler açısından, 4-AP sonrası nöronal hücrelerde TOS, ATF-4 ve CHOP artışı meydana geldi ve KU bu artışı baskıladığı belirlendi. Buna ek olarak KU, 4-AP uygulamasını takiben azalan TAS seviyelerini normale çevirdi. Sonuç olarak, HT-22 hücre hattında 4-AP ile indüklenen nöronal hasarda, KU tedavisinin oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi baskılayarak nöroprotektif etki gösterdiği bulundu.</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> [ayssets19@gmail.com](mailto:ayssets19@gmail.com)

<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0438-2758>



## Giriş

Kortikal nöronlardan aşırı ve anormal elektrik boşalması olan nöbetler, geçici beyin fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Taskiran ve Ergul, 2021). Epilepsi, genetik yatkınlık veya patolojik bozukluklara bağlı tekrarlayan nöbetlerle karakterize anormal bir merkezi sinir sistemi durumudur (Taskiran ve ark., 2020; Ahlatci ve ark., 2022). Dünya nüfusunun yaklaşık %1'i bu nörolojik bozukluktan muzdarip durumdadır (Taskiran ve ark., 2021). Nöbetler genellikle anti epileptik ilaçlarla (AEİ) tedavi edilir. Bununla birlikte, AEİ almalarına rağmen ilaca dirençli epileptik hastaların %20-30'u hala dirençli nöbetler yaşamaktadır (Das ve ark., 2011). Bu nedenle AEİ'lerin terapötik etkilerinin yetersiz olması nedeniyle hala daha güçlü ve güvenli yeni ilaçlar üzerine araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Taskiran ve Tastemur, 2021; Yıldızhan ve ark., 2023).

4-aminopridin (4-AP) beyin kesitlerinde *in vitro* olarak ve deney hayvanlarında *in vivo* olarak nöbet oluşturmak için kullanılan farmakolojik bir ligandır. Etkinliğini seçici olmayan potasyum kanallarını bloke ederek göstermektedir (Gean ve ark., 1990). Potasyum kanal blokajı hücre içerisinde fazla miktarda pozitif iyon birikmesine neden olarak aksiyon potansiyel oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Pea ve Tapia, 2000). Bunun sonucu olarak nöbet aktiviteleri meydana gelmektedir. Bu özelliğinden dolayı 4-AP deneysel nöbet araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Heuzeroth ve ark., 2019).

Oksidatif stres (OS) oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşmaktadır. OS'in ortaya çıkması temel hücresel yapı taşları olan protein, lipit ve DNA'nın hasarlanmasına neden olmaktadır (Pizzino ve ark., 2017). Bu hasarlanma hücresel tamir mekanizmaları tarafından tamir edilemeyecek düzeye geldiğinde hücresel ölüm meydana gelmektedir. Bu durum birçok nörolojik hastalıklarla da yakından ilişkilidir (Emerit ve ark., 2004; Yıldızhan ve Naziroglu, 2019). Nöbet sonrası elektriksel uyarılmalarda artış mitokondri disfonksiyonu ile OS'in tetiklenmesine neden olarak nöronal hasarlanmayı tetiklemektedir (Aguar ve ark., 2012). Bununla birlikte OS'in artışı nöronal eksitasyonu artırarak nöbetlerin kolaylaşmasını sağlamakta ve epileptogenez oluşum sürecini hızlandırmaktadır (Sun ve ark., 2022; Madireddy ve Madireddy, 2023).

Hücrelerde endoplazmik retikulum (ER) proteinlerinin sentezlenmesi, katlanması ve olgunlaşmasının sağlandığı temel organeldir. Hücresel kapasitenin aşarak protein katlanma cevabının bozulması durumuna ER stresi denilmektedir. Yapılan çalışmalar ER stresinin birçok farklı hastalıkta rol aldığını göstermiştir (Almanza ve ark., 2019). Bununla birlikte ER stresinin nörodejeneratif hastalıklar ve epilepsi patofizyolojisi ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Lindholm ve ark., 2006).

Son zamanlarda, doğal olarak oluşan substratların, geniş yelpazedeki biyolojik aktivitelerden dolayı, özellikle de doğal fitokimyasalların tanımlanmasına büyük önem verilmiştir (Russo ve ark., 2012). Flavonoidler, bilim camiasının büyük ölçüde dikkatini çeken ve birçok hastalık için umut verici tedavi edici olabilecek doğal polifenolik bileşiklerdir (Russo ve ark., 2012). İnsan diyetindeki en yaygın bitki flavonoidlerinden ve önde gelen diyet antioksidanlarından biri olan kuersetin (3,3',4',5,7-

pentahidroksiflavon; KU), çeşitli çaylarda, meyvelerde ve sebzelerde bulunmaktadır ve özellikle Çin tıbbında klinik çalışmalarda kullanımı onaylanmıştır (Tang ve ark., 2020). KU'in antifibrotik, antiviral, antikanser, antiinflamatuvar ve antioksidatif özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Wang ve ark., 2022; Manni ve ark., 2023; Mansour ve ark., 2023). Buna ek olarak, KU'in sinir sistemi üzerine olumlu etkileri ortaya konmuştur (Islam ve ark., 2021). Fakat 4-AP ile oluşturulan *in vitro* nöronal hasarlanma üzerine etkisi ve olası etki mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada; KU'in 4-AP ile oluşturulan hipokampal nöronal hasarlanma üzerine etkilerini ve bu etkide OS'in ve ER stresinin rollerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

## Materyal ve Yöntem

Çalışmamızda gerçekleştirilen deneysel aşamalar basamaklar Şekil 1'de gösterilmiştir.

### Hücre Hattı

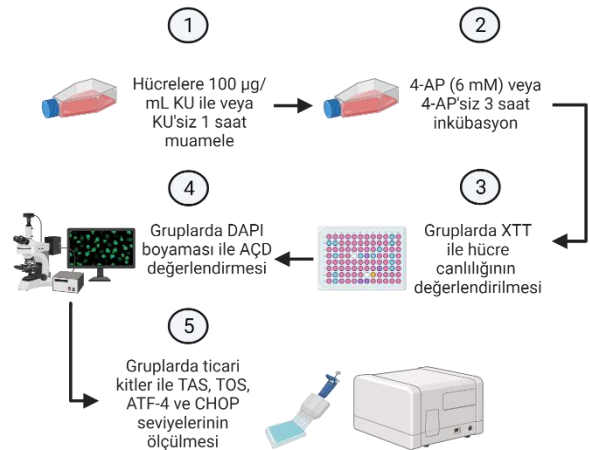
Çalışmada HT-22 (SCC129) fare orjinli immortalize edilerek çoğalma yeteneği kazandırılmış hipokampal nöronal hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı Sigma Aldrich (Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)'den temin edilmiştir.

### Kimyasallar

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 4-AP Sigma Aldrich (Missouri, Amerika Birleşik Devletleri) firmasından alınmıştır. KU Orzax (İstanbul, Türkiye)'den alınmıştır.

### Hücre Kültürü Protokolü

HT-22 hipokampal nöronal hücreler steril koşullar altında 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda, 25 cm<sup>2</sup>'lik flaklarda, %10 FBS, %5 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM hücre kültür besisi yerinde büyütülmüş ve çoğaltılmıştır (Yıldızhan ve Ozturk, 2022).



Şekil 1. Deneysel aşamaları (Biorender programı ile oluşturulmuştur)

Figure 1. Experimental Stages (Created by Biorender)

Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajları yapılmış ve üçüncü pasajın ardından çalışmalara başlanmıştır. Hücreler dört farklı gruba ayrılarak işlemler gerçekleştirilmiştir. Bunlar: *Kontrol grubu*: Bu gruptaki hücelere herhangi bir işlem uygulanmamıştır. *4-AP grubu*: Bu gruptaki hücelere 3 saat boyunca %50 öldürücü olarak bulunmuş olan 6 mM 4-AP ile muamele edilmiştir. *KU + 4-AP grubu*: Bu gruptaki hücelere 1 saat 10 µM/mL KU ile muamele edildikten sonra 3 saat 6 mM 4-AP içeren besi yeri inkübe edilmiştir. *KU grubu*: Bu gruptaki hücelere 1 saat 10 µM/mL KU ile muamele edildikten sonra 3 saat 4-AP'siz besi yeri ile inkübe edilmiştir

#### **Hücre Canlılık Testi**

4-AP'in meydana getirdiği nöronal hasarlanma sonrası hücre canlılığını değerlendirmek için mitokondriyal enzimler aracılığıyla renk veren ve suda çözünen XTT (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) testi kullanılmıştır. Sitotoksiste için öncelikle her kuyuda  $15 \times 10^3$  hücre olacak şekilde hücre alınıp steril 96 kuyucuklu mikropalakaya ekilmiş ve hücrelerin yapışması için bir gece bekletilmiştir. Tutunma sonrası yukarıda belirtildiği şekilde 4-AP'li ve 4-AP'siz işlem uygulaması yapılmış, 3 saat sonra üreticinin talimatlarına göre gerekli ön işlemler gerçekleştirilmiş ve hücelere XTT karışım çözümü eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında mikropalaka okuyucuda (Spectrostar Nano, Allmendgrün, Almanya) 450 nm'de okunarak, kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilip % Hücre canlılık =  $(\text{Konsantrasyon O.D.} / \text{Kontrol O.D.}) \times 100$  formülünden yararlanarak hesaplanmıştır.

#### **Histopatolojik Değerlendirme**

Gruplara KU ve 4-AP uygulanmasından 3saat sonra hücelere, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca paraformaldehit (%4) ile fikse edilmiştir. Hücreler daha sonra üç kez PBS ile yıkanmış ve ardından 5 dakika DAPI (BioShop, Burlington, Kanada) ile boyanmıştır. Hücreler floresan mikroskop yardımıyla (Carl Zeiss, Jena, Almanya) görüntülenmiş mikroskopun kendi programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücresel ve nükleer morfolojideki apoptozla ilişkili değişiklikler incelenmiş ve nükleer boyutta azalma, kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve yoğun floresan görünümü apoptotik çekirdek değişiklikleri (AÇD) olarak kabul edilmiş ve toplam çekirdek sayısına göre yüzdesi belirlenmiştir.

#### **Hücre Lizatlarının Elde Edilmesi**

Biyokimyasal analizler için 25 cm<sup>2</sup>'lik flaklarda gruplandırılan hücelere yukarıda belirtilen ilaç uygulamalarını takiben tripsin ile kaldırılmış ve çöktürülmüştür. Ardından hücrelerin patlatılıp sitoplazmik içeriklerin ve metabolitlerin ortaya çıkmasını sağlamak amacıyla üç kez dondurma-çözme işlemi yapılmıştır. Proteinlerin denatüre olmasını engellemek amacıyla 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.

#### **Hüresel Oksidatif Stres Belirteçlerinin (Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçülmesi**

Hücre lizatlarında 4-AP ile oluşturulan nöronal hasarlanma sonrası oksidatif stres belirteçleri üzerine etkilerini değerlendirmek için kolorometrik TOS ve TAS (Rel Assay Diagnostics, Antep, Türkiye) ticari kitleri kullanılmıştır. Üretici tarafından belirlenen aşamalar takip edilerek TOS ve TAS ölçümü gerçekleştirilmiştir.

TOS ölçümü örneklerde bulunan oksidanların, demir iyonunu okside etmesine dayanmaktadır. Bu oksidasyon ortamında bulunan özel renkli bir molekülle kompleks yapar ve turuncu renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Örnekte bulunan oksidan moleküllerinin konsantrasyonu ile orantılı olarak renk koyu turuncuya kaymaktadır. Renk değişikliği 530 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilmekte ve sonuçlar µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/mg protein başına ifade edilmektedir. TAS ölçümü antioksidan varlığında yeşil rengini kaybeden özel bir molekül ile değerlendirilmektedir. Örneklerde bulunan antioksidan konsantrasyonları ile orantılı olarak renkteki açılma hızlanmaktadır. Renk değişikliği, 660 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Sonuçlar µmol Trolox Equiv/mg protein başına ifade edilmektedir.

#### **ER Stres Belirteçlerinin (ATF-4 ve CHOP) Seviyelerinin Ölçümü**

İlaç uygulamasından sonra elde edilen hücre lizatlarından ER stres belirteçleri (ATF-4 ve CHOP) ELISA ticari kitleri (YL Biont, Shanghai, Çin) kullanılarak ölçülmüştür. Üreticinin talimatlarına göre standartlar ve örnekler kuyucuklara eklenip gerekli tüm aşamaların tamamlanmasını takiben mikropalaka 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. Örneklerdeki seviyelerin normalizasyonu için total protein tayini Bradford yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kielkopf ve ark., 2020).

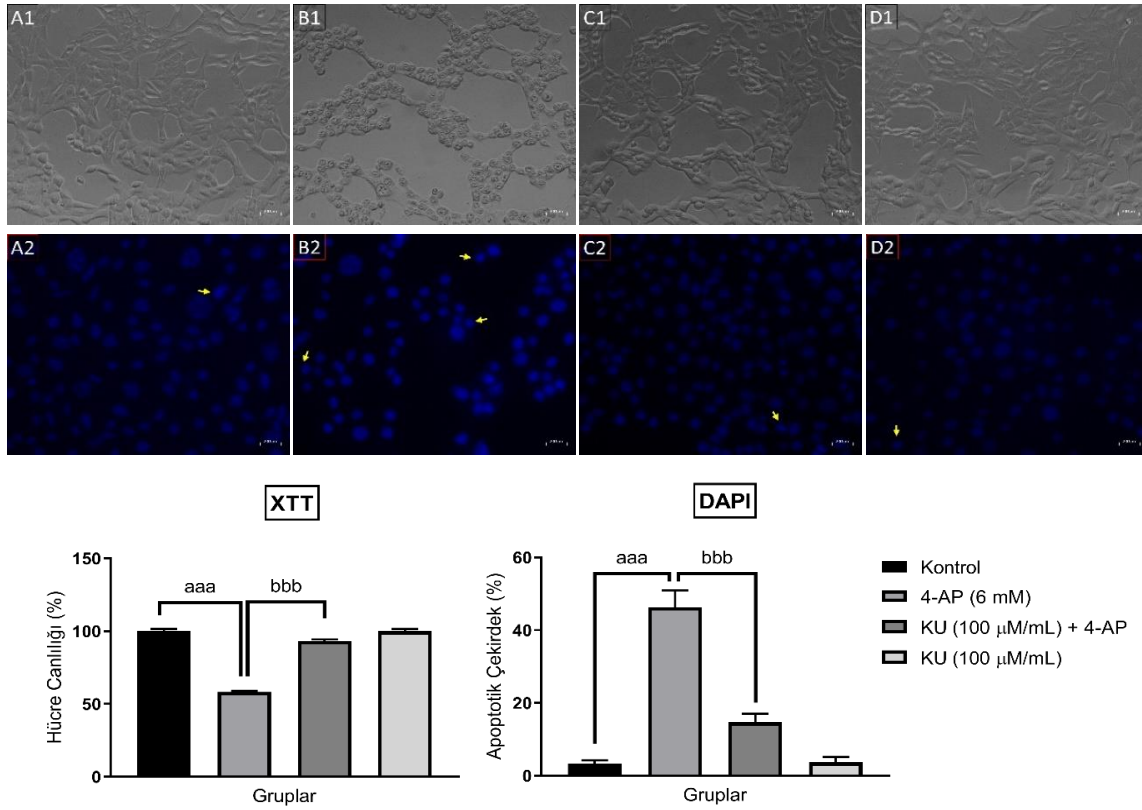
#### **İstatistiksel analiz**

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 22.0 programı kullanılmıştır. Tüm gruplarda ölçülen XTT, AÇD, TOS, TAS, ATF-4 ve CHOP değerlerinin ortalama ± standart hatası (Ort. ± SH) alınarak analiz edilmiştir. 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**

##### **KU'in 4-AP ile Oluşturulan Nöronal Hasar Sonrası Hücre Canlılığı ve AÇD Üzerine Etkisi**

Mevcut çalışmada, hipokampal nöronal hücelerde KU'in 4-AP ile oluşturulan hasar sonrası hücre canlılığı üzerine etkisi XTT testi kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 2. KU'nun 4-AP ile oluşturulan hipokampal nöronal hasarlanma sonrası hücre canlılığı ve AÇD'ler üzerine etkisi. A1, B1, C1 ve D1 farklı gruplarda nöronal hücrelerin 20X'lik büyütmede ışık mikroskopisi altında morfolojik görünümü. A2, B2, C2 ve D2 farklı gruplarda nöronal hücrelerin 40X'lik büyütmede DAPI çekirdek boyaması sonrası floresan mikroskopisi altında morfolojik görünümü. Sarı oklar AÇD lehine yorumlanan çekirdek değişikliklerini göstermektedir. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. <sup>aaa</sup>P<0,001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. <sup>bbb</sup>P<0,001 tek başına 4-AP uygulanan grupla karşılaştırıldığında.

**Figure 2. Effect of QU on cell viability and apoptotic nuclear changes after 4-AP-induced hippocampal neuronal damage.** Morphological appearance of neuronal cells in different groups A1, B1, C1, and D1 under light microscopy at 20X magnification. Morphological appearance of the nucleus of neuronal cells in different groups A2, B2, C2, and D2 under fluorescence microscopy after DAPI nuclear staining at 40X magnification. Yellow arrows indicate apoptotic nuclear changes. Data are presented as mean ± SEM. <sup>aaa</sup>P<0,001 compared to the control group. <sup>bbb</sup>P<0,001 compared to the 4-AP group.

Hipokampal nöronlar öncelikle 3 saat boyunca (100 µM/mL) KU ile ön tedavi işleminden geçirilmiş ve ardından sonraki 3 saat boyunca 6 mM 4-AP ile veya 4-AP'siz inkübasyona bırakılmıştır. Nöronal hücrelerini 3 saat boyunca 4-AP ile inkübasyonu, kontrol'e göre kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır (P < 0,001; Şekil 1). Bununla birlikte, KU'nun tek başına 4-AP ile muamele edilen grupla karşılaştırıldığında hücre canlılığını normale çevirdiği bulunmuştur (P < 0,001; Şekil 1). Bunun yanı sıra tek başına KU'nun, kontrolle kıyasla nöronal hücre canlılığı üzerine toksik bir etkisi gözlemlenmemiştir (P > 0,05; Şekil 2).

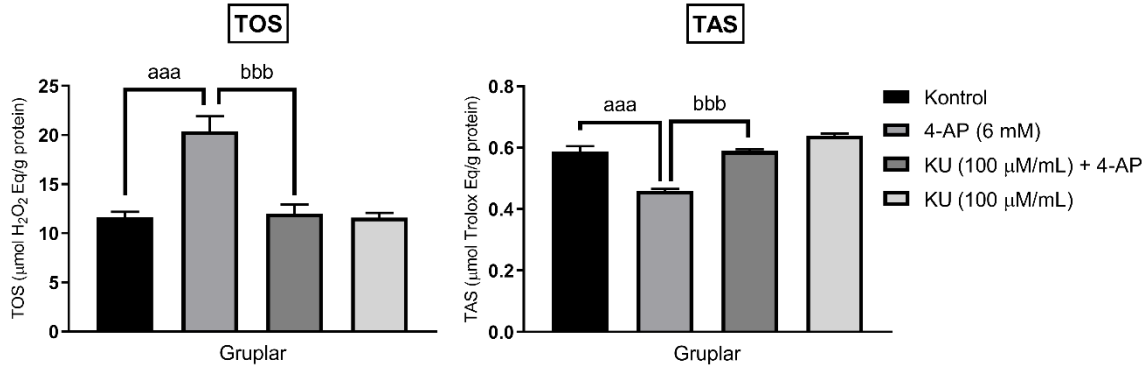
Işık mikroskopisinde elde edilen morfolojik görüntüler değerlendirildiğinde tek başına 4-AP ile muamele edilen hücrelerin hasarlanmaya bağlı hücresel uzantılarını kaybederek yuvarlak bir şekle girdiği belirlenmiştir (Şekil 2; A1-D1). Fakat KU ön tedavisi alan hücrelerin morfolojik yapılarını kontrole benzer şekilde sürdürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 2; A1-D1).

DAPI boyaması açısından değerlendirildiğinde 4-AP ile muamele kontrole kıyasla AÇD'ni anlamlı olarak arttırdığı (P < 0,001; Şekil 2; A2-D2) bunun aksine KU ile ön tedavinin tek başına 4-AP uygulanan grupla kıyaslandığında AÇD sayısını azalttığı bulunmuştur (P < 0,001; Şekil 2; A2-D2). Tek başına KU uygulaması ise AÇD sayısını etkilememiştir (P > 0,05; Şekil 2; A2-D2).

Yapılan birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma KU'nun nöroprotektif etkinliğini göstermiştir (Riche ve Lenard, 2022; Jiang ve ark., 2023; Jiao ve ark., 2023; AbdElrazek ve ark., 2023). Bununla birlikte KU'nun pentilenterazolle oluşturulan nöbetleri azalttığı belirlenmiştir (Tavakoli ve ark., 2023). Buna ek olarak kainik asitle oluşturulan epilepsi modelinde KU'nun nöbet oluşumunu engellediği ve nöbet sonrası nöronal hasarlanmayı azalttığı tespit edilmiştir (Xie ve ark., 2022). Bizim çalışmamızda ise *in vitro* olarak hipokampal hücrelerde 4-AP ile nöbet sonrası nöronal hasarlanma meydana getirildiğinde KU'nun literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde koruyucu etki ortaya koyduğu ve 4-AP sonrası meydana gelen AÇD'ni azalttığı bulunmuştur.

#### **KU'nun 4-AP ile Oluşturulan Nöronal Hasar Sonrası Oksidatif Stres Belirteçleri (TOS ve TAS) Üzerine Etkisi**

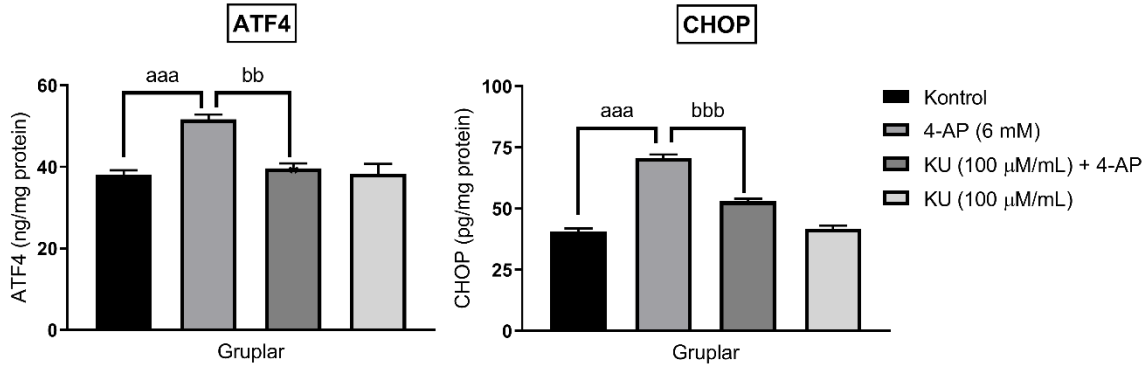
Oksidatif stres belirteçleri olan TOS ve TAS kolorometrik ticari kitler ile belirlenmiştir. Nöronal hücreler 3 saat boyunca 100 µM/mL KU ile muamele edilmiş ve ardından 3 saat boyunca 6 mM 4-AP ile veya 4-AP'siz inkübe edilmiştir. Şekil 2'de ortaya konduğu gibi, tek başına 4-AP'ne maruziyet, kontrol kıyaslandığında nöronal hücrelerinde TOS seviyelerini anlamlı olarak arttırmıştır (P < 0,001; Şekil 3).



Şekil 3. KU'nin 4-AP ile oluşturulan hipokampal nöronal hasarlanma sonrası oksidatif stres belirteçleri (TOS ve TAS) üzerine etkisi.

Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. <sup>aaa</sup>P<0,001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. <sup>bbb</sup>P<0,001 tek başına 4-AP uygulanan grupla karşılaştırıldığında.

Figure 3. Effect of QU on oxidative stress markers (TOS and TAS) after 4-AP-induced hippocampal neuronal damage. Data are presented as mean ± SEM. <sup>aaa</sup>P<0.001 compared to the control group. <sup>bbb</sup>P<0.001 compared to the 4-AP group.



Şekil 4. KU'nin 4-AP ile oluşturulan hipokampal nöronal hasarlanma sonrası ER stresi belirteçleri (ATF-4 ve CHOP) üzerine etkisi.

Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. <sup>aaa</sup>P<0,001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. <sup>bb</sup>P<0,01 ve <sup>bbb</sup>P<0,001 tek başına 4-AP uygulanan grupla karşılaştırıldığında.

Figure 4. Effect of QU on ER stress markers (ATF-4 and CHOP) after 4-AP-induced hippocampal neuronal damage. Data are presented as mean ± SEM. <sup>aaa</sup>P<0.001 compared to the control group. <sup>bb</sup>P<0.01 and <sup>bbb</sup>P<0.001 compared to the 4-AP group.

Bunun aksine, KU ile ön tedavi tek başına 4-AP'ne maruz kalan kıyaslandığında TOS seviyelerini nöronal hücrelerde anlamlı düzeyde azaltmıştır ( $P < 0,001$ ; Şekil 3). Nöronal hücrelerde TAS seviyeleri açısından bakıldığında, 3 saat boyunca tek başına 4-AP'ne maruz bırakmak, kontrole kıyasla hücrel TAS seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür ( $P < 0,001$ ; Şekil 3). Fakat KU ile ön tedavi sonrası 4-AP'ne maruz kalan hücrelerdeki TAS seviyesi, tek başına 4-AP ile muamele gören hücrelerin TAS seviyesine kıyasla önemli ölçüde yükselmiştir ( $P < 0,001$ ; Şekil 3).

OS'in nöbetlerin oluşumunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Aguar ve ark., 2012). Bu nedenle antioksidanlar ile epilepsi için koruyucu yöntemler ve yeni tedaviler geliştirmek hedeflenmiştir (Martinc ve ark., 2014). Bu açıdan güçlü bir antioksidan olan KU dikkat çekmektedir (Rarinca ve ark., 2023). Yapılan çalışmalar KU'nin oksidan sistem üzerindeki etkinliği ortaya çıkarmıştır ve bu etki ile epilepsi için bir hedef molekül haline getirmiştir (Prakash ve ark., 2023). Çalışmamızda bu çalışmalara benzer şekilde fakat farklı bir model ve *in*

*vitro* seviyede KU'nin azalan antioksidan sistemi arttırdığı ve nöronal hasarlanma ile meydana gelen oksidan sistem artışını baskıladığı gösterilmiştir.

#### **KU'nin 4-AP ile Oluşturulan Nöronal Hasar Sonrası ER Stres Belirteçleri (ATF-4 ve CHOP) Üzerine Etkisi**

Hipokampal nöronal hücreler 100 µM/mL KU ile 3 saat boyunca muamele edilmiş ve ardından 3 saat boyunca 6 mM 4-AP ile veya 4-AP'siz inkübe edilmiş ve hücrelerde bir protein ölçüm yöntemi olan ELISA ile ER stres belirteçleri (ATF-4 ve CHOP) ölçülmüştür. Şekil 4'te belirtildiği gibi, tek başına nöronal hücreleri 4-AP'ne maruz bırakmak, kontrole kıyasla hücrel ATF-4 ve CHP seviyelerini önemli ölçüde arttırmıştır ( $P < 0,001$ ; Şekil 4). Fakat hücrelerin KU ile muamele edilmesi tek başına 4-AP'ne maruz kalan nöronal hücrelere göre ATF-4 ve CHOP seviyelerini anlamlı olarak azaltmıştır (ATF-4 için  $P < 0,01$ , CHOP için  $P < 0,001$ ; Şekil 4).

ER stresi sonucu protein katlanma cevabının bozulması epilepsi patofizyolojisinde yer aldığı güncel çalışmalar ışığında ortaya konmuştur (Fu ve ark., 2020). ER stresinin

başlaması ATF4 protein seviyesinin yükselmesi ve bunun sonucu CHOP aktivasyonu ile hücrel apoptoz yolu tetiklenmektedir. Bu durum nöbet sonrası nöronal hasarlanma ile ilişkilendirilmiştir (Fu ve ark., 2020). Bu nedenle ER stresini azaltmak nöbet sonrası hasarlanmayı azaltmak açısından önem arz etmektedir (Liu ve ark., 2019). Çalışmamızda 4-AP ile oluşturulan hipokampal hasarlanma sonrası ER stres proteinleri ATF-4 ve CHOP'un arttığı belirlenmiştir. Bu artışın KU'nin ön tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde çalışmalar KU'nin farklı dokularda ER stresi oluşumunu baskıladığını göstermiştir (İleriturk ve ark., 2022; Boonyong ve ark., 2023).

## Sonuç

Çalışmamızda KU ile ön tedavinin hipokampal hücrelerde 4-AP ile oluşturulan nöronal hasarlanmayı engelleyerek hücre canlılığını arttırdığı gösterilmiştir. Bu nöroprotektif özelliği KU'nin oksidatif stres ve ER stresini baskılayarak gerçekleştirebileceği bulunmuştur. KU'nin sağlıklı ve nörolojik hastalığa yatkın bireylerde takviye olarak kullanılması hastalık risklerini azaltmada faydalı olabileceği düşünülmektedir.

## Teşekkür / Bilgi

Çalışmamızın başarılı bir şekilde yürütülmesi için gerekli olan temel alt yapı ve olanakların sağladığı için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi (CÜTFAM)'ne teşekkür ederiz.

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

## Kaynaklar

- AbdElrazek DA, Ibrahim MA, Hassan NH, Hassanen EI, Farroh KY, Abass HI. 2023. Neuroprotective effect of quercetin and nano-quercetin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in the rat brain: Role of Nrf2/ HO-1/Keap-1 signaling pathway. *Neurotoxicology*, 98:16–28. doi: 10.1016/J.NEURO.2023.06.008
- 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
- Aguiar CC, Almeida AB, Araújo PV, de Abreu RN, Chaves EM, do Vale OC, Macêdo DS, Woods DJ, Fonteles MM, Vasconcelos SM. 2012. Oxidative stress and epilepsy: Literature review. *Oxid Med Cell Longev*. 2012:795259. doi: 10.1155/2012/795259
- Almanza A, Carlesso A, Chintia C, Creedican S, Doultinos D, Leuzzi B, Luis A, McCarthy N, Montibeller L, More S, Papaioannou A, Püschel F, Sassano ML, Skoko J, Agostinis P, de Bellerocche J, Eriksson LA, Fulda S, Gorman AM, Healy S, Kozlov A, Muñoz-Pinedo C, Rehm M, Chevet E, Samali A. 2019. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J*, 286:241–278. doi: 10.1111/FEBS.14608
- Boonyong C, Angkhasirisap W, Kengkoom K, Jianmongkol S. 2023. Different protective capability of chlorogenic acid and quercetin against indomethacin-induced gastrointestinal ulceration. *J Pharm Pharmacol*, 75:427–436. doi: 10.1093/JPP/RGAC098
- Das N, Dhanawat M, Shrivastava S. 2011. An overview on antiepileptic drugs. *Drug Discov Ther*, 6:178–193. doi: 10.5582/DDT.2012.V6.4.178
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 58:39–46. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2003.11.004
- Fu J, Tao T, Li Z, Chen Y, Li J, Peng L. 2020. The roles of ER stress in epilepsy: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Biomed Pharmacother*, 131:110658. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2020.110658
- Gean PW, Chou SM, Chang FC. 1990. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat amygdala neurons: the involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Eur J Pharmacol*, 184:213–221. doi: 10.1016/0014-2999(90)90612-A
- Heuzeroth H, Wawra M, Fidzinski P, Dag R, Holtkamp M. 2019. The 4-aminopyridine model of acute seizures in vitro elucidates efficacy of new antiepileptic drugs. *Front Neurosci*, 13:677. doi: 10.3389/FNINS.2019.00677/FULL
- İleriturk M, Kandemir O, Kandemir FM. 2022. Evaluation of protective effects of quercetin against cypermethrin-induced lung toxicity in rats via oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and endoplasmic reticulum stress pathway. *Environ Toxicol*, 37:2639–2650. doi: 10.1002/TOX.23624
- Islam MS, Quispe C, Hossain R, Islam MT, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Martorell M, Mamurova A, Seilkhan A, Altybaeva N, Abdullayeva B, Docea AO, Calina D, Sharifi-Rad J. 2021. Neuropharmacological Effects of Quercetin: A Literature-Based Review. *Front Pharmacol*, 12:665031. doi: 10.3389/FPHAR.2021.665031/BIBTEX
- Jiang Y, Xie G, Alimujiang A, Xie H, Yang W, Yin F, Huang D. 2023. Protective Effects of Quercetin against MPP+ -Induced Dopaminergic Neurons Injury via the Nrf2 Signaling Pathway. *Front Biosci - Landmark*, 28:42. doi: 10.31083/j.fbl2803042.
- Jiao D, Xu J, Lou C, Luo Y, Ni C, Shen G, Fang M, Gong X. 2023. Quercetin alleviates subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury via inhibiting ferroptosis in the rat model. *Anat Rec (Hoboken)*, 306:638–650. doi: 10.1002/AR.25130
- Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. 2020. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020(4):102269. doi: 10.1101/pdb.prot102269.
- Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. 2006. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*, 13:385–392. doi: 10.1038/sj.cdd.4401778
- Liu DC, Eagleman DE, Tsai NP. 2019. Novel roles of ER stress in repressing neural activity and seizures through Mdm2- and p53-dependent protein translation. *PLOS Genet*, 15:e1008364. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1008364
- Madireddy S, Madireddy S. 2023. Therapeutic Strategies to Ameliorate Neuronal Damage in Epilepsy by Regulating Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroinflammation. *Brain Sci*, 13(5):784. doi: 10.3390/brainsci13050784.
- Manni A, Sun YW, Schell TD, Lutsiv T, Thompson H, Chen KM, Aliaga C, Zhu J, El-Bayoumy K. 2023. Complementarity between Microbiome and Immunity May Account for the Potentiating Effect of Quercetin on the Antitumor Action of Cyclophosphamide in a Triple-Negative Breast Cancer Model. *Pharmaceuticals (Basel)*, 16(10):1422. doi: 10.3390/ph16101422.
- Mansour FR, Abdallah IA, Bedair A, Hamed M. 2023. Analytical Methods for the Determination of Quercetin and Quercetin Glycosides in Pharmaceuticals and Biological Samples. *Crit Rev Anal Chem*, 29:1-26. doi: 10.1080/10408347.2023.2269421.
- Martinc B, Grabnar I, Vovk T. 2014. Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of the Current Status. *Curr Neuropharmacol*, 12:527. doi: 10.2174/1570159X12666140923205715

- Pea F, Tapia R. 2000. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience*, 101:547–561. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00400-0
- 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
- Prakash C, Tyagi J, Rabidas SS, Kumar V, Sharma D. 2023. Therapeutic Potential of Quercetin and its Derivatives in Epilepsy: Evidence from Preclinical Studies. *Neuromolecular Med*, 25:163–178. doi: 10.1007/S12017-022-08724-Z
- Rarinca V, Nicoara MN, Ureche D, Ciobica A. 2023. Exploitation of Quercetin's Antioxidative Properties in Potential Alternative Therapeutic Options for Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(7):1418. doi: 10.3390/ANTIOX12071418
- Riche K, Lenard NR. 2022. Quercetin's Effects on Glutamate Cytotoxicity. *Molecules*, 7;27(21):7620. doi: 10.3390/molecules27217620.
- Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. 2012. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochem Pharmacol*, 83:6–15. doi: 10.1016/J.BCP.2011.08.010
- Sun H, Li X, Guo Q, Liu S. 2022. Research progress on oxidative stress regulating different types of neuronal death caused by epileptic seizures. *Neurol Sci*, 43(11):6279-6298. doi: 10.1007/s10072-022-06302-6.
- Tang SM, Deng XT, Zhou J, Li QP, Ge XX, Miao L. 2020. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomed Pharmacother*, 121:109604. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2019.109604
- Taskiran AS, Ergul M. 2021. The modulator action of thiamine against pentylene-tetrazole-induced seizures, apoptosis, nitric oxide, and oxidative stress in rats and SH-SY5Y neuronal cell line. *Chem Biol Interact*, 340:109447. doi: 10.1016/J.CBI.2021.109447
- Taskiran AS, Ergul M, Gunes H, Ozturk A, Sahin B, Ozdemir E. 2021. The Effects of Proton Pump Inhibitors (Pantoprazole) on Pentylene-tetrazole-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
- Taskiran AS, Tastemur Y. 2021. The role of nitric oxide in anticonvulsant effects of lycopene supplementation on pentylene-tetrazole-induced epileptic seizures in rats. *Exp Brain Res*, 239:591–599. doi: 10.1007/S00221-020-06012-5/FIGURES/6
- Taskiran AS, Ozdemir E, Gumus E, Ergul M. 2020. The effects of salmon calcitonin on epileptic seizures, epileptogenesis, and postseizure hippocampal neuronal damage in pentylene-tetrazole-induced epilepsy model in rats. *Epilepsy Behav*, 113:107501. doi: 10.1016/J.YEBEH.2020.107501
- Tavakoli Z, Tahmasebi Dehkordi H, Lorigooini Z, Rahimi-Madiseh M, Korani MS, Amini-Khoei H. 2023. Anticonvulsant effect of quercetin in pentylene-tetrazole (PTZ)-induced seizures in male mice: The role of anti-neuroinflammatory and anti-oxidative stress. *Int Immunopharmacol*, 116:109772. doi: 10.1016/J.INTIMP.2023.109772
- 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
- Wang G, Wang Y, Yao L, Gu W, Zhao S, Shen Z, Lin Z, Liu W, Yan T. 2022. Pharmacological Activity of Quercetin: An Updated Review. Evidence-based Complement Altern Med, 2022: 3997190. doi: 10.1155/2022/3997190
- Xie R, Zhao W, Lowe S, Bentley R, Hu G, Mei H, Jiang X, Sun C, Wu Y, Yueying L. 2022. Quercetin alleviates kainic acid-induced seizure by inhibiting the Nrf2-mediated ferroptosis pathway. *Free Radic Biol Med*, 191:212–226. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.001.