



# Sinapik Asit HT-22 Hücrelerinde Sisplatin Kaynaklı Toksikiteye Karşı Nöroproteksiyon Sağlar mı?

## Does Sinapic Acid Provide Neuroprotection Against Cisplatin-Induced Toxicity in HT-22 Cells

Betül Çiçek<sup>1</sup>, Sıdıka Genç<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

<sup>2</sup>Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye

### Özet

**Amaç:** Bu çalışmada, HT-22 sıçan hipokampal hücrelerinde meydana gelen sisplatin kaynaklı oksido-inflamatuvar hasara karşı SA'nın yararlı etkilerini ve olası koruyucu mekanizmalarını biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle açıklaması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Öncelikli olarak nöroprotektif etkinlik meydana getirmek amacıyla in vitro koşullar altında HT-22 hücreleri üzerine sisplatin uygulamasından önce farklı konsantrasyonlarda Sinapik asit (SA) (100, 400 ve 800 µM) uygulandı. SA uygulamasından yarım saat sonra kontrol grubu hariç tüm kuyucuklara 5,5 µM sisplatin uygulandı ve 24 saat boyunca uygun koşullar altında inkübe edildi. Hücre canlılığı, rutin olarak kullanılan 3-(4,5-Dimetil Tiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) ile belirlendi ve sitotoksik aktivite, laktat dehidrojenaz (LDH) deneyleri ile belirlendi. Oksidatif stres, toplam antioksidan kapasitesi (TAK), Katalaz (KAT), glutatyon redüktaz (GSH), malondialdehit (MDA) ve süperoksit dismutaz (SOD) tahlilleriyle değerlendirildi. Ayrıca SA'nın HT-22 hücrelerinde Kaspaz-3 gen regülasyonu üzerindeki etkisi Real-Time PCR ile araştırıldı.

**Bulgular:** Sisplatin, HT-22 hücrelerinde hücre canlılığını yaklaşık %40 oranında azalttı ve LDH seviyesini artırdı. SA uygulanan gruplarda ise doz bağımsız olarak hücre canlılığı arttı ve LDH seviyesinde azalma meydana geldi. SA nöroprotektif etkinliğini sisplatinin sitotoksik aktivitesini durdurması ve hücrelerde antioksidan etki mekanizmasını artırarak göstermiştir. Benzer şekilde, sisplatin ile up-regüle olan kaspaz-3 SA uygulaması ile kontrol değerine yaklaşmıştır. SA, sisplatinin nörotoksitesini ortadan kaldırmış, hücre ölümünü ve Oksidatif stres düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır.

**Sonuç:** Bu bulgular SA'nın hem oksidatif stres oluşum mekanizmalarını hem de hücrelerin apoptoz indüksiyonunu engelleyerek HT-22 hücrelerini sisplatin'e karşı koruduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Katalaz; kaspaz-3; oksidatif stres.

### Abstract

**Introduction:** This study aimed to explain the beneficial effects and possible protective mechanisms of SA against cisplatin-induced oxido-inflammatory damage in HT-22 rat hippocampal cells by biochemical and molecular methods.

**Materials and Methods:** Primarily, different concentrations of Sinapic acid (SA) (100, 400 and 800 µM) were applied to HT-22 cells under in vitro conditions before cisplatin application in order to produce neuroprotective activity. Half an hour after the SA application, 5.5 µM cisplatin was applied to all wells except the control group and incubated for 24 hours under appropriate conditions. Cell viability was determined with routinely used 3-(4,5-Dimethyl Thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) and cytotoxic activity was determined by lactate dehydrogenase (LDH) assays. Oxidative stress was evaluated by total antioxidant capacity (TAC), Catalase (CAT), glutathione reductase (GSH), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) assays. In addition, the effect of SA on Caspase-3 gene regulation in HT-22 cells was investigated by Real-Time PCR.

**Results:** Cisplatin decreased cell viability by approximately 40% and increased LDH level in HT-22 cells. In SA administered groups, cell viability increased and LDH level decreased regardless of dose. SA showed its neuroprotective effect by stopping the cytotoxic activity of cisplatin and increasing its antioxidant action mechanism in cells. Similarly, caspase-3 up-regulated by cisplatin approached the control value with SA administration. SA abolished the neurotoxicity of cisplatin and significantly reduced cell death and Oxidative stress levels.

**Conclusion:** These findings show that SA protects HT-22 cells against cisplatin by preventing both oxidative stress formation mechanisms and apoptosis induction of cells.

**Keywords:** Catalase; caspase-3; oxidative stress.

### Giriş

Sisplatin (*cisplatin-CP*) platin bazlı bir kemoterapötik ajandır. Akciğer, mide, yumurtalık, testis, kolorektal ve mesane kanseri gibi birçok solid tümörün tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Yaygın kullanımının aksine

CP vücutta hedefe yönelik hareket etmemektedir. Bu nedenle, kanserli hücelere etki ettiği gibi sağlıklı hücelere de etki ederek klinik kullanımını sınırlayan periferik nöropati, bozulmuş tanıma, titreme ve ataksi şeklinde oldukça önemli nörotoksik yan etkilere sebep olur (2). Oksidatif

stres, DNA hasarı ve mitokondriyal disfonksiyon, proinflatuar sitokinlerin üretiminde artış sispaltinin neden olduğu nörotoksisitede önemli rol oynamaktadır (3). Yapılan bazı klinik ve -\*//=preklinik çalışmalarda sispaltinin bilişsel işlevlerde yetersizlik, öğrenme ve hafıza bozukluğuna neden olduğu rapor edilmiş olmasına rağmen (2,4) sispaltinin hipokampal yapı, biyokimyasal değişiklikler ve bilişsel davranışlar üzerindeki etkileri hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır. Bu nedenle, bu çalışmada, sispaltinin hipokampal hücrelerde ve sıçanlarda proinflatuar sitokinler ve oksidatif stres belirteçleri üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık. Sispaltinin sık kullanılmasıyla oluşan nörotoksik hasarın minimize edilmesiyle ilgili çalışmalar son zamanlarda önemli bir araştırma konusu haline almıştır (5). Antioksidan özelliklerinden dolayı son zamanlarda polifenolik bileşiklerin sispaltinin beyin dokusu üzerindeki toksik etkisini azaltmada yararlı olacağını düşündürmektedir (6). SA, sinamik asidin fenil grubunda 3,5-dimetoksil ve 4-hidroksil yapıları olan hidroksisid amik asitten türetilmiş bir polifenoldür. Yapılan çalışmalarda, SA'nın anti inflamatuar, antioksidan, antibakteriyel, antitümör gibi farmakolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (7). Aynı zamanda, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda lipid peroksidasyonunun artışı stabilize ettiği, oksidatif stresi baskılayarak, hücre apoptozisini önleyerek nöroprotektif etki gösterdiği rapor edilmiştir (7, 8). Fakat SA'nın sispaltinin neden olduğu hipokampal nörotoksisite üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma mevcut değildir. Sispaltin kaynaklı nörotoksisiteye çeşitli mekanizmalar aracılık eder, bu çalışmada sispaltinin HT-22 sıçan hipokampal hücrelerinde neden olduğu oksido-inflatuvar hasara karşı SA'nın yararlı etkilerini ve olası koruyucu mekanizmalarını biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle açıklamaya çalıştık.

## Gereç ve Yöntem

**Kimyasallar ve Reaktifler:** Sispaltin (CAS 15663-27-1), Fosfat tampon solüsyonu (PBS), Dulbecco Modifiye Eagles Medium F12 (DMEM-F12), Fetal Bovin Serum (FBS), DMSO, MTT, Tripsin (EDTA'lı) ve antibiyotik Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) ve Elisa kitleri Elabscience'dan (Houston, ABD) temin edildi. Real Time-PCR ile gen ekspresyonu için gerekli olan primerler ve reaktifler, Roche'dan (Darmstadt, Almanya) temin edildi.

## Hücre Kültürü Deneyleri

**HT-22 hücre kültürü:** Çalışmamız için HT-22 (CVCL\_0321) ATCC'den satın alındı ve kullanılıncaya kadar -196 °C'de saklandı. Deney için kademeli olarak çözdürülen hücreler öncelikle 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Hücreler, taze ortam, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin, amfoterisin B ve streptomisin) ile süspanse edildi ve her analiz için farklı oyuklu plakalara ekim yapıldı. MTT ve LDH aktivite ölçümü deneyleri için 96 ve PCR deneyleri için 6 oyuklu plakalara (Corning, ABD) ekilen hücreler uygun ortam koşulunda inkübatörde (%5 CO<sub>2</sub>; 37 °C) saklandı (9).

**In vitro ilaç uygulaması:** Nöroprotektif etkinliğin oluşmasını sağlamak amacıyla öncelikle farklı konsantrasyonlarda SA (100, 400 ve 800 µM) uygulandı (10). Yarım saat sonra kontrol grubu dışında tüm gruplara 5,5 µM CP uygulandı (11). Optimum koşullarda 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra analizlerin yapılması için çalışma sonlandırıldı (12).

**MTT testi:** 24 saatlik tedaviden sonra, 96 oyuklu plakanın her bir oyuğuna MTT (10 µL) ilave edildi ve plaka, CO<sub>2</sub> inkübatöründe 4 saat inkübe edildi. 4 saat sonra DMSO (100 µL) solüsyonu eklendi (Formazan kristallerini sıvılaştırmak için). Optik yoğunluk, Spektrofotometre okuyucu tarafından 570 nm'de okundu.

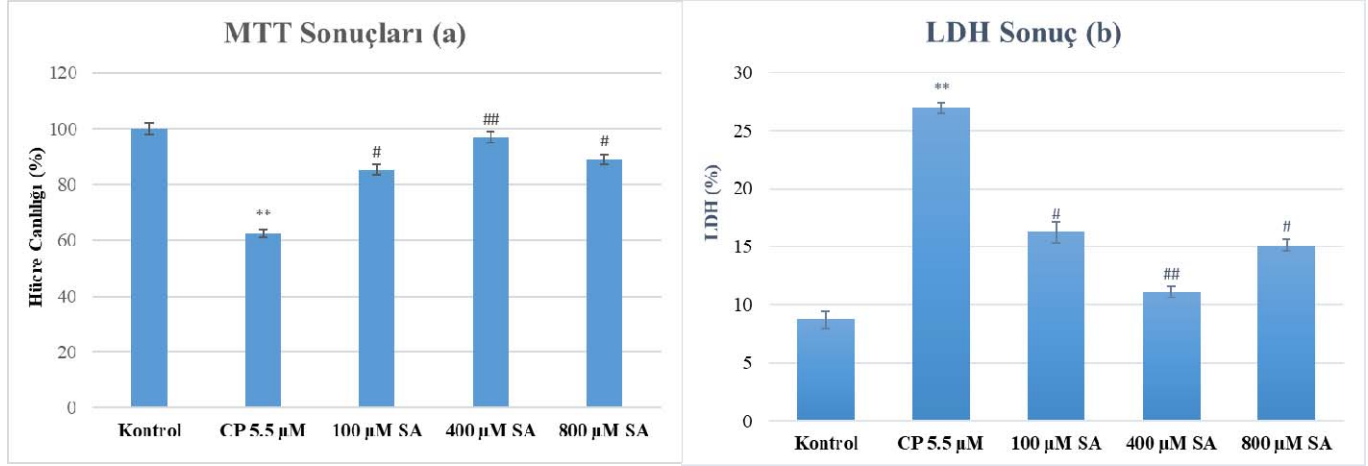
**Laktat dehidrojenaz (LDH):** LDH tespit kitinde LDH düzeyi incelendi. 96 oyuklu plakaya 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> hücre/kuyu yoğunluğunda HT-22 hücreleri 200 µL ortam içinde ekildi ve inkübasyona bırakıldı. Uygulama yapıldıktan 24 saat sonra hücrelerin LDH seviyesi ölçülmesi için inkübatörden alındı. Her konsantrasyon için 6 kuyu hazırlandı. Triton X-100 (%10) ve deney tamponu eklendi ve oyuklar bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Santrifüjden sonra hücre süpernatantı yeni bir 96 oyuklu deney plakasına aktarıldı. Her bir oyuğa LDH reaksiyon çözeltisi ilave edildi ve plaka, bir orbital çalkalayıcı üzerinde hafifçe çalkalanarak 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edildi. 490 nm'de absorbans OD değerini ölçmek için bir mikropilaka okuyucu kullanıldı (13).

## Biyokimyasal Analizler

**Toplam antioksidan kapasitesi (TAK):** TAK seviyeleri spektrofotometrik olarak ölçüldü (Multiskan™ GO Mikropilaka Spektrofotometre okuyucusu). Rengin yoğunluğu, ticari kit talimatlarına göre numunedeki oksidan ve antioksidanların sayısı ile ilgilidir.

**Tablo 1:** Spesifik primerlerin gen dizilimi

Gene	Forward	Reverse
$\beta$ -actin	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'
Caspaz 3	5'CAGTGGAGGCCGACTTCTTG3'	5'ATCCAGTCGCTTTGTGCCA3'



**Şekil 1.** Uygulama Grubunun MTT Sonuçları (a). Uygulama Grubunun LDH aktivitesi Sonuçları (b). Veriler, ortalama  $\pm$  SD olarak belirtilmiştir. \*\* p < 0.01 değerleri kontrol grubu için çok önemlidir #: p < 0.05; ##: p < 0.001 CP için

**Katalaz (CAT), glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  testi analizi:** CAT, GSH, MDA ve SOD, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  analizleri ELISA kitleri (Elabscience, ABD) ile tespit edildi. ELISA analizleri üreticinin talimatlarına göre yapılmıştır. Absorbans, 450 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü.

**Real-Time PCR:** Toplam RNA, Yüksek Saf RNA İzolasyon Kiti (Roche Mannheim Almanya) ile ekstre edildi. Hücreler, mutlak metanol ile çıkarıldı. Roche (Darmstadt, Almanya) tarafından üretilen RT-PCR (AMW) için Yüksek Kapasiteli tek iplik cDNA Sentez Kiti ve spesifik primerler kullanarak gerçek zamanlı bir Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gerçekleştirdik. Kullanılan genlerin dizileri Tablo 1'de listelenmiştir (Roche; Darmstadt, Almanya) Sonuçlar SA (100, 400 ve 800  $\mu$ g/mL), CP (pozitif kontrol) ve kontrol grubu (sağlıklı hücreler) arasındaki bağıl ifade değişiklikleri kat değişiklikleri olarak ifade edildi.  $\Delta\Delta$ Ct yöntemini kullanarak hedef genlerin ekspresyonunu beta-aktin (referans kontrol geni) olarak normalleştirdik (14).

**Etik Onam:** Bu çalışmada etik onama gerek yoktur

**İstatistiksel Analiz:** Deneylerden elde edilen veriler SPSS (v26.0, Illinois, US) ile analiz edildi. Tüm veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edilir. Deney grupları arasındaki farklılıklar, One-Way ANOVA, Tukey HSD ile karşılaştırıldı. 0.05'ten küçük P değerleri anlamlı kabul edildi.

## Sonuç

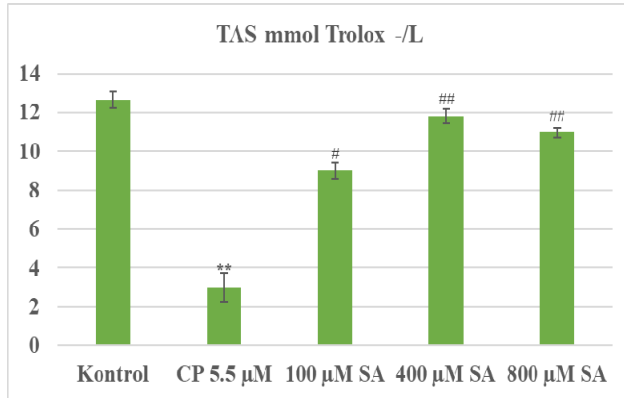
**MTT Test Sonuçları:** 24 saatlik uygulama sonrası tüm grupların sitotoksikite sonuçları MTT testi ile ortaya konuldu ve hücre canlılığı grafiği Şekil 1a'da gösterildi. Kontrol grubunda (negatif kontrol) hücre canlılığı 100 olarak kabul edildi. CP 5.5  $\mu$ M grubunda 24 saat sonunda bu oran %62.47 olarak bulundu. Hücre canlılığı CP 5.5  $\mu$ M grubunda önemli ölçüde azaldı (p < 0.001). Bu canlılığın yaklaşık %40 azalması, sispaltinin sitotoksik etkisini kanıtlar niteliktedir. SA 100  $\mu$ M canlılık oranı %85.31 olarak bulundu (p < 0.05). 24 saat sonra en yüksek hücre canlılık oranı SA 400  $\mu$ M grubunda 97.01 olarak bulundu (p < 0.001). Yaptığımız incelemede SA tüm dozlarda etkili bir tedavi seçeneği sunmuştur. Fakat en belirgin nöroprotektif etkinlik 400  $\mu$ M konsantrasyonunda tespit edilmiştir. 400  $\mu$ M SA tedavisi sispaltinin sitotoksik etkisini elimine etmiş neredeyse kontrol grubuna yaklaştırmıştır.

**LDH Sonuçları:** LDH nekrotik hücreler tarafından salındığından, hücre canlılığının mükemmel bir metabolik belirteçidir. SA ile tedavinin HT-22 hücrelerinin LDH aktivitesi üzerindeki etkisi, bir LDH kiti kullanılarak belirlendi (Şekil 1b). Standardın %'si olarak ifade edilen (%100 olarak gösterilen) tedavi edilen hücrelerin LDH aktivitesi Şekil 1b'de gösterilmektedir. CP 5.5  $\mu$ M grubunda LDH düzeyi %26.96 olarak gözlemlendi ve kontrol grubuna göre anlamlı bulundu (p < 0.01). Nöroprotektif

aktivite için, CP 5.5 µM uygulamasından önce SA uygulanan gruplarda LDH düzeyi doza bağlı olarak kademeli olarak azaldı. En anlamlı sonuç 400 µM SA konsantrasyonunun LDH seviyesinde olmuştur. Bu grupta LDH seviyesi 10.29 olarak bulunmuş ve kontrol grubuna (8.73) yaklaştığı, CP sitotoksik etkisine karşı hücreleri koruduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte diğer iki konsantrasyon grubunda da LDH seviyesi önemli ölçüde azalmıştır ( $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$ ). Bu veriler bize SA'nın sisplatinin sitotoksik etkisini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir.

### SA ile Tedavi Edilen HT-22 Hücrelerinde Redoks Durumu

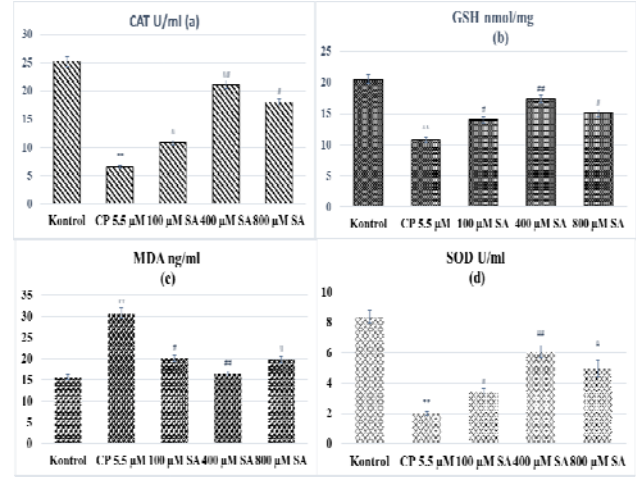
**TAK sonuçları:** Spektrofotometrik olarak belirlenen HT-22 hücrelerinin kontrol grubunda TAK değeri 12.66 mmol Trolox eşdeğeri/L, CP 5.5 µM grubundaki TAK değeri 2.99 mmol Trolox eşdeğeri/L idi (Şekil 3.). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sisplatin hücresel antioksidan aktiviteyi azalttı ve hücreleri sitotoksisteye yönlendirdi ( $p < 0.01$ ). SA ile hücrelerin antioksidan aktivitesi önemli ölçüde artmıştır. TAK değeri SA 100 µM grubunda 8.99 mmol Trolox eşdeğeri/L, SA 400 µM grubunda 11.815 ve 800 µM grubunda ise 10.97mmol Trolox eşdeğeri/L olarak bulundu. (Şekil 2). TAK değeri 400 µM grubunda kontrol grubuna en yüksek düzeyde yaklaşmıştır.



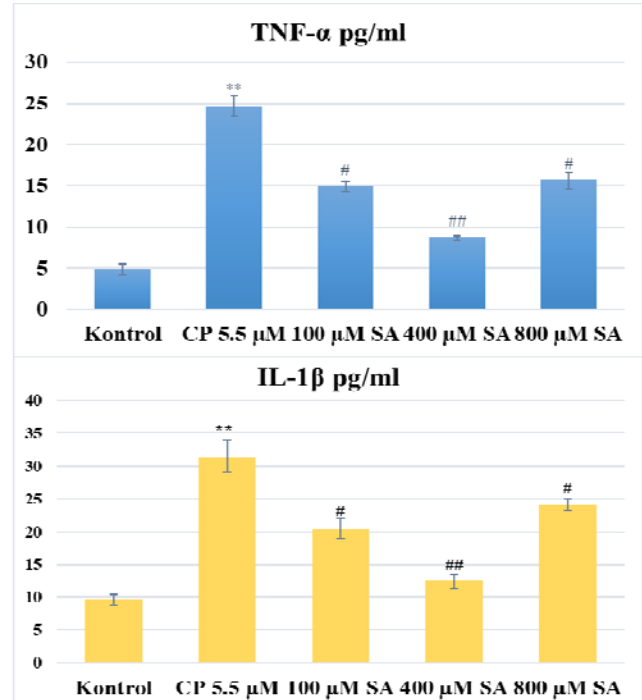
**Şekil 2.** Uygulama Grubunun TAK Sonuçları. Veriler, ortalama  $\pm$  SD olarak belirtilmiştir. \*\*  $p < 0.01$  değerleri kontrol grubu için çok önemlidir #:  $p < 0.05$ ; ##:  $p < 0.001$  CP için çok önemlidir.

**CAT, GSH, MDA ve SOD:** Şekil 3'te görüldüğü gibi CP 5.5 µM grubunda CAT, GSH ve SOD seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, MDA seviyeleri anlamlı olarak arttı ( $p < 0.001$ ). CP 5.5 µM grubuna göre artan konsantrasyon nedeniyle SA grubunda CAT, GSH ve SOD aktiviteleri artarken, MDA seviyeleri anlamlı olarak azaldı ( $p < 0.001$ ). Sisplatin

uygulaması ile azalan antioksidan aktivitesi SA gruplarında normal seviyeye gelmiştir. Bulgular hem TAK hem de MTT ve LDH verilerini desteklemektedir (Şekil 3).



**Şekil 3.** Uygulama Grubunun CAT, GSH, MDA ve SOD Sonuçları. Veriler, ortalama  $\pm$  SD olarak belirtilmiştir. \*\*  $p < 0.01$  değerleri kontrol grubu için çok önemlidir #:  $p < 0.05$ ; ##:  $p < 0.001$  CP için çok önemlidir.

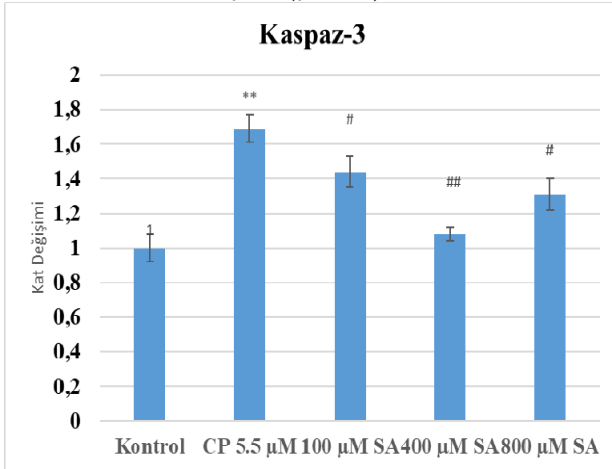


**Şekil 4.** Uygulama Grubunun TNF-α ve IL-1β Sonuçları. Veriler, ortalama  $\pm$  SD olarak belirtilmiştir. \*\*  $p < 0.01$  değerleri kontrol grubu için çok önemlidir #:  $p < 0.05$ ; ##:  $p < 0.001$  CP için çok önemlidir.

**SA ile Tedavi Edilen HT-22 Hücrelerinde İnflamasyon Durumu:** IL-1β ve TNF-α, çok sayıda inflamatuvar hastalığının gelişimine aracılık eder ve IL-1β tipik olarak TNF-α'nın üretildiği

durumlarda aktive olur. Elde ettiğimiz sonuçlara göre sisplatin uygulaması ile hücrelerde ciddi bir şekilde IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyesinde artış meydana gelmiştir (24.49 pg/ml) ( $p < 0.01$ ). SA uygulaması hücrel inflomasyonu azaltmıştır. Bu azalış doz-bağımsızdır ve en anlamlı sonuç SA 400  $\mu$ M grubunda elde edilmiştir. Elde edilen bulgular diğer sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir (Şekil 4). Uygulama Grubunun TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  Sonuçları. Veriler, ortalama  $\pm$  SD olarak belirtilmiştir. \*\*  $p < 0.01$  değerleri kontrol grubu için çok önemlidir #:  $p < 0.05$ ; ##:  $p < 0.001$  CP için çok önemlidir.

**Real-Time PCR Sonuçları:** Kaspaz-3 geninin gen ekspresyonu, 24 saatlik uygulama sonrasında Real-Time-PCR analizi ile ölçülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları CP 5.5  $\mu$ M 'in Kaspaz-3 ekspresyonunu önemli ölçüde yukarı düzenlediğini gösterdi ( $p < 0.01$ ). Spesifik olarak, 1. 69 katlık bir artış, sisplatinin HT-22 hücrelerinde indüklenen apoptotik faktörlerin en önemli göstergelerinden biridir. SA, doz değişiminden bağımsız olarak hücrelerde meydana gelen apoptotik uyarıyı geri döndermiştir ve Kaspaz-3 aktivitesini down-regüle etmiştir böylece hücreleri sisplatinin apoptotik etkisinden korumuştur (Şekil 5).



**Şekil 5.** Uygulama Grubunun Kaspaz-3 Gen Regülasyonu Sonuçları, ortalama  $\pm$  SD olarak belirtilmiştir. \*\*  $p < 0.01$  değerleri kontrol grubu için çok önemlidir #:  $p < 0.05$ ; ##:  $p < 0.001$  CP için çok önemlidir.

## Tartışma

Bu çalışmada SA'nın HT-22 hücrelerinde sisplatinle indüklenen hipokampal nöronal hasara karşı etkisi biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle araştırıldı. Sisplatinin oluşturduğu nörotoksititeyi MTT redüksiyonu, LDH salınımı yöntemlerini kullanarak değerlendirdiğimizde 24 saatin sonunda

5.5  $\mu$ M sisplatinin kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı ölçüde toksisiteye neden olduğunu tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan sisplatinin nöronal hücre canlılığı üzerine toksik etkilerini destekler niteliktedir (2). SA'nın sisplatinin neden olduğu hipokampal toksisiteyi önemli ölçüde azalttığını tespit ettik. Literatürlerde, SA'nın hipokampal hücrelerde sisplatin ilişkili nörotoksik hasara karşı koruyucu etkisine ait bilgilere rastlanmadı. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda sisplatinin beyin dokusunda serbest radikal artışına neden olarak oksidatif hasara ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (3,15). MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak, lipid peroksidasyonunun oluşturduğu hasarı daha da şiddetlendirir (16, 17). Çalışmamızda sisplatin uygulanan hücrelerde yüksek MDA düzeyleri bulunmuş olması bulgularımızın literatür bilgileri ile uyumlu olduğu göstermektedir. Ayrıca bozulmuş redoks dengesinin sisplatin ilişkili nöronal toksisite ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (18, 19). Bu yüzden çalışmamızda antioksidan kapasitenin önemli göstergeleri olan SOD, GSH, CAT ve TAK düzeylerine sisplatinin etkisi araştırıldı. Bulgularımızdan görüldüğü üzere sisplatin uygulaması sonucu hipokampal hücrelerde MDA artışına paralel olarak SOD, GSH, CAT ve TAK düzeylerinde belirgin bir azalış tespit edilmiştir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda sisplatinin hipokampus dokusunda antioksidan enzim düzeylerini ve total antioksidan kapasiteyi önemli oranda azalttığı rapor edilmiştir (2, 20). SA'nın HT-22 hücrelerinde sisplatin ilişkili MDA artışı ve SOD, GSH, CAT ve TAK düzeylerindeki azalışı anlamlı olarak baskılamıştır. Verma ve ark. sıçanlarda oluşturdukları Alzheimer hastalığı modelinde SA'nın antioksidan enzim düzeylerini artırarak ve MDA artışını önleyerek hipokampus dokusunu oksidatif stresten koruduğu göstermiştir (7). Mevcut çalışmanın sonuçları da önceki yapılan çalışmaları destekleyerek, SA'nın antioksidan özelliği sayesinde hipokampus dokusunu oksidatif hasara karşı koruduğunu düşündürmektedir. Literatürde hipokampus hasarında serbest radikal üretimindeki artışın nöronal hücrelerde TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimine tetikleyerek nöro inflamasyonu hızlandırdığı bildirilmiştir (2, 3). Çalışmamızda hipokampal hücrelerde TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerinin sisplatin ile artış gösterdiği bulundu. Cankara ve ark. tarafından (2) yapılan çalışmada HT-22



hücrelerinde sisplatin uygulaması sonucu oksidatif stresi takiben TNF- $\alpha$  ve IL-6 proinflatuar düzeylerinde önemli artış olduğu bildirilmiştir. SA uygulamasının, TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerini sisplatin grubuna göre anlamlı ölçüde azaltması sisplatin ilişkili hipokampal inflamasyonu antogonize ettiğini işaret etmektedir. Literatürde SA'nın proinflatuar sitokin salınımı baskılayarak nörodejenerasyonu azalttığı bildirilmiştir (21). Shahmohamady ve ark. (22) SA'nın TNF- $\alpha$  inflamatuvar sitokinlerin artışını inhibe ederek hipokampal dokudaki inflamasyonu iyileştirdiğini göstermiştir. Sisplatinin neden olduğu hipokampal toksisitede oksidatif stresin apoptozu indüklediği gösterilmiştir (14). Aynı zamanda sisplatinin hipokampüste neden olduğu yüksek TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerinin apoptoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (23). Çalışmamızda sisplatinin hipokampal hücrelerde mitokondriyal apoptotik yol ile ilgili önemli bir bileşen olan kaspaz-3 ekspresyon düzeyinde önemli bir artışa neden oldu. Yapılan in vivo çalışmalarda hipokampus dokusunda kaspaz-3 mRNA düzeyinin önemli oranda arttığı bildirilmiştir (2). Ayrıca Binnetoglu ve ark. (24) tarafından yapılan çalışmada primer nöron kültüründe sisplatin toksisitesi nedeniyle kaspaz-3, 9 ve TNF alfa ekspresyon seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda SA uygulaması, sisplatinin neden olduğu kaspaz-3 artışını anlamlı baskılamıştır. Bu bulgularımız literatürde nörodejeneratif hastalıklarda artan kaspaz-3 seviyesinin, SA tarafından azaltıldığını gösteren çalışmaları desteklemektedir (25).

## Sonuç

Sonuç olarak bu çalışma ile HT-22 hipokampal hücrelerde sisplatinin neden olduğu nörotoksistenin önlenmesinde SA etkili bir molekül olduğu düşünülmektedir. SA'nın sisplatin toksisitesine karşı HT-22 hücrelerinde canlılığını koruduğu ve oksido-inflatuar hasarı azaltarak mitokondriyal intrensek yolak üzerinden apoptozu azaltmaktadır. Fakat SA'nın bu nöroprotektif özelliklerine ilişkin moleküler temellerinin açıklığa kavuşturulması ve in vitro çalışmalarına ek olarak daha ileri in vivo ve klinik çalışmalarına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

**Etik Onam:** Bu çalışmanın yapılması ve yürütülmesinde canlı kullanılmadığı için etik onaya gerek duyulmamaktadır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarların bu çalışma ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

**Finansal Destek:** Bu çalışma için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

**Yazar Katkıları:** Konsept (BC, SG), Tasarım (BC, SG), Veri Toplama ve/veya İşleme (BC, SG), Analiz ve/veya Yorumlama (BC, SG)

## Kaynaklar

1. Ranasinghe R, Mathai ML, Zulli A. Cisplatin for cancer therapy and overcoming chemoresistance. *Heliyon* 2022; e10608.
2. Cankara F, Günaydın C, Çelik ZB, Şahin Y, Pekgöz Ş, Erzurumlu Y ve ark. Agomelatine confers neuroprotection against cisplatin-induced hippocampal neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 2021; 36(2): 339-349.
3. Abdel-Wahab WM, Moussa FI. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Des Devel Ther* 2019; 13: 1155.
4. Huo X, Reyes TM, Heijnen CJ, Kavelaars A. Cisplatin treatment induces attention deficits and impairs synaptic integrity in the prefrontal cortex in mice. *Sci Rep* 2018; 8(1): 1-11.
5. Dos Santos NAG, Ferreira RS, Dos Santos AC. Overview of cisplatin-induced neurotoxicity and ototoxicity, and the protective agents *Food Chem Toxicol* 2020; 136: 111079.
6. Stankovic JSK, Selakovic D, Mihailovic V, Rosic G. Antioxidant supplementation in the treatment of neurotoxicity induced by platinum-based chemotherapeutics—a review. *Int. J Mol Sci* 2020; 21(20): 7753.
7. Verma V, Singh D. Sinapic acid alleviates oxidative stress and neuro-inflammatory changes in sporadic model of Alzheimer's disease in rats. *Brain Sci* 2020; 10(12): 923.
8. Tungalag T, Yang DK. Sinapic acid protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells against 6-Hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Biomedicines* 2021; 9(3): 295.
9. Altinoz MA, Yilmaz A, Taghizadehghalehjoughi A, Genc S, Yeni Y, Gecili I et al. Ulipristal-temozolomide-hydroxyurea combination for glioblastoma: in-vitro studies. *J Neurosurg Sci* 2022;35766205.
10. Eroğlu C, Avcı E, Vural H, Kurar E. Anticancer mechanism of Sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *Gene* 2018; 671: 127-134.

11. Cankara FN, Günaydın C, Çelik ZB, Şahin Y, Pekgöz Ş, Erzurumlu Y et al. Agomelatine confers neuroprotection against cisplatin-induced hippocampal neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 2021;36;339–349.
12. Wang XL, Lin FL, Xu W, Wang C, Wang QQ, Jiang RW. Silybin B exerts protective effect on cisplatin-induced neurotoxicity by alleviating DNA damage and apoptosis. *J Ethnopharmacol* 2022;288: 114938.
13. Çomaklı S, Sevim Ç, Kontadakis G, Doğan E, Taghizadehghalehjoughi A, Özkaraca M, Aschner M et al. Acute glufosinate-based herbicide treatment in rats leads to increased ocular interleukin-1 $\beta$  and c-Fos protein levels, as well as intraocular pressure. *Toxicol Rep* 2019; 6: 155-160
14. Yeni Y, Cakir Z, Hacimuftuoglu A, Taghizadehghalehjoughi A, Okkay U, Genc S et al. A Selective Histamine H4 Receptor Antagonist, JNJ7777120, Role on glutamate Transporter Activity in Chronic Depression. *J Pers Med* 2022; 12(2):246.
15. Majd NE, Shahraki R, Tabandeh MR, Hosseinifar S. Protective effects of Aloe vera gel on cisplatin-induced oxidative stress, apoptosis and neurons structure in rat hippocampus. *Vet Res Forum* 2022; 13(1); 111.
16. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014; 360438.
17. Almutairi MM, Alanazi WA, Alshammari MA, Alotaibi MR, Alhoshani AR, Al-Rejaie SS et al. Neuro-protective effect of rutin against Cisplatin-induced neurotoxic rat model. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17(1): 1-9.
18. Kandeil MA, Mahmoud MO, Abdel-Razik ARH, Gomaa SB. Thymoquinone and geraniol alleviate cisplatin-induced neurotoxicity in rats through downregulating the p38 MAPK/STAT-1 pathway and oxidative stress. *Life sciences* 2019; 228:145-151.
19. Gupta P, Makkar TK, Goel L, Pahuja M. Role of inflammation and oxidative stress in chemotherapy-induced neurotoxicity. *Immunol Res* ,2022; 70(6):725-741.
20. Kumburovic I, Selakovic D, Juric T, Jovicic N, Mihailovic V, Stankovic JK et al. Antioxidant Effects of Satureja hortensis L. Attenuate the Anxiogenic Effect of Cisplatin in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 29:8307196.
21. Bais S, Kumari R, Prashar Y. Ameliorative Effect of Trans-Sinapic Acid and its Protective Role in Cerebral Hypoxia in Aluminium Chloride Induced Dementia of Alzheimer's Type. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2018;17(2):144-154.
22. Shahmohamady P, Eidi A, Mortazavi P, Panahi N, Minai-Tehrani D. Effect of sinapic acid on memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Pol J Pathol* 2018; 69(3): 266-277.
23. Manohar S, Jamesdaniel S, Salvi R. Cisplatin inhibits hippocampal cell proliferation and alters the expression of apoptotic genes. *Neurotox Res* 2014; 25(4): 369-80.
24. Binnetoglu D, Hacimuftuoglu A, Aricioglu F. Neuroprotective effects of agmatine in antineoplastic drugs induced neurotoxicity: In vitro study. *Life Sci* 2019; 221:311-318.
25. Tungalag T, Yang DK. Sinapic acid protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells against 6-Hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Biomedicines* 2021; 9(3): 295.