

# Hidralazinin SH-SY5Y hücre hattında PTZ ile indüklenen nörotoksisite üzerindeki nöroprotektif etkisinin araştırılması

## Investigation of the neuroprotective effect of hydralazine on PTZ-induced neurotoxicity in the SH-SY5Y cell line

 Said Yasin Şimşek<sup>1</sup>,  
 Ahmet Turan İnce<sup>2</sup>,  
 Fatih Yulak<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem 2, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem 3, Sivas, Türkiye

<sup>3</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

<sup>4</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi, Sivas, Türkiye

### Corresponding author:

Said Yasin Şimşek, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dönem 2, Sivas, Türkiye

### E-mail:

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

Received/Accepted: January 2021

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

### How to Cite

Simsek, S. Y., Ince, A. T., Yulak, F. (2021). Hidralazinin SH-SY5Y hücre hattında PTZ ile indüklenen nörotoksisite üzerindeki nöroprotektif etkisinin araştırılması. Health Sciences Student Journal, 1(1), 1-6. <https://hssj.cumhuriyet.edu.tr/hidralazin-sh-sy5y-hucre-hattinda-ptz-ile-induklenen-norotoksisite-uzerindeki-noroprotektif-etkisinin-arastirilmesi/>

### ÖZET

**Amaç:** Akut nöbet, bir grup kortikal nöronun aşırı ve senkronize deşarjlarına bağlı olarak ortaya çıkan ve klinikte gelip geçici olmakla birlikte hipokampusta nöron kaybına neden olan önemli bir nörolojik rahatsızlıktır. Oksidatif stres, nöbet sonrası meydana gelen hipokampal hasarlanmada etkin role sahiptir. Bu çalışmanın amacı, SH-SY5Y hücre hattında pentilentetrazol (PTZ) ile oluşturulan akut nöbet modeline hidralazin uygulayarak sinir koruyucu etkilerini araştırmaktır.

**Yöntem:** SH-SY5Y hücre kültüründe kontrol grubu, PTZ grubu, hidralazin grubu ve hidralazin+PTZ grubu olmak üzere 4 grup planlanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken hidralazin+PTZ grubuna çeşitli konsantrasyonlarda (6.25; 12.5; 25; 50 ve 100 µg/ml) hidralazin uygulanıp 24 saat sonra PTZ uygulanmıştır. XTT hücre canlılığı testi ile ilacımızın toksisite üzerine etkisi belirlenmiştir. Hücre süpernatantlarındaki doku TOS konsantrasyonları otomatik test yöntemi ile ölçülmüştür. Analizin verimliliği için hidrojen peroksit kullanılmıştır.

**Bulgular:** XTT hücre canlılığı sonuçları değerlendirildiğinde, hidralazin, toksisite oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde sinirsel (nöronal) canlılığı etkilememiştir. Ek olarak, hidralazin TOS seviyeleri üzerinde de kayda değer bir etki yapmamıştır ( $P>0.05$ ).

**Sonuçlar:** Elde edilen veriler, çalıştığımız dozlardaki hidralazinin, PTZ ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattı nörotoksisitesinde sinir koruyucu etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hidralazin, nörotoksisite, PTZ, SH-SY5Y hücre hattı.

### ABSTRACT

**Objective:** Acute seizure is an important neurological disorder that occurs due to excessive and synchronized discharges of a group of cortical neurons and causes neuronal loss in the hippocampus, although it is clinically temporary. Oxidative stress has an effective role in hippocampal damage that occurs after seizures. The aim of this study is to investigate the neuroprotective effects of hydralazine in an acute seizure model created with pentylenetetrazole (PTZ) in the SH-SY5Y cell line.

**Method:** In the SH-SY5Y cell culture, 4 groups were planned as control group, PTZ group, hydralazine group and hydralazine + PTZ group. While no application was made to the control group, hydralazine was applied to the hydralazine + PTZ group at various concentrations (6.25; 12.5; 25; 50 and 100 µg / ml) and PTZ was applied 24 hours later. The effect of our drug on toxicity was determined by XTT cell viability test. Tissue TOS concentrations in cell supernatants were measured by the automated test method. Hydrogen peroxide was used for the efficiency of the analysis.

**Results:** When evaluating XTT cell viability results, hydralazine did not affect neuronal viability in toxicity induced SH-SY5Y cells. In addition, hydralazine did not have a significant effect on TOS levels ( $P>0.05$ ).

**Conclusions:** The data obtained showed that hydralazine at the doses we studied did not have a neuroprotective effect on the SH-SY5Y cell line neurotoxicity induced by PTZ.

**Keywords:** Hydralazine, neurotoxicity, PTZ, SH-SY5Y cell line.

## GİRİŞ

Akut nöbet, ILAE (Tedavide kanıta dayalı etkinlik sınıflaması tablosu) tarafından; metabolik, toksik, yapısal, enfeksiyöz ve de inflamatuvar sebeplerle gerçekleşmiş akut santral sinir sistemi (SSS) hasarı ile yakından ilişkili, geçici nöbet olarak tanımlanmıştır<sup>1</sup>.

Nöbetlerin patofizyolojisinde oksidatif stresin rolünün değerlendirilmesi, uygun terapötik stratejileri tanımlamak için çok önemlidir. Antioksidan ve nöroprotektif işlevi olan bileşenler, antiepileptik özelliklerle ilişkili olduğundan nöbetler üzerine olumlu etkiler gösterir. Sık görülen akut nöbet olayı, epilepsili hastalarda hafıza ve öğrenme kapasitesini önemli ölçüde azaltır<sup>2</sup>. Pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen nöbetlerin kemirgenlerde hafıza bozukluğuna neden olabileceği gösterilmiştir<sup>3</sup>. Hipokampus ve korteks hem hafıza hem de öğrenme üzerinde etkilidir. Akut nöbetler, hücrelere kalsiyum akışını artırarak nöron ölümüne yol açar. Böylelikle beyin nörodejenerere olur, özellikle hipokampüste ve bilgi depolayan değişken sinapsların işlevini değiştirir. Bu, nöbetin ardından gözlemlenen öğrenme bozukluğunun bir ifadesi olabilir<sup>4,5</sup>.

Akut nöbetlerdeki temel mekanizmaları açıklamak için deneysel akut nöbet toksisite modelleri yapılmıştır. PTZ, GABA-A reseptörünün seçici bir antagonisti olan deneysel nöbetler oluşturmak için kullanılan kimyasal bir ajandır. PTZ, nöronal membran üzerinde olumsuz etkilere neden olur, kalsiyum ve potasyum kanallarını etkiler, hücre içi kalsiyum iyon rezervlerini serbest bırakır ve nörotransmitter kaynaklı klorür iletkenliğini azaltır. Bu model klinik olarak temporal lob nöbetine ve kompleks parsiyel

nöbete bir cevap olarak kabul edilir<sup>6,7</sup>. Hidralazin hipertansiyon tedavisinde kullanılan kimyasal ajanlardan biridir. Oral ve intravenöz formu bulunmaktadır. İntravenöz formu acil durumlarda kan basıncını düşürmek için kullanılmaktadır. Hidralazinin oral formu ise sempatik reflekse neden olması nedeniyle primer olarak kullanılmamaktadır. Fakat dirençli vakalarda diğer antihipertansiflerle kombine olarak kullanılmaktadır<sup>8</sup>.

Taşkıran ve ark. tarafından yapılan çalışmada hidralazinin oksidatif stres hasarına karşı koruyucu olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir<sup>9</sup>. Fakat PTZ ile oluşturulan *in vitro* toksisite üzerine etkisi ve mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, hidralazinin, SH-SY5Y hücre hattında PTZ ile indüklenen nörotoksisite üzerindeki sinir koruyucu etkisini araştırmaktır.

## YÖNTEM ve BULGULAR

### *In vitro* Çalışmalar

#### *Hücre kültürü*

SH-SY5Y (CRL-2266) hücre hattı, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan temin edildi ve % 10'luk Fetal Sığır Serumunu (FBS) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), % 1'lik penisilin/streptomisin (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA) ve % 1'lik L-glutamin içeren DMEM'de (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kültüre edildi. Uygun koşullar sağlanarak inkübatörde (37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş atmosfer) bekletildi. Hidralazin ve pentilentetrazol (PTZ), DMEM (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO,

USA) içinde çözüldü ve muameleden önce stok çözeltileri hazırlandı.

### *Hücre canlılık değerlendirmesi*

Hücre canlılığı, XTT testi (Roche Diagnostic, MA, USA) kullanılarak değerlendirildi. Başlangıçta SH-SY5Y hücreleri, oyuk başına 100 µL DMEM içinde  $1 \times 10^4$  hücre yoğunluğunda 96 oyuklu plaklara ekildi ve işlemde önce gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, hidralazinin nöroprotektif etkisini değerlendirmek için dört farklı hücre grubu hazırlandı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. PTZ grubundaki hücreler 24 saat 30 mM PTZ ile uygulama yapıldı. Hidralazin grubundaki hücreler, 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (6.25; 12.5; 25; 50 ve 100 µg/ml) hidralazin ile muamele edildi. Hidralazin + PTZ grubundaki hücreler, 1 saat süreyle çeşitli konsantrasyonlarda (6.25; 12.5; 25; 50 ve 100 µg/ml) hidralazin ile işleme tabi tutuldu ve sonra 24 saat boyunca 30 mM PTZ uygulandı. İnkübasyondan sonra 96'lı plaka çıkarılıp oyuklar fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara fenol kırmızısı içermeyen 100 µL DMEM ve 50 µL XTT solüsyonu ilave edildi ve ardından plakalar 4 saat 37 °C'de tutuldu. Numunelerin absorbansı, 450 nm'de bir ELISA mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kullanılarak tespit edildi. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirildi ve hücre canlılığı, kontrol grubuna (tedavi uygulanmamış hücreler) kıyasla canlı hücre yüzdeleri olarak ölçüldü.

### *Hücre homojenatlarının hazırlanması*

Hücreler, steril tüplerde toplanıp 900 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Daha sonra süpernatantlar çıkarılıp hücrelerin bileşenleri, hücre konsantrasyonunun hücre

süspansiyonunu (yaklaşık 1 milyon/mL) seyreltmek için PBS (pH 7.4) kullanılarak süspense edildi. Hücreler, hücrelerin iç bileşenlerinin dışarı atılması için tekrarlanan dondurma-çözme döngüleri ile hasarlandı ve 4 °C sıcaklıkta 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatantlar, total oksidan seviye (TOS) ticari kiti (Real Assay Kit Diagnostics, Antep, Türkiye) kullanılarak total oksidan (TOS) durumunun biyokimyasal analizi için toplandı. Örneklerdeki toplam protein seviyelerini belirlemek için Bradford protein deney kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı.

### *TOS ölçümü*

Hücre süpernatantlarındaki doku TOS konsantrasyonları, Erel'in otomatik test yöntemi ile ölçüldü<sup>10</sup>. Bu yöntem ile ortamda yeterli miktarda oksidan mevcut olduğunda ferröz ( $Fe^{+2}$ ) demir iyonları ferrik ( $Fe^{+3}$ ) demir iyonlarına oksitlendiğinden, ksilenol orange kullanımıyla ferrik ( $Fe^{+3}$ ) demir iyonlarının doku seviyelerini ölçerek TOS analizinin yapılmasını sağlar. Analizin verimliliği için hidrojen peroksit kullanıldı<sup>3</sup>. Testin sonuçları, miligram doku proteini başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğerleri (µmol  $H_2O_2$  Eq/mg protein) olarak ifade edildi.

### **İstatistiksel analiz**

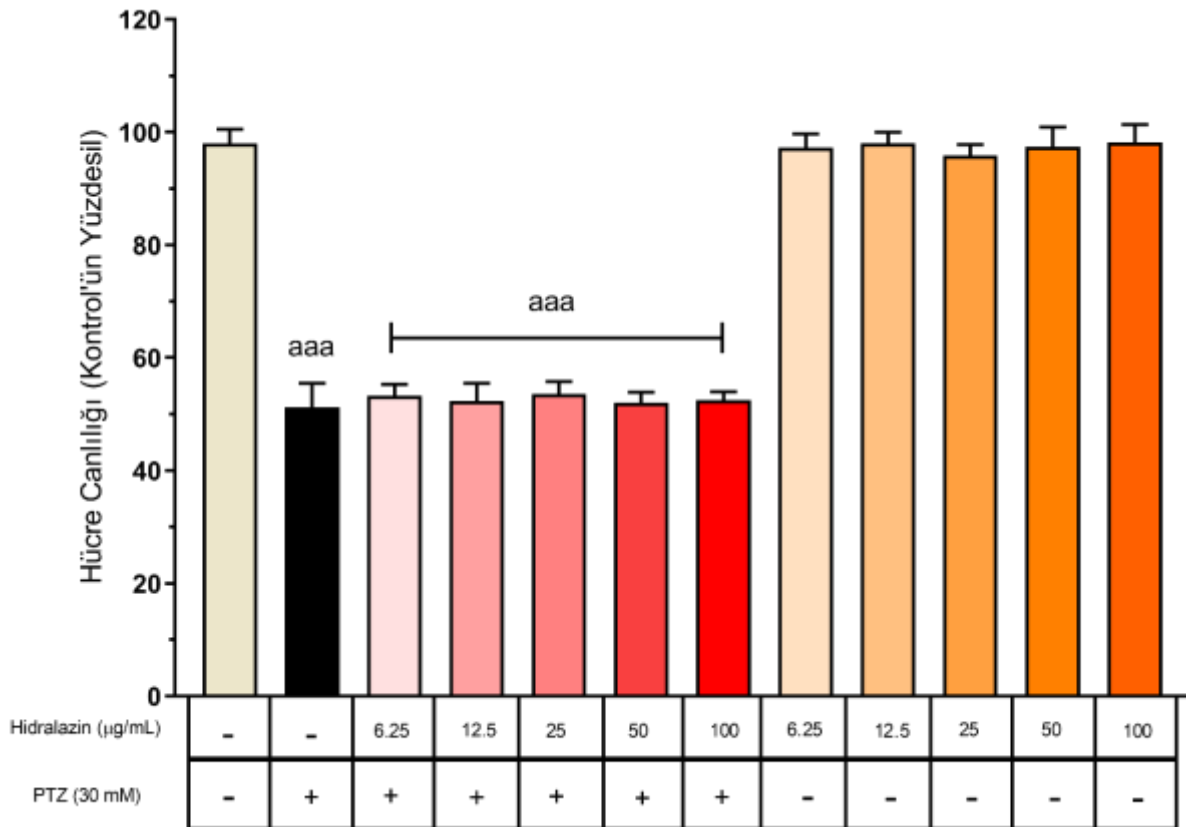
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. Veri analizleri, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için Newman Tukey testi kullanıldı.

## SONUÇLAR

### *PTZ ile nörotoksisite oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde hidralazinin hücre canlılığı üzerine etkileri*

Hidralazinin PTZ ile indüklenen SH-SY5Y hücre toksisitesi üzerindeki nöroprotektif etkilerini değerlendirmek için bir XTT hücre canlılığı testi yapıldı. Önceki çalışmalarda SH-SY5Y hücrelerindeki PTZ'nin IC50 değeri 30 mM olarak bulunmuş ve çalışmamızda bu değer kullanılmıştır<sup>7</sup>. Şekil 1'de sunulduğu gibi, sabit PTZ (30 mM) konsantrasyonu, kontrole kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır (<sup>aaa</sup> $P < 0.001$ ). Hidralazin 6.25 - 100 µg/ml konsantrasyonlarda nöroprotektif etki göstermemiştir ( $P > 0.05$ ).

Ek olarak, 6.25 µg/ml dozunda hidralazin uygulaması, SH-SY5Y hücrelerinde uygulanan diğer hidralazin dozlarına kıyasla en az nörotoksisiteyi göstermiştir (Şekil 1). Farklı dozlarda hidralazin uygulaması yapıldığında, PTZ ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerinin hücre canlılığında önemli farklılık görülmemiştir. 100 µg/ml dozla hidralazin uygulamasında en yüksek SH-SY5Y hücre canlılığı olması beklenmiştir. Bununla birlikte, bu dozda, SH-SY5Y hücreleri en az hücre canlılığını göstermiştir. Ek olarak, PTZ uygulaması olmaksızın hücrelerde farklı hidralazin konsantrasyonları ile uygulama yapılan kontrol grubu ve SH-SY5Y hücrelerinin yaşayabilirliğinde önemli bir fark görülmemiştir ( $P > 0.05$ ).

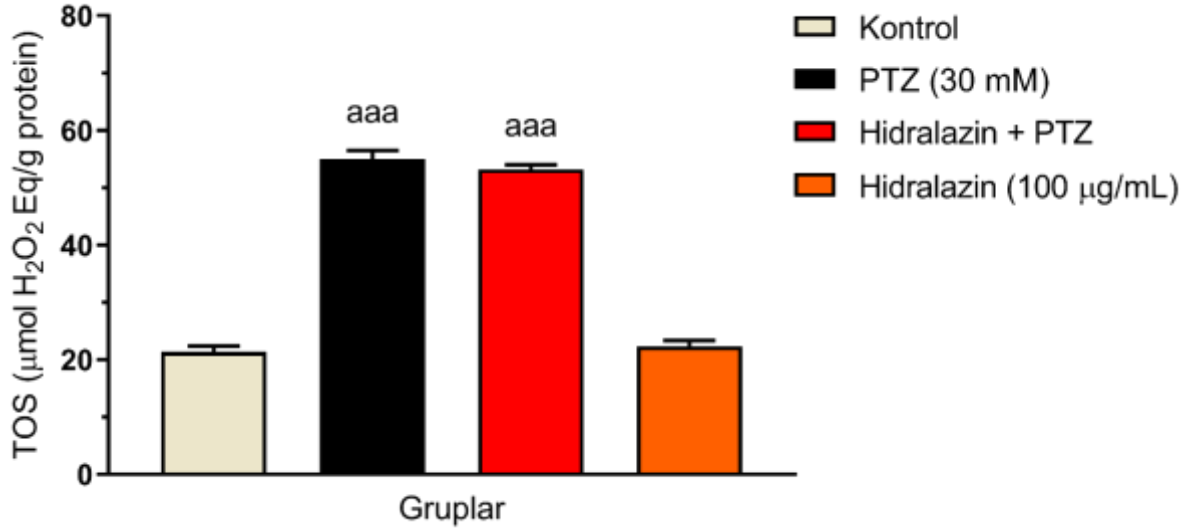


**Şekil 1.** SH-SY5Y hücrelerinde PTZ'nin neden olduğu nörotoksisiteden sonra hidralazinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Değerler ortalama  $\pm$  SD olarak sunulmuştur (<sup>aaa</sup> $P < 0.001$ ).

### PTZ sebebiyle nörotoksisite oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde hidralazinin TOS değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücrelerinde TOS ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. SH-SY5Y hücrelerinde TOS, kontrole kıyasla sadece PTZ ile uygulama yapılan hücrelerde

önemli ölçüde artmıştır (<sup>aaa</sup> $P < 0.001$ ; Şekil 2). Tek başına hidralazin, SH-SY5Y hücrelerinde TOS düzeyinde kayda değer bir etki göstermemiştir ( $P > 0.05$ ). 100  $\mu\text{g/mL}$ 'lik bir dozda hidralazin uygulaması, PTZ ile indüklenen nörotoksisiteden sonra SH-SY5Y hücrelerinde TOS üzerinde önemli bir etki yapmamıştır ( $P > 0.05$ ).



**Şekil 2.** Hidralazinin, SH-SY5Y hücrelerinde PTZ kaynaklı nörotoksisiteden sonra TOS üzerindeki etkileri. Değerler ortalama  $\pm$  SD olarak sunulmuştur (<sup>aaa</sup> $P < 0.001$ ).

### TARTIŞMA

Hidralazin 1950'den önce araştırmacılar tarafından geliştirildi, FDA tarafından antihipertansif tedavisi için onaylanmıştır<sup>11</sup>. Hidralazinin etkisi arterlerde yer alan kas grubunun relaksasyonu sonucu vazodilatasyona neden olarak gösterilmektedir<sup>7</sup>. Hidralazinle ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, bir çalışmada hidralazinin serebral enfarktüse karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir<sup>12</sup>. Bununla birlikte akrolein ile oluşturulan miyelin hasarı modelinde, hidralazinin motor fonksiyonu koruyucu ve tedavi edici özelliğe sahip olduğu ortaya konmuştur<sup>13</sup>. Ayrıca dopaminerjik nöronlarda *in vitro* olarak oluşturulan deneysel Parkinson

modelinde hidralazinin koruyucu etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir<sup>14</sup>.

Yapılan bu çalışmalara rağmen hidralazinin PTZ sebebiyle ortaya çıkan nörotoksisiteye etkisi henüz araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda da bu konu ele alınmıştır.

Mevcut çalışma sonuçlarımız, hidralazin uygulaması PTZ ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerinin hücre canlılığında önemli farklılıklar olmadığını gösterdi.

Belirli bir dozda hidralazin uygulaması, SH-SY5Y hücrelerindeki PTZ'nin neden olduğu nörotoksisitede TOS düzeyinde önemli bir etki yapmadı.



## KAYNAKLAR

1. Çalışma, E., Moderatörleri, G., Naz, S., Prof, Y., & Gürses, C. (n.d.). *Epilepsi Çalışma Grubu Tanı ve Tedavi Rehberi 2015 TÜRK NÖROLOJİ DERNEĞİ 2015*.
2. Taskiran, A. S., Ergul, M., Gunes, H., Ozturk, A., Sahin, B., & Ozdemir, E. (2020). 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. *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00956-6>
3. Lamberty, Y., & Klitgaard, H. (2000). Consequences of Pentylene-tetrazole Kindling on Spatial Memory and Emotional Responding in the Rat. *Epilepsy and Behavior*, 1(4), 256–261. <https://doi.org/10.1006/ebch.2000.0085>
4. Bolterman, R. J., Manriquez, M. C., Ortiz Ruiz, M. C., Juncos, L. A., & Romero, J. C. (2005). Effects of captopril on the renin angiotensin system, oxidative stress, and endothelin in normal and hypertensive rats. *Hypertension*, 46(4), 943–947. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000174602.59935.d5>
5. Ramos, S. F., Mendonça, B. P., Leffa, D. D., Pacheco, R., Damiani, A. P., Hainzenreder, G., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Guerrini, R., Calo, G., Gavioli, E. C., Boeck, C. R., & De Andrade, V. M. (2012). Effects of neuropeptide S on seizures and oxidative damage induced by pentylene-tetrazole in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.001>
6. Potschka, H. (2012). Animal models of drug-resistant epilepsy. *Epileptic Disorders*, 14(3), 226–234. <https://doi.org/10.1684/epd.2012.0532>
7. kalantaripour, T. pari, Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Najafipour, H., & Asadi-Shekaari M, M. (2017). Apelin-13 protects rat primary cortical glia-neuron co-culture against pentylene-tetrazole-induced toxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 87, 661–668. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.131>
8. McComb, M. N., Chao, J. Y., & Ng, T. M. H. (2016). Direct Vasodilators and Sympatholytic Agents. In *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 21, Issue 1, pp. 3–19). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1074248415587969>
9. Taşkıran, A , Ergül, M . (2021). The Protective Effect of Hydralazine against Hydrogen Peroxide (H2O2)-Induced Oxidative Damage in C6 Glial Cell Line . *Turkish Journal of Science and Health*, 2(1) , 8-15 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tfsd/issue/60096/787868>
10. Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37(2), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014>
11. Guo, X., Han, C., Ma, K., Xia, Y., Wan, F., Yin, S., Kou, L., Sun, Y., Wu, J., Hu, J., Huang, J., Xiong, N., & Wang, T. (2019). Hydralazine Protects Nigrostriatal Dopaminergic Neurons From MPP+ and MPTP Induced Neurotoxicity: Roles of Nrf2-ARE Signaling Pathway. *Frontiers in Neurology*, 10(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00271>
12. Fujii, K., Weno, B. L., Baumbach, G. L., & Heistad, D. D. (1992). Effect of antihypertensive treatment on focal cerebral infarction. *Hypertension*, 19(6), 713–716. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.19.6.713>
13. Shi, R., Page, J. C., & Tully, M. (2015). Molecular mechanisms of acrolein-mediated myelin destruction in CNS trauma and disease. *Free Radical Research*, 49(7), 888–895. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1021696>
14. Mehrabani, M., Nematollahi, M. H., Esmaili, M., Bahrapour, K., Abolhassani, M., Sharifi, A. M., Pasban, H., Saravani, M., & Mirzamohammadi, S. (2020). Protective effect of Hydralazine on a cellular model of Parkinson's disease: a possible role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1α. *Biochemistry and Cell Biology*, 1–34. <https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0117>