

# Seftriaksonun C6 Glioma Hücre Hattında Glutamat Eksitotoksitesisi Üzerine Etkisinin Araştırılması

## Investigation of the effect of seftriaxone on glutamate excitotoxicity in the C6 glioma cell line

 Zeynep EKİCİ<sup>1</sup>,

 Fatih YULAK<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dönem 3, Sivas,  
Türkiye

<sup>2</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi  
Tıp Fakültesi, Fizyoloji  
Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

<sup>3</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi  
(CÜTFAM), Sivas, Türkiye

### Corresponding author:

Fatih YULAK, Sivas Cumhuriyet  
Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji  
Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

### E-mail:

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

Received/Accepted: Jan 2022

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

### How to Cite

Ekici, Z., Yulak, F. (2022).

Seftriaksonun C6 Glioma Hücre  
Hattında Glutamat

Eksitotoksitesisi Üzerine

Etkisinin Araştırılması. *Health*

*Sciences Student Journal*, 2(1), 1-  
6.

<https://www.healthssj.com/seftriaksonun-c6-glioma-hucre-hattinda-glutamat-eksitotoksitesisi-uzerine-etkisinin-arastirilmesi/>

### ÖZET

Glutamat merkezi sinir sisteminin en önemli eksitator nörotransmitter maddesi olup sinaptik plastisite, öğrenme, hafıza ve diğer bilişsel işlevleri içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Glutamat beyin fonksiyonlarında önemli rol oynamasına rağmen merkezi sinir sistemindeki yüksek konsantrasyona ulaşması nörotoksik etkisinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Alzheimer, Parkinson, Huntington, Epilepsi ve Multiple Skleroz gibi çeşitli nörolojik hastalıkların patogeneğinde glutamat eksitotoksitesisi önemli rol oynamaktadır. Bir 3. kuşak sefalosporin grubu beta laktam antibiyotik olan seftriaksonun sinir sistemi üzerine olumlu etkileri çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. Fakat glutamat eksitotoksitesisi üzerine etkisi henüz aydınlatılmamıştır. Bizim bu çalışmadaki amacımız C6 glioma hücre hattında seftriaksonun glutamat eksitotoksitesisi üzerine etkisinin incelenmesi olacaktır.

C6 glioma hücre kültüründe kontrol grubu, glutamat grubu, seftriakson grubu ve seftriakson+glutamat grubu olmak üzere 4 grup planlanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken seftriakson+glutamat grubuna çeşitli konsantrasyonlarda (200, 100, 50, 25, 12,5 µM) seftriakson uygulanıp 24 saat sonra glutamat uygulanmıştır. XTT hücre canlılığı testi ile ilacımızın toksisite üzerine etkisi belirlenmiştir. Hücre süpernatantlarındaki TAS ve TOS konsantrasyonları ticari kit protokolü takip edilerek belirlendi. Sonuçlar TAS ve TOS için sırasıyla mmol Trolox Equiv./L ve µmolH2O2 eşdeğer/L olarak sunuldu.

XTT hücre canlılığı testi sonuçlarına göre, seftriakson, eksitotoksisite oluşturulan C6 glioma hücrelerinde hücre canlılığını etkilememiştir ve TAS ve TOS seviyeleri üzerinde de anlamlı bir etki göstermemiştir (P>0,05).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerde seftriaksonun glial hücreleri glutamatın toksik etkisinden koruyamadığı sonucu elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** C6 glioma, Eksitotoksisite, Glutamat, Sefalosporin, Seftriakson.

### ABSTRACT

Glutamate is the most important excitatory neurotransmitter substance of the central nervous system and plays an important role in various physiological processes including synaptic plasticity, learning, memory and other cognitive functions. Although glutamate plays an important role in brain functions, its high concentration in the central nervous system causes its neurotoxic effect. Glutamate excitotoxicity plays an important role in

the pathogenesis of various neurological diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, epilepsy and multiple sclerosis. The positive effects of ceftriaxone, a 3rd generation cephalosporin group beta-lactam antibiotic, on the nervous system have been shown in various studies. However, its effect on glutamate excitotoxicity has not been clarified yet. Our aim in this study will be to examine the effect of ceftriaxone on glutamate excitotoxicity in C6 glioma cell line.

In C6 glioma cell culture, 4 groups were planned as control group, glutamate group, ceftriaxone group and ceftriaxone+glutamate group. While no application was made to the control group, ceftriaxone at various concentrations (200, 100, 50, 25, 12.5 µM) was applied to the ceftriaxone+glutamate group and glutamate was administered 24 hours later. The effect of our drug on toxicity was determined by the XTT cell viability test. TAS and TOS concentrations in cell supernatants were determined following the commercial kit protocol. Results are presented as mmol Trolox Equiv./L and µmolH2O2 equivalent/L for TAS and TOS, respectively.

According to the XTT cell viability test results, ceftriaxone did not affect cell viability in C6 glioma cells with excitotoxicity and did not show a significant effect on TAS and TOS levels (P>0.05).

In the data we obtained from our study, it was concluded that ceftriaxone could not protect glial cells from the toxic effect of glutamate.

**Keywords:** C6 glioma, Cephalosporin, Ceftriaxone, Excitotoxicity, Glutamate.

## GİRİŞ

Merkezi sinir sisteminin en önemli uyarıcı nörotransmitteri olarak kabul edilen glutamat, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza dahil olmak üzere birçok bilişsel işlevin düzenlenmesinde çok kritik bir role sahiptir.<sup>1</sup> Glutamat, merkezi sinir sisteminde milimolar konsantrasyonlar da bulunur.<sup>2</sup> Sinaptik aktivite, sinaptik yarıktaki glutamat konsantrasyonunda bir artışa yol açar, ancak hücre dışı glutamat konsantrasyonu, glutamat taşıyıcıları tarafından glutamat alımı ile korunur.<sup>3</sup> Glutamat beyin fonksiyonları için gerekli olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonu nörotoksik etkisine neden olur.<sup>4</sup> Aşırı glutamat salınımı sonucu, glutamat reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonunun neden olduğu kalsiyum yüklenmesi eksitotoksisiteye yol açar ve bu durum nörodejenerasyonda önemli bir role sahiptir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artışa yanıt olarak proteaz aktivasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve reaktif oksijen türlerinde bir artış meydana gelir ve bu da nöronal hücre ölümünü tetikler.<sup>4</sup> Astroglial hücreler, merkezi sinir sisteminde homeostazı sağlayan, nöronları destekleyen ve koruyan nöronal olmayan hücrelerdir. Ayrıca glial hücrelerin aktivasyonu, nöronal hücreleri yok eden nöroinflamasyon ve oksidatif strese neden olur.<sup>5</sup> Bu nedenle glial hücrelerin hasarlanması başta Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı olmak üzere nörodejeneratif bozuklukların gelişmesinde önemli rol oynar.<sup>6</sup> Özellikle aşırı hücre dışı glutamat sadece nöronları değil astroglial hücreleri de bozar.<sup>7</sup> İlerleyici nöropatolojik süreçlerin altında yatan neden olan glial ve nöronal hücre ölümü, hücre içi artmış oksidatif stres tarafından indüklenir.<sup>8</sup> Artan glutamat konsantrasyonu, glutatyon sente-

zini inhibe eder ve aşırı serbest radikal oluşumuna yol açarak oksidatif strese neden olur.<sup>9</sup> Dolayısıyla glutamat kaynaklı toksisite, Huntington, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynar. Nöronal hücrelerin glutamat kaynaklı eksitotoksisiteye karşı korunması, yukarıda bahsedilen nörodejeneratif hastalıklara karşı etkili bir terapötik yaklaşım olabilir.<sup>10</sup>

Seftriakson, klinikte bakteriyel enfeksiyonları ve menenjit tedavisi için kullanılır ve çalışmalar,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin (seftriakson gibi) GLT-1 ekspresyonunu artırabildiğini ve nöroprotektif etkileri olduğunu göstermektedir.<sup>11</sup> Seftriakson, GLT-1'in ekspresyonunu ve fonksiyonunu düzenler, hücre dışı glutamatı azaltır ve nihayetinde potansiyel glutamat eksitotoksitesini hafifletmektedir.<sup>12</sup>

Seftriaksonun glutamat kaynaklı eksitotoksisite ve altta yatan mekanizmalar üzerindeki etkisi henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada, C6 glial hücrelerinde glutamat kaynaklı sitotoksisiteye karşı seftriaksonun etkisi araştırılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Hücre Kültürü

C6 (CCL-107) hücre hattı, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan temin edildi ve %10'luk Fetal Sığır Serum (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 F12K midyum'da (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kültüre edildi. Uygun koşullar sağlanarak inkübatörde (37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş atmosfer) bekletildi. Seftriakson ve

glutamat, F12K (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 C6 hücreleri, kuyucuk başına 100 µL DMEM içinde  $1 \times 10^4$  hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve işlemiden önce gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, seftriaksonun nöroprotektif etkisini değerlendirmek için dört farklı hücre grubu hazırlandı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Glutamat grubundaki hücreler 24 saat 10 mM glutamat ile uygulama yapıldı. Seftriakson grubundaki hücreler, 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (200, 100, 50, 25, 12,5 µM) seftriakson ile muamele edildi. Seftriakson + glutamat grubundaki hücreler, 1 saat süreyle çeşitli konsantrasyonlarda (200, 100, 50, 25, 12,5 µM) seftriakson ile işleme tabi tutuldu ve sonra 24 saat boyunca 10 mM glutamat uygulandı. İnkübasyondan sonra 96'lı plaka çıkarılıp kuyucuklar 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 4 saat boyunca 37 °C'de tutuldu. Grupların absorbansı, 450 nm'de bir ELISA mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kullanılarak ölçüldü. Tüm deneyler üç kez tekrarlandı 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 süpernatant kısımları uzaklaştırıldı ve hücre

konsantrasyonu yaklaşık 1 milyon/mL olacak şekilde PBS (pH 7,4) kullanılarak resüspanse edildi. Hücrelerin iç bileşenlerinin dışarı atılması için tekrarlanan dondurma-çözme döngüleri ile hücreler parçalandı ve 4 °C sıcaklıkta 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatantlar, total oksidan seviyesi (TOS Real Assay Kit Diagnostics, Antep, Türkiye) ve total antioksidan seviyesi (TAS Real Assay Kit Diagnostics, Antep, Türkiye) ticari kiti kullanılarak TAS ve TOS durumunun biyokimyasal analizi için toplandı. Örneklerdeki toplam protein seviyelerini belirlemek için Bradford protein deney kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı.

### TAS ve TOS seviyelerinin ölçülmesi

Grupların TAS ve TOS değerleri, sırasıyla Total Antioksidan Seviyesi Ölçüm kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) ve Total Oksidan Seviyesi Ölçüm kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar TAS ve TOS için sırasıyla mmol Trolox Eşdeğeri/L ve µmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eşdeğeri/L olarak sunuldu.

### İstatistiksel analiz

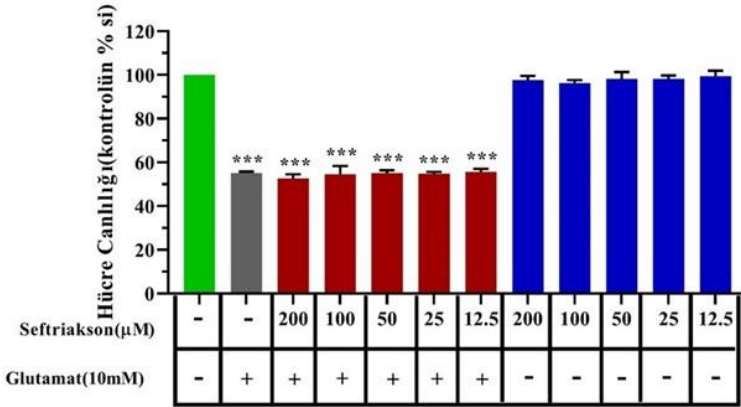
Sonuçlar, ortalama ± SEM olarak ifade edildi. Veri analizleri Windows için SPSS Sürüm 23.0 ile yapılmıştır. Veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için post hoc Tukey testi kullanıldı.

## SONUÇLAR

### Glutamat ile eksitotoksisite oluşturulmuş C6 glioma hücrelerinde seftriaksonun hücre canlılığı üzerine etkileri

Seftriaksonin glutamat ile indüklenen C6 glioma hücre toksisitesi üzerindeki nöroprotektif etkilerini değerlendirmek için bir XTT hücre canlılığı testi yapıldı. Önceki

çalışmalarda C6 glioma hücresindeki glutamatın IC50 değeri 10 mM olarak bulunmuş ve çalışmamızda bu değer kullanılmıştır.<sup>13</sup> Şekil 1'de sunulduğu gibi, sabit glutamat (10 mM) konsantrasyonu, kontrole kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı (\*\*P<0,001, şekil 1). Seftriakson 12,5-200 µM konsantrasyonlarda nöroprotektif etki göstermedi (P>0,05). Farklı dozlarda seftriakson uygulaması yapıldığında, glutamat ile indüklenen C6 glioma hücrelerinin hücre canlılığında önemli farklılık görülmemiştir. Ek olarak, glutamat uygulaması olmaksızın hücrelerde farklı seftriakson konsantrasyonları ile uygulama yapılan kontrol grubu ve C6 glioma hücrelerinin yaşayabilirliğinde önemli bir fark görülmedi (P>0,05).

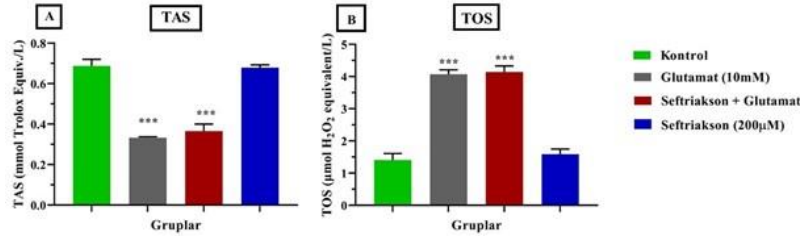


**Şekil 1.** C6 glioma hücrelerinde glutamatın neden olduğu eksitotoksisteden sonra seftriaksonun hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Değerler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (\*\*P<0,001).

### Glutamat ile eksitotoksiste oluşturulmuş C6 glioma hücrelerinde seftriaksonun TAS ve TOS üzerine etkisinin değerlendirilmesi

C6 glioma hücrelerinde TAS ve TOS ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. C6 glioma hücrelerinde TAS kontrole kıyasla sadece glutamat ile uygulama yapılan hücrelerde önemli ölçüde azalmışken TOS kontrole kıyasla sadece glutamat ile uygulama

yapılan hücrelerde önemli ölçüde artmıştır (\*\*P<0,001, şekil 2). 200 µM'lık bir dozda seftriakson uygulaması, glutamat ile indüklenen eksitotoksisteden sonra C6 glioma hücrelerinde TAS ve TOS üzerinde önemli bir etki yapmamıştır (P>0,05).



**Şekil 2.** Seftriaksonun, C6 glioma hücrelerinde glutamat kaynaklı eksitotoksisteden sonra TAS ve TOS üzerindeki etkileri. Değerler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (\*\*P<0,001).

### TARTIŞMA

Önceki çalışmalarda Amyotrofik lateral skleroz, multipl skleroz, felç, nörotoksiste, Huntington hastalığı, depresyon, bağımlılık, bağımlılık ve toleransın kemirgen modellerinde seftriaksonun nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir.<sup>11, 14</sup> Altta yatan mekanizmanın, GLT-1'in aktivasyonu yoluyla hücresele glutamat alımındaki artış olduğu öne sürülmüştür.<sup>11</sup>

Glutamat metabolizmasına dayalı nöroprotektif etkilere ek olarak, beta-laktam ajanların iskemik beyin hasarında antioksidan etkileri olduğu bildirilmiştir: Carreer ve ark. betalaktam ajanlarının hipokloröz asit'in (HOCl) aracılık ettiği oksidasyonu engellediğini bildirmişlerdir.<sup>15</sup> Cantin ve Woods tarafından yapılan bir başka çalışmada, HOCl'ye karşı sitoprotektif etki, beta-laktam ajanlarında tiyoeter grubunun varlığından kaynaklanmıştır.<sup>16</sup>

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, seftriaksonun beyin ve sinir sisteminde antioksidan rolü olduğunu göstermiştir.<sup>17,18</sup> Ancak doku oksidan ve antioksidan

düzeylerinin incelenmesiyle nöroprotektif etkileri henüz bildirilmemiştir.

## SONUÇ

Bu çalışmada seftriaksonun C6 glioma hücre hattında glutamat eksitotoksitesine karşı koruyucu etkisinin olmadığı bulunmuştur.

## KAYNAKÇA

1. Platt, S. R. (2007). The role of glutamate in central nervous system health and disease - A review. *Veterinary Journal*, 173(2), 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.11.007>
2. Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 121, Issue 8, pp. 799–817). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>
3. Benarroch, E. E. (2018). Glutamatergic synaptic plasticity and dysfunction in Alzheimer disease: Emerging mechanisms. *Neurology*, 91(3), 125–132. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005807>
4. Lewerenz, J., & Maher, P. (2015). Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? *Frontiers in Neuroscience*, 9(DEC), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>
5. Garden, G. A., & Campbell, B. M. (2016). Glial biomarkers in human central nervous system disease. *Glia*, 64(10), 1755–1771. <https://doi.org/10.1002/glia.22998>
6. Verkhatsky, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., & Sofroniew, M. (2014). Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1291–1301. <https://doi.org/10.1042/BST20140107>
7. Chen, C. J., Liao, S. L., & Kuo, J. S. (2000). Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 75(4), 1557–1565. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751557.x>
8. Dong, X. X., Wang, Y., & Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–387. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
9. Parfenova, H., Basuroy, S., Bhattacharya, S., Tcheranova, D., Qu, Y., Regan, R. F., & Leffler, C. W. (2006). Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: Contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 290(5), 1399–1410. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2005>
10. Prentice, H., Modi, J. P., & Wu, J. Y. (2015). Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/964518>
11. Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haengeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D. S., Toan, S. V., Bruijn, L. I., Su, Z., Gupta, P., & Fisher, P. B. (2005).  $\beta$ -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 433(7021), 73–77. <https://doi.org/10.1038/nature03180>
12. Zhang, Y., Zhang, X., & Qu, S. (2015). Ceftriaxone Protects Astrocytes from MPP<sup>+</sup> via Suppression of NF- $\kappa$ B/JNK/c-Jun Signaling. *Molecular Neurobiology*, 52(1), 78–92. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8845-z>
13. Ergül, M., & Taşkıran, A. Ş. (2021). Thiamine protects glioblastoma cells against glutamate toxicity by suppressing oxidative/endoplasmic reticulum stress. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 69(9), 832–839. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00169>
14. Lipski, J., Wan, C. K., Bai, J. Z., Pi, R., Li, D., & Donnelly, D. (2007). Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience*, 146(2), 617–629. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.003>
15. Carreer, R., Deby-Dupont, G., Deby, C., Jadoul, L., & Mathy, M. (1998). Oxidant-scavenging activities of beta-lactam agents. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(1), 43–46. <https://doi.org/10.1007/BF01584363>
16. Epithelial, L., & In, C. (n.d.). *N-Isz*.
17. Hota, S. K., Barhwal, K., Ray, K., Singh, S. B., & Ilavazhagan, G. (2008). Ceftriaxone rescues hippocampal neurons from excitotoxicity and enhances memory retrieval in chronic hypobaric hypoxia. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4), 522–532. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.01.003>
18. Lewerenz, J., Albrecht, P., Tien, M. L. T., Henke, N., Karumbayaram, S., Kornblum, H. I., Wiedau-Pazos, M., Schubert, D., Maher, P., & Methner, A. (2009). Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 111(2), 332–343.

## FİNANSMAN

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A projesi (1919B012002477) tarafından desteklenmiştir.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06347.x>