


# C6 Glial Hücre Hattında Hidrojen Peroksit ile İndüklenen Oksidatif Hasara Karşı Etosuksimidin Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi

## Investigation of Neuroprotective Effect of Ethosuximide Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in The C6 Glial Cell Line

 Ziad JOHA<sup>1</sup>

 Revan ALMOSELLI<sup>1</sup>

 Ahmet Şevki TAŞKIRAN<sup>2</sup>

 Taha Yunus BAYSAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Sivas, Türkiye

<sup>3</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Medicine Term 2, Sivas, Türkiye

### Corresponding author:

Ziad JOHA, Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Sivas, Türkiye

### E-mail:

[zead-geha@hotmail.com](mailto:zead-geha@hotmail.com)

Received/Accepted: Dec 2024

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

### How to Cite

Joha, Z., Almoselli, R., Taşkiran, A., Ş., Baysal, T. Y. (2024). C6 Glial Hücre Hattında Hidrojen Peroksit İle İndüklenen Oksidatif Hasara Karşı Etosuksimidin Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi. *Health Sciences Student Journal*, 4(2), 66-72.

### ÖZET

**Amaç:** Etosuksimidin sinir sistemi üzerinde olumlu etkileri olduğu mevcut araştırmalar tarafından ortaya konmuştur. Ancak, hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif stres üzerindeki etkisi glial hücrelerde hala belirsizdir. Bu çalışmada, C6 glial hücrelerinde hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif hasardan sonra etosuksimidin glial hasar üzerindeki etkisini incelemeyi amaçladık.

**Yöntem:** Çalışmada C6 glioma hücreleri kullanıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan gruptaki hücreler 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakıldı. Etosuksimid grubundaki hücreler 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda etosuksimid ile inkübe edildi. Etosuksimid ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birlikte uygulanan gruptaki hücreler bir saat boyunca etosuksimid ile inkübe edildikten sonra 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakıldı. Hücre canlılığı XTT testi ile değerlendirildi. Apoptoz üzerindeki etkisi, akış sitometrisi kullanılarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Etosuksimid ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu ile karşılaştırıldığında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan grupta etosuksimid, C6 hücrelerinde hücre canlılığını veya apoptoz profilini değiştirmede (p>0,05).

**Sonuç:** Etosuksimid, C6 hücre hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif stres ve apoptoz profilini etkilemeyerek anlamlı bir koruyucu etki göstermedi. Bu sonuç kullanılan dozun ya da inkübasyon süresinin her ikisinin ya da birinin yetersiz olmasından kaynaklanıyor olabilir.

**Anahtar kelimeler:** C6 hücreleri, Etosuksimid, Hidrojen Peroksit, Oksidatif Stres, Apoptoz.

### ABSTRACT

**Aim:** Current studies have revealed that Ethosuximide has positive effects on the nervous system. However, its effect on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in glial cells is still unclear. In this study, we aimed to examine the effect of ethosuximide on glial damage after hydrogen peroxide-induced oxidative damage in C6 glial cells. C6 glioma cells were employed in the study.

**Method:** Cells in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for a 24-hour period. The ethosuximide group was incubated with different concentrations of ethosuximide for 24 hours. Cells in the combined ethosuximide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group underwent a one-hour incubation with ethosuximide, followed by a 24-hour exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cell viability was evaluated using the XTT assay. Flow cytometry was utilized to assess the impact on apoptosis.

**Results:** When comparing the ethosuximide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-only group, it was found that ethosuximide did not alter cell viability or apoptosis patterns in C6 cells.

**Conclusion:** In summary, ethosuximide did not demonstrate a significant protective effect against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis in the C6 cell line. This result may be attributed to insufficient dosage or incubation time, or a combination of both.

**Keywords:** C6 glioma cells, Ethosuximide, Hydrogen peroxide, Oxidative stress, Apoptosis.

## GİRİŞ ve AMAÇ

Oksidatif stres, hücrel metabolizma sırasında üretilen hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı ve bu türleri detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır <sup>1</sup>. Normal hücrel metabolizmada, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi reaktif oksijen türleri (Reaktif oksijen Türleri) üretilir. Bu türler, sinyal iletim sürecinde hayati roller oynarlar <sup>2</sup>. Ancak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimindeki artış hücrel bileşenlere zarar verir ve aynı zamanda genotoksik etkilere neden olur <sup>3</sup>. Ayrıca, aşırı reaktif oksijen türleri üretimi, hücrel işlev bozukluğu ve hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif hasara yol açar<sup>4</sup>. Son zamanlarda, oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynadığına dair bulguların sayısı artmaktadır. Oksidatif stresin kritik beyin bölgelerinde hasara neden olduğu ve böylece nöronal iletişimi düzenleyen mekanizmaların bozulduğu düşünülmektedir. Klinik çalışmalarda, çeşitli nörodejeneratif hastalıklara sahip insanlarda, antioksidan enzim, lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit düzeylerinde önemli değişiklikler tespit edilmiştir. Mitokondri kompleksindeki elektron akışı sırasında bazı elektronlar zincirden kaçır, bunun sonucunda reaktif oksijen radikalleri oluşur ve mitokondrial fonksiyon bozukluğu meydana gelir. Mitokondrial fonksiyon bozukluğu ve oksidatif hasar, hücre içi sinyal sistemi, hücre içi kalsiyum dengesi ve DNA yapısında değişikliklere yol açarak sinir sisteminde kalıcı olumsuzluklara neden olabilir <sup>5</sup>. Oksidatif stres, çeşitli nörodejeneratif bozuklukların ortaya çıkmasında ve/veya ilerlemesinde rol oynayan çeşitli hastalıklarla

ilişkilendirilmiştir. Nörodejeneratif hastalıklar, dünya çapında işlev bozukluğu ve morbiditenin en önemli nedenleri arasındadır ve yaşlanan toplum üzerindeki yüksek etkileri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Bu hastalıklar temel olarak nöronal fonksiyondaki sürekli bozulmaya dayanır ve beyin atrofisine yol açar. Bilinen en yaygın nörodejeneratif hastalıklar arasında aşağıdakiler sunulmaktadır: Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD) ve amiotrofik lateral skleroz (ALS)<sup>6,7</sup>. Glial hücreler, merkezi ve çevresel sinir sisteminde yer alan hücrelerin çoğunluğunu oluşturan ve sinir hücresi olmayan hücrelerdir. Glial hücreler merkezi sinir sisteminde (SSS) önemli işlevlere sahiptirler. Sinir hücrelerinin homeostazını sürdürme, destekleme ve koruma gibi önemli işlevlere sahiptirler<sup>8</sup>. Bu nedenle, glial hücrelerdeki oksidatif stresin azaltılması nörodejeneratif bozukluklar için kritiktir. Etosuksimid, Absens nöbetlerinin tedavisinde kullanılan, etkili ve nispeten iyi tolere edilebilen bir ilaç olarak sunulmuştur. Talamus hücrelerindeki düşük eşikli T-tipi kalsiyum akışlarının azalması, etosuksimidin absens nöbetlerinin tedavisindeki temel etki mekanizmasıdır<sup>9</sup>. Etosuksimidin NMDA reseptör hipofonksiyonu nörotoksisitesine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir<sup>10</sup>. Etosuksimidin frontotemporal demans ve amiotrofik lateral skleroz modellerinde nöroprotektif etkiye sahip olduğu saptanmıştır<sup>11</sup>. Etosuksimidin nöroprotektif faydaları sadece solucanlarla sınırlı değildir; aynı zamanda Huntington hastalığı için insan nöroblastoma hücre kültürü modelinde de etkili olduğu bildirilmiştir<sup>12</sup>. Aynı zamanda etosuksimid, ratların amyloid beta toksinine bağlı olarak oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde

nöronal hasarı ve bilişsel bozuklukları azaltmıştır<sup>13</sup>. Bu da, etosuksimidin nöroprotektif etkilerinin insanlara aktarılabileceğini ve genel bir nöroprotektif ilaç olarak yeniden kullanılabileceğini göstermektedir<sup>12</sup>. Ancak, etosuksimidin C6 glial hücrelerindeki oksidatif stres üzerindeki etkisi ve altında yatan mekanizmalar hala belirsizdir. Bu bağlamda çalışmamızda, C6 glial hücrelerinde hidrojen peroksit ile indüklenen oksidatif strese karşı etosuksimidin etkisini araştırmayı planladık.

## MATERYAL & METOT

### *Hücre Kültürü*

ATCC'den temin edilmiş olan C6 Glioma (CRL107<sup>TM</sup>) hücreleri steril koşullar altında 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda, 25 cm<sup>2</sup>'lik flaklarda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sıgır serumu içeren DMEM (Sigma-Aldrich, USA) hücre kültür besisi yerinde çoğaltıldı. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasaj yapıldı ve üçüncü pasajın ardından çalışmaya başlandı. Etosuksimid (Sigma-Aldrich, ABD) ve glutamat (Sigma-Aldrich, ABD) DMEM içerisinde çözüldü ve işlemden önce stok çözeltiler hazırlandı.

### *XTT Hücre Canlılık Testi*

Hücre canlılığı, XTT testi (Roche Diagnostic, MA, USA) kullanılarak değerlendirildi. C6 Glioma hücreleri, 96-kuyu plakalarda 100-µL DMEM içinde  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu yoğunluğunda ekildi ve etosuksimid uygulamasından önce bir gece boyunca büyütüldü. Ertesi gün, etosuksimidin nöroprotektif etkisini değerlendirmek için dört hücre grubu hazırlandı. Kontrol grubu herhangi bir tedavi görmedi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu hücreleri, 24 saat boyunca 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tedavi edildi. Etosuksimid grubu hücreleri, 24 saat

boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 40 µM) etosuksimid ile tedavi edildi. Etosuksimid + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu hücreleri, 1 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 40 µM) etosuksimid ile ön tedavi edildi ve ardından 24 saat boyunca 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakıldı<sup>14</sup>. İnkübasyondan sonra, ortam uzaklaştırıldı ve kuyular iki kez fosfat tamponlu salin ile yıkanıldı. Son adımda, tüm kuyulara 100 µL fenol kırmızı içermeyen DMEM ve 50 µL XTT etiketleme çözeltisi karışımı eklendi ve ardından plakalar 4 saat boyunca 37°C'de tutuldu. Plakalar çalkalandı ve absorbans, bir ELISA mikroparka okuyucusu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, İngiltere) kullanılarak 450 nm'de tespit edildi. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirildi ve hücre canlılığı, kontrol grubuna göre canlı hücre miktarı yüzdesi olarak ölçüldü<sup>15-17</sup>.

### *Anneksin V Boyası ile Apoptozisin Değerlendirilmesi*

Yaklaşık  $5 \times 10^5$  C6 hücresi, 6 oyuklu plakalara ekildi ve gece boyunca plakaya yapışması beklendi. Ertesi gün, C6 hücreleri, 20 µM etosuksimid, 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya 20 µM etosuksimid + 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda hücreler tripsinize edilerek toplanır ve en az % 1 FBS içeren PBS içinde süspansiyon edilerek üreticinin talimatları izlenerek işlem tamamlandı. Protokol, kültür içindeki erken apoptotik hücrelerin direkt olarak tespit edilmesi esasında dayanmaktadır. Optimal sonuç için hücrelerin final konsantrasyonu  $2 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk (ya da  $1 \times 10^5$  ila  $5 \times 10^5$  hücre/mL) olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan hücrelere eşit hacimde Annexin V & Dead Cell reaktifi ile karıştırıldı. Hücreler yaklaşık olarak 20 dakika sonra Muse Cell Analyzer (Millipore) ile okutuldu<sup>18</sup>.

### İstatiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS paket programı dâhilinde, normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü ANOVA Varyans Analizi Testi uygulanarak yapıldı. Sonuçlardan  $P < 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

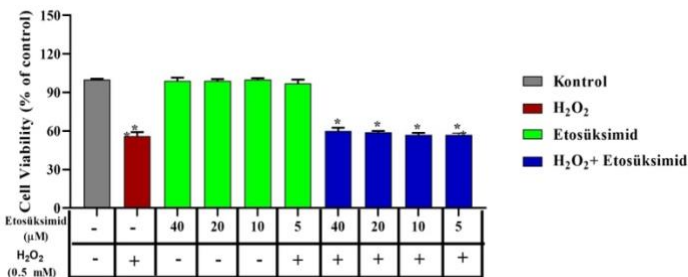
### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Kaynaklı Oksidatif Stres Sonrası C6 Hücre Canlılığı Üzerine Etosüksimidin Etkisi*

Bu çalışmada, Etosüksimidin C6 hücrelerinde **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** ile indüklenen oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerini değerlendirmek için XTT hücre canlılık testi yapıldı. Artan dozlarda (10-40  $\mu$ M) etosüksimidin hem kontrol grubu hem de **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** ile tedavi edilen gruptaki hücre canlılığına etkisi test edildi. C6 hücrelerinin 24 saat boyunca **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** ile inkübasyonu, kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı ( $P < 0,05$ ; Şekil 1). Etosüksimidin tek başına herhangi bir konsantrasyonda kontrol grubuna göre, hücre canlılığını etkilemediği görüldü ( $P > 0,05$ ; Şekil 1). Ek olarak 10, 20 ve 40  $\mu$ M etosüksimidin, **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** ile tedavi edilen C6 hücrelerinde **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** tek başına ile tedavi edilen gruba göre hücre canlılığını anlamlı bir şekilde değiştirmede ( $P > 0,05$ ; Şekil 1). Dolayısıyla etosüksimidin (10-20-40  $\mu$ M) dozlarında C6 glial hücre hattında hidrojen peroksit ile indüklenen oksidatif hasara karşı nöroprotektif etkisini gözlemlenmemiştir.

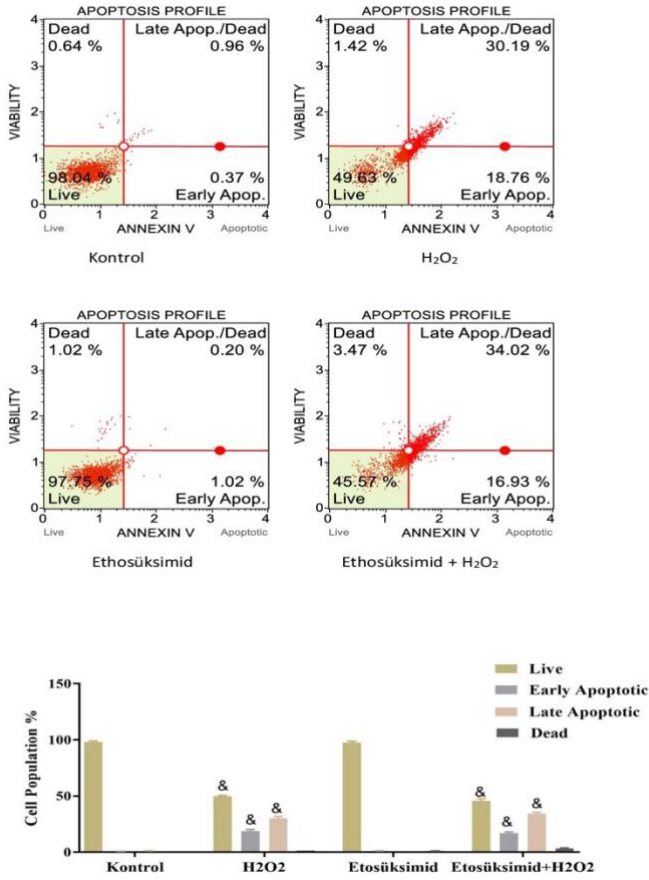
**Şekil 1.** C6 hücre hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen sitotoksosite üzerine etosüksimidin etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilmiştir. \* $P < 0,05$ , kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; # $P < 0,05$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu karşılaştırıldığında.

### *Flow Sitometri Testi Uygulaması ile Etosüksimidin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile İndüklenen Oksidatif Hasar Sonrası Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi*

C6 glial hücrelerinde etosüksimidin apoptoz profili, uygun kitlerle birlikte bir flow sitometri cihazı kullanılarak değerlendirildi. Kontrol grubunda erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre, ölü hücre ve canlı hücre oranları sırasıyla % 0.37, %0.96, %0.64 ve %98.04 olarak belirlendi. **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** grubunda erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre, ölü hücre ve canlı hücre oranları sırasıyla %18.76, %30.19, %1.42 ve %49.63 olarak gözlemlendi. Etosüksimid grubunda erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre, ölü hücre ve canlı hücre oranları sırasıyla %1.02, %0.20, %1.02 ve % 97.75 olarak saptandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Etosüksimid grubunda ise erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre, ölü hücre ve canlı hücre oranları sırasıyla %16.93, %34.02, %3.47 ve %45.57 olarak bulundu. Kontrol grubuna göre **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**'nin erken apoptotik hücre ve geç apoptotik hücre oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa ve canlı hücre oranında anlamlı bir azalmaya neden olduğu tespit edildi ( $P < 0,05$ ; Şekil 2). Kontrol grubuna göre etosüksimidin tek başına erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve canlı hücre oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gösterildi ( $P > 0,05$ ; Şekil 2). **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** grubuna göre etosüksimidin **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** ile uygulandığında erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve canlı hücre oranlarında istatistiksel



olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gösterildi ( $P>0,05$ ;Şekil2).



**Şekil 2.** Etosuksimidin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile İndüklenen Oksidatif Hasar Sonrası Apoptoz Üzerine Etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilmiştir. & $P<0,05$ , kontrol grubu ile karşılaştırıldığında;  $P>0,05$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu karşılaştırıldığında

## TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen C6 hücrelerinde oksidatif stress kaynaklı apoptosis artışına karşı etosuksimidin koruyucu etkisi ilk kez araştırıldı. Mitoz ve apoptoz çok benzer morfolojik özellikler gösterdiğinden apoptoz ile hücre döngüsü arasında doğrudan bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar, hücre döngüsü durması ve apoptozun hücrelerde p53 aktivasyonunun en dikkat çekici biyolojik sonuçları olduğunu ve p53'ün hem hücre döngüsü durmasını hem de hücre ölümünü indükleme yeteneğine sahip

olduğunu göstermiştir<sup>19</sup>. Oksidatif stres, organizmada oksidan maddeler ile antioksidan savunma sistemleri arasında bir dengesizliği ifade eder. Bu dengesizlik, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine yol açar, bu da dokuların hasar görmesine ve organizmanın normal fizyolojik işlevinin bozulmasına neden olur. Ayrıca, kanıtlanmış bulgular, oksidatif stresin, merkezi sinir sistemindeki nörodejeneratif hastalıkların başlangıcı ve ilerlemesi ile karmaşık bir şekilde bağlantılı olduğunu göstermektedir<sup>1</sup>. Nörotoksisite, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları, beyin travması, AIDS demans kompleksi, inme ve omurilik lezyonu dahil olmak üzere bir dizi kronik ve akut nörolojik hasarla ilişkilendirilmiştir<sup>20</sup>. Ayrıca araştırmalar, oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıkların ve SSS bozukluklarının gelişiminde anahtar bir faktör olduğunu ileri sürmektedir. Bu bilgilerle uyumlu olarak araştırmamızda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin hücre canlılığını azalttığı ve oksidatif stresi arttırdığı görüldü. Serbest radikal fazlasının çeşitli nörolojik bozukluklarda hücre ölümüne neden olduğuna dair yaygın inanç, nörotoksisiteyi azaltabilen veya ortadan kaldırabilen ilaçlara yönelik yoğun araştırmalara yol açmıştır.

Etosuksimid absans epilepsisini tedavi etmek için kullanılan anti epileptik bir ilaçtır. Diğer nöropsikiyatrik hastalıklar tedavi olarak kullanılmasından fayda görebilir. Etosüksimidin sıçan hipokampusundan in vitro olarak elde edilen nöral kök hücrelerin (NSC'ler) çoğalmasını ve nöronal farklılaşmasını uyardığı, yetişkin sıçanlarda hipokampal nörojenezini arttırdığı ve Alzheimer sıçan modelinde hipokampal NSC kaybının yanı sıra öğrenme ve hafıza sorunlarını tersine çevirdiği gösterilmiştir<sup>13</sup>. Ek olarak etosuksimidin PI3K/AKT/Wnt/-katenin

sinyal yolu ile nörojenezini uyarabileceği gösterilmiştir<sup>13</sup>. Diğer çalışmalar, hücre dışı ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının, ya ethosuksimid ya da diğer ilaçlar yoluyla düşürülmesinin, beyin sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir<sup>21</sup>. T tipi Ca<sup>2+</sup> kanalı, hücrelerdeki Ca<sup>2+</sup> seviyelerini kontrol eden voltaj kapılı Ca<sup>2+</sup> kanallarından biridir. T-tipi kalsiyum kanal blokleri ethosuksimidin, NOD/LtJ farelerinde yaşa bağlı işitme düşüşünü, işitsel uyarılmış beyin sapı yanıtları ile ölçüldüğü üzere, ve dış saç hücreleri ile spiral ganglion nöronlarının kaybını önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Bu etkiler, apoptotik yolun inhibisyonu ile ilişkilidir<sup>22</sup>. Etosuksimide kullanılarak T tipi Ca<sup>2+</sup> kanallarının inhibe edilmesinin epileptogenezi baskılayabildiği bulunmuştur<sup>23</sup>. T-tipi kalsiyum kanal blokerlerinin, kalsiyum seviyelerini düzenlemeye ve hücreleri, Parkinson hastalığı ile bağlantılı bir toksin olan rotenonun neden olduğu hasardan korumaya yardımcı olduğu gösterilmiştir<sup>24</sup>. Bu ilaçların ayrıca oksidatif stresi azalttığı da gösterilmiştir<sup>25</sup>. T tipi bir kalsiyum kanal blokleri olan efonidipinin, Nrf2'yi ve ardından gelen antioksidan enzimleri aktive ederek renal interstisyel fibrozisi iyileştirdiği gösterilmiştir<sup>26</sup>. Şahin ve ark. İle yapılan çalışmaya göre, ethosuksimidin, C6 glia hücrelerinde glutamat ile indüklenen sitotoksositeye karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, bu etkide yer alan potansiyel mekanizmalardan biri oksidatif stresin engellenmesidir<sup>27</sup>. Önceki çalışmalarla çelişkili olarak, bu çalışma kapsamında, C6 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı oksidatif stres sonrası ethosuksimidin (10-20-40 µM) dozlarında herhangi bir anlamlı nöroprotektif etki göstermedi. Bu sonuç kullanılan dozun ya da inkübasyon

süresinin her ikisinin ya da birinin yetersiz olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak, ethosuksimidin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı oksidatif stres sonrasında C6 glial hücrelerinde hücre ölümünü azaltmadığını gösterdi. Ancak, ilgili potansiyel süreçlerle ilgili sorunları yanıtlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

### Teşekkür

Yazarlar, bu çalışmanın yürütülmesi için gerekli olan olanakları sağlayan Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, CUTFAM Araştırma Merkezi, Sivas, Türkiye'ye teşekkür etmek isterler. Bu çalışmanın finansmanı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından sağlanmıştır (2209-A Öğrenci Projesi, TÜBİTAK Proje No: B.14.2.TBT.0.06.01.00-221-249164, Türkiye).

### KAYNAKÇA

1. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2015;6(3):331–336.
2. Forman HJ. Use and abuse of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in studies of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 2007;42(7):926–932.
3. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012;2012(1):428010.
4. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 2012;24(5):981–990.
5. Kaymak G, Aydın H. Nörodejeneratif Hastalıklarda Oksidatif Stresin Rolü. *Osmangazi Tıp Dergisi* 2021;43(6):696–704.
6. Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu II, et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 5938 2022;23(11):5938.
7. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy* 2015;9(July):147963.
8. Jessen KR. Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36(10):1861–1867.
9. Glauser TA, Perucca E. Ethosuximide. *The Treatment of Epilepsy* 2015;460–471.

10. Farber NB, Jiang XP, Heinkel C, Nemmers B. Antiepileptic drugs and agents that inhibit voltage-gated sodium channels prevent NMDA antagonist neurotoxicity. *Molecular Psychiatry* 2002 7:7 2002;7(7):726–733.
11. Wong SQ, Pontifex MG, Phelan MM, et al.  $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -phenylsuccinimide ameliorates neurodegeneration in a *C. elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *Neurobiology of Disease* 2018;118:40–54.
12. Chen X, McCuef H V., Wong SQ, et al. Ethosuximide ameliorates neurodegenerative disease phenotypes by modulating DAF-16/FOXO target gene expression. *Molecular Neurodegeneration* 2015;10(1):1–14.
13. Tiwari SK, Seth B, Agarwal S, et al. Ethosuximide induces hippocampal neurogenesis and reverses cognitive deficits in an amyloid- $\beta$  toxin-induced Alzheimer rat model via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290(47):28540–28558.
14. Sahin B, Ergul M. Captopril exhibits protective effects through anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in C6 glioma cells. *Metabolic Brain Disease* 2022;37(4):1221–1230.
15. Yulak F, Ergul M. Tannic acid protects neuroblastoma cells against hydrogen peroxide – triggered oxidative stress by suppressing oxidative stress and apoptosis. *Brain Research* 2024;1844:149175.
16. Yulak F, Üngür B. Investigation of the Effect of Indatraline on Oxidative Damage Induced by Hydrogen Peroxide in C6 Glioma Cell Line. *Cumhuriyet Science Journal* 2023;44(4):645–649.
17. Çiltaş AÇ, Gündoğdu S, Yulak F. Levetiracetam Protects Against Glutamate-Induced Excitotoxicity in SH-SY5Y Cell Line. *International Journal of Nature and Life Sciences* 2022;6(2):142–150.
18. Taskiran AS, Ergul M, Gunes H, Ozturk A, Sahin B, Ozdemir E. 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* 2021;41(1):173–183.
19. Ergul M, Bakar-Ates F. A specific inhibitor of polo-like kinase 1, GSK461364A, suppresses proliferation of Raji Burkitt's lymphoma cells through mediating cell cycle arrest, DNA damage, and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2021 Jun 24];332. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33075310/>
20. Balbi ME, Tonin FS, Mendes AM, et al. Antioxidant effects of vitamins in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetology & metabolic syndrome* 2018;10(1):18.
21. Boehmerle W, Huehnchen P, Lee SLL, Harms C, Endres M. TRPV4 inhibition prevents paclitaxel-induced neurotoxicity in preclinical models. *Experimental Neurology* 2018;306:64–75.
22. Sang L, Zheng T, Min L, et al. Otoprotective effects of ethosuximide in NOD/LtJ mice with age-related hearing loss. *International journal of molecular medicine* 2017;40(1):146–154.
23. Becker AJ, Pitsch J, Sochivko D, et al. Transcriptional Upregulation of Cav3.2 Mediates Epileptogenesis in the Pilocarpine Model of Epilepsy. *Journal of Neuroscience* 2008;28(49):13341–13353.
24. Tabata Y, Imaizumi Y, Sugawara M, et al. T-type Calcium Channels Determine the Vulnerability of Dopaminergic Neurons to Mitochondrial Stress in Familial Parkinson Disease. *Stem Cell Reports* 2018;11(5):1171–1184.
25. Nili-Ahmadabadi A, Ali-Heidar F, Ranjbar A, et al. Protective effect of amlodipine on diazinon-induced changes on oxidative/antioxidant balance in rat hippocampus. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2018;13(4):368–376.
26. Chung S, Kim S, Kim M, et al. T-type calcium channel blocker attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis by activating the Nrf2 antioxidant pathway. *American Journal of Translational Research* 2016;8(11):4574.
27. Sahin B, Gunes H, Joha Z. Protective Effect of Ethosuximide against Glutamate-Induced Cytotoxicity and Oxidative Stress in C6 Glial Cells. *International Journal of Scientific and Technological Research* 2021;7(8):77–87.