

Bumetanid'in HT-22 Hipokampal Hücre Hattında Pentilentetrazol Kaynaklı Hücresel Hasar ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin AraştırılmasıMuzaffer Türkoğlu¹, Ali Tokgöz¹, Songül Bavlı¹, Sebahattin Karabulut^{2*}, Ayşegül Öztürk²¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sivas, Türkiye²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Sivas, Türkiye**Öz**

Bu çalışmanın amacı, Na⁺-K⁺-2Cl⁻ kotransporter-1 (NKCC1) inhibitörü olan bumetanidin (BMT), pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen epileptiform hücresel hasara karşı olası nöroprotektif etkisini ve bu etkinin oksidatif stres parametreleri ile ilişkisini HT-22 nöronal hücre hattında araştırmaktır. HT-22 hücreleri kontrol, PTZ (60 mM), BMT ve BMT + PTZ olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Hücreler, farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 4 ve 8 µM) BMT ile ön işleme tabi tutulduktan sonra 60 mM PTZ'ye maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığı XTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücresel oksidatif durumun belirlenmesi amacıyla total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Veriler tek yönlü ANOVA ve Tukey post-hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. PTZ uygulaması, HT-22 hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı düzeyde azaltmış ve oksidatif stres belirteçlerinde belirgin artışa neden olmuştur. BMT ön tedavisinin özellikle 2 µM dozunda, PTZ'ye bağlı hücre ölümünü anlamlı şekilde azalttığı saptanmıştır (p<0.05). Bu dozda BMT uygulaması, TAS düzeylerini artırırken PTZ'ye bağlı TOS artışını anlamlı olarak sınırlamıştır. Tek başına BMT uygulamasının hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Bu çalışma, BMT ön tedavisinin PTZ ile indüklenen HT-22 hücre hasarına karşı nöroprotektif etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. NKCC1 inhibisyonunun epileptiform hasarın upstream patofizyolojik mekanizmalarını hedefleyen tamamlayıcı bir terapötik yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Pentilentetrazol, Bumetanid, Hücre Hasarı**The Investigation of the Effect of Bumetanide on Pentylene-tetrazol-Induced Cellular Damage and Oxidative Stress in the HT-22 Hippocampal Cell Line****ABSTRACT**

The present study aimed to investigate the potential neuroprotective effect of bumetanide (BMT), a Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter-1 (NKCC1) inhibitor, against pentylene-tetrazol (PTZ)-induced epileptiform cellular damage and to evaluate its association with oxidative stress parameters in the HT-22 neuronal cell line. HT-22 cells were divided into four groups: control, PTZ (60 mM), BMT, and BMT + PTZ. Cells were pretreated with BMT at different concentrations (1, 2, 4, and 8 µM) prior to exposure to PTZ. Cell viability was assessed using the XTT assay. Total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) were measured to evaluate cellular oxidative stress. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. PTZ exposure significantly reduced cell viability and induced oxidative stress in HT-22 cells. BMT pretreatment, particularly at the 2 µM concentration, significantly attenuated PTZ-induced cell death (p < 0.05). At this dose, BMT increased TAS levels while significantly limiting the PTZ-induced elevation in TOS. BMT administered alone did not significantly affect cell viability. These findings indicate that BMT exerts a dose-dependent protective effect against PTZ-induced neuronal damage. This study demonstrates that bumetanide pretreatment provides neuroprotection against PTZ-induced cellular injury in HT-22 neurons. Targeting NKCC1-dependent upstream mechanisms may represent a complementary therapeutic strategy for epileptiform neuronal damage.

Keywords: Pentylene-tetrazol, Bumetanide, Cell Damage**Corresponding author: Sebahattin Karabulut, email: sbkarabulut@cumhuriyet.edu.tr***GİRİŞ**

Epilepsi, dünya çapında 65 milyon kişiyi etkileyen dördüncü en yaygın kronik nörolojik hastalıktır (Barnard vd., 2025). Hastalık için altta yatan mekanizmanın, beyinde glutamat gibi uyarıcı ve GABA gibi baskılayıcı

nörotransmitter arasındaki dengenin bozulmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. GABAerjik inhibitör sistemin yetersiz kalmasıyla, nöronal ağ dengesinin eksitator aktiviteye doğru kayması sonucu nöbetler ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden epilepsi hastalarında GABAerjik sistemin medikal olarak desteklenmesi nöbetlerin

engellenmesinde en temel yaklaşım olarak göze çarpmaktadır. Bununla birlikte, antiepileptik ilaçlarla nöbetlerin baskılanmasına yönelik mevcut tedavi hastaların yaklaşık olarak üçte ikisi için fayda sağlarken, kalanlar en az iki antiepileptik ilacın başarısız olmasıyla karakterize ilaca dirençli epilepsiden mustarip olmaktadır (Dalic vd., 2020). Bu tür hastalarda nöbetlere yol açan epileptojenik bölgenin cerrahi rezeksiyonu genellikle nöbet kontrolü için birincil tedavi seçeneği olmaktadır. Ancak ilaca dirençli grubun içerisindeki bazı hastalar operasyonla daha fazla kortikal bölgelerin etkilenecek olması, yaygın bilateral nöbet odakları veya jeneralize epilepsi tanısı nedeniyle cerrahi için uygun değildir (Kwan vd., 2010). Bu sınırlamalar yetersiz nöbet kontrolü, yaşam kalitesinde ciddi bozulma ve büyük ekonomik yüklerle karşı karşıya kalan önemli bir hasta alt grubuna yol açmaktadır (Li vd., 2024). Dolayısıyla epilepsi hastalığının tedavisinde ve epileptik nöbetlerin baskılanmasında daha etkili olabilecek yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Epilepsi tedavisinde kullanılacak yeni potansiyel antiepileptik ajanların araştırılmasında kimyasal, elektriksel ve genetik hayvan nöbet modelleri ön plana çıkmaktadır (Raol ve Brooks-Kayal, 2012). Bunlar arasında beyinde inhibitör tonusu azaltmaya dayanan bir metod olarak pentilentetrazol (PTZ) kaynaklı epileptik nöbetler de deneysel araştırmalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. GABA-A reseptör antagonisti olarak etki etmesi, PTZ'nin in-vivo nöbet indüklemesinin altında yatan temel mekanizmadır. Bunun yanında PTZ'nin in-vitro olarak nöronal hücre hatlarına uygulanmasıyla oluşan hücresel hasar, epileptik nöbetlerin yol açtığı patolojik süreçleri temsil eden bir araç olarak ön plana çıkmaktadır (Taşkıran ve Yıldız Asdemir, 2024). Öte yandan, HT-22 fare hipokampal nöronal hücre hattı, oksidatif stres aracılı hasara karşı özellikle hassas olup, eksitotoksik koşullarda nöronal kırılabilirliği incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Aşırı nöronal uyarılabilirliğin ikincil oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon ile yakından ilişkili olduğu göz önüne alındığında, oksidatif parametrelerin araştırılması, nöbetle ilgili hücresel hasar hakkında mekanik bir bakış sunabilmektedir.

Katyon-klorür kotransporterleri (KCC), merkezi sinir sistemi dâhil olmak üzere birçok dokuda iyon dengesi ve hücre homeostazı sağlamak için kritik rol oynayan membran proteinleridir (Blasse vd., 2009). KCC'ler sodyum (Na^+), potasyum (K^+) ve klorür (Cl^-) gibi iyonların hücre zarından taşınmasını sağlayan transport proteinleri olup, bu sayede nöronal aktivitenin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. KCC'lerden NKCC1 hücre içine Na^+ , K^+ ve Cl^- taşırken, KCC2 hücre dışına K^+ ve Cl^- taşımaktadır (Zhang vd., 2023). Bu iki transporter arasındaki denge, hücre içi klorür konsantrasyonunu düzenlemekte ve GABAerjik inhibisyonun sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, KCC'lerin, özellikle de NKCC1 ve KCC2'nin, epilepsinin gelişiminde ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Liu vd., 2020). Epilepsi patofizyolojisinde bu transporterların disfonksiyonunun nöronal klorür homeostazını bozduğu gösterilmiştir. İlaça dirençli epilepsi hastalarında NKCC1'in artan ekspresyonu dikkat çekmektedir. Bu durum, NKCC1'in bu hastalıkların patogeneze katkıda bulunabileceğini ve potansiyel bir

terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir (Lam vd., 2023). Seçici bir NKCC1 inhibitörü olan bumetanid (BMT), bazı epilepsi modellerinde umut vadeden etkiler göstermiştir (Rao vd., 2023). Ancak, eksitotoksik hasar ve oksidatif stres yanıtları üzerindeki hücresel düzeyde etkileri hâlâ tam olarak tanımlanmamıştır. Bu yüzden bu çalışmada, BMT ön tedavisinin PTZ kaynaklı hücresel hasarı ve ilişkili oksidatif stres yanıtlarını nöronal uyarılabilirlik modülasyonu yoluyla azaltabileceğini varsayarak, HT-22 hücre hattında PTZ'nin yol açtığı hücresel hasar ve oksidan-antioksidan düzeyler üzerine etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan HT-22 hücre hattı Sigma Aldrich (St Louis, MO, ABD)'den temin edilmiştir. HT-22 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), % 0,1 penisilin-streptomisin (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) içeren DMEM besiyeri (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) içinde 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda büyütülmüştür. Hücreler %90 yoğunluğa ulaştığında pasajlanarak 96'lık plate içerisine her kuyucukta 1×10^4 yoğunlukta hücre olacak şekilde kültüre edilmiştir. Bumetanid ve PTZ (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, ABD) DMEM içerisinde çözülmüş ve işlemde önce stok solüsyonları hazırlanmıştır.

Çalışma Grupları ve Deneysel Protokol

HT-22 hücrelerinden; kontrol (yalnızca DMEM uygulanan grup); PTZ (60 mM PTZ uygulanan grup); BMT + PTZ (Bumetanid ön tedavisinden 1 saat sonra 60 mM PTZ uygulanan grup) ve BMT (Bumetanid uygulanan grup) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Bumetanid'in tedavi dozları yapılan ön çalışma sonucunda 8; 4; 2; 1 μM olarak belirlendi. BMT + PTZ grubundaki hücelere çeşitli konsantrasyonlarda (8; 4; 2; 1 μM) Bumetanid ile ön tedavi uygulandıktan 1 saat sonra 60 mM PTZ eklenerek 24 saat beklendi (Taşkıran ve Yıldız Asdemir, 2024). İlaç uygulamaları belirtildiği şekilde yapıldıktan ve inkübe edildikten sonra hücre canlılığı XTT testi (Roche Diagnostic, MA, USA) kullanılarak değerlendirildi (Joha vd., 2025). Bu testte, PTZ ile inkübasyonun sonunda besi yeri uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 μl renksiz DMEM ve üzerine 50 μl XTT solüsyonu eklenerek 4 saat inkübe edildi. Ardından örneklerle ait absorbans değerleri 450 nm'de bir ELISA mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) ile belirlendi. Kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilerek, % Hücre canlılığı = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplandı.

Hücre Homojenatlarının Hazırlanması

Hücreler steril tüplere alınarak yaklaşık 10 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki sıvılar çıkarılarak tüplerin dibinde bulunan hücre konsantrasyonunu yaklaşık 1×10^6 /mL'ye seyreltmek için

PBS (pH 7.4) ile süspansiyon edildi. Hücreler, sitozolik içeriklerinin dışarı çıkmasını sağlamak için üç kez tekrarlanan dondurma-çözme döngüleri ile hasara uğrattıldı ve daha sonra 4°C'de 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra, üst fazdaki sıvılar biyokimyasal analiz için toplandı. Örneklerdeki toplam protein seviyelerini belirlemek için Bradford protein analiz kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı (Joha ve Taşkiran, 2025).

TAS ve TOS Düzeylerinin Ölçülmesi

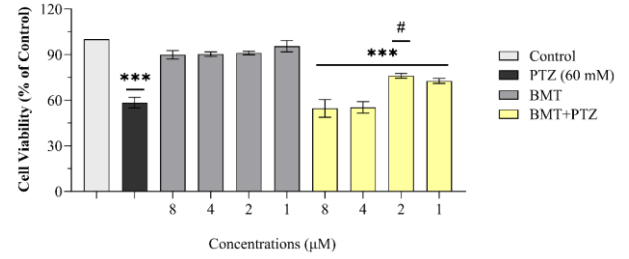
Tedavilerin hücresel oksidatif stres üzerine etkisinin değerlendirilmesinde total antioksidan (TAS) ve total oksidatif stres (TOS) ölçümleri gerçekleştirildi (Erel, 2004; Erel 2005). TAS ölçümü serbest radikallerin reaksiyon hızını izlemek için Fenton reaksiyonunda hidroksil radikallerinin oluşmasıyla başlayan, serbest radikallerin reaksiyonu sırasında boyanmış dianisidiyolün emilmesinin gözlenmesine dayanmaktadır. Örneklerde bulunan antioksidanların seviyeleri ile orantılı olarak renklenmeyi baskılamaları beklenir. TOS analizi ise ortamda yeterli oksidan mevcut olduğunda demir iyonunun ferrik iyonla oksitlenmesine ve ksilenol oranj kullanılarak ferrik iyonların hücresel seviyelerinin ölçümüne dayanmaktadır (Yulak vd., 2025). Ölçüm sırasında izlenen protokol üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı (Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd, Gaziantep, Türkiye).

İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) paket programı kullanıldı. Veriler ortalama \pm SH olarak sunuldu ve tek yönlü bir varyans analizi (tek yönlü ANOVA) ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edildi. Sonuçlardan $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

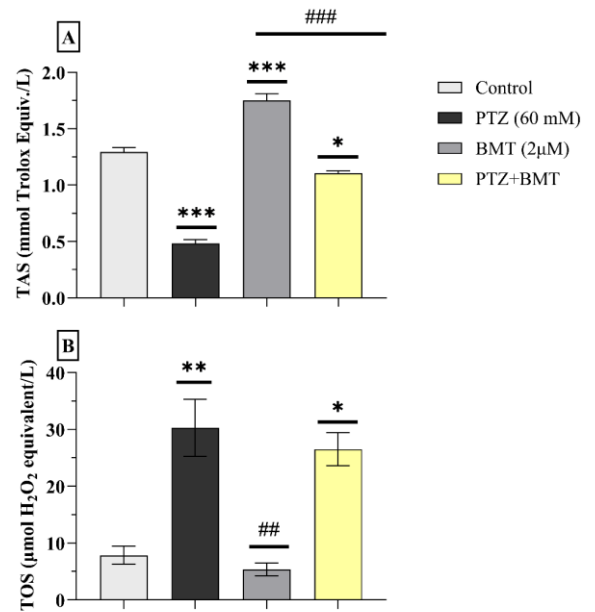
BULGULAR

BMT'nin HT-22 hücreleri üzerinde PTZ uygulamasının indüklediği hücre hasarına karşı koruyucu etkinliği XTT hücre canlılığı testi kullanılarak değerlendirildi. BMT uygulamaları yukarıda belirtildiği dozlarda uygulandıktan ve PTZ'ye maruz bırakıldıktan sonra yapılan XTT testi sonuçları, hücre canlılık oranlarının BMT'nin 2 μ M dozunda canlılığı koruduğu şeklinde gözlenmiştir. 8, 4 ve 1 μ M dozlarda uygulanan BMT+PTZ ile PTZ grubu arasında sağ kalım açısından fark görülmezken, 2 μ M dozda BMT uygulamasından sonraki PTZ'ye maruziyet tek başına PTZ uygulanan gruba kıyasla sağ kalımı anlamlı bir şekilde artırmıştır ($p < 0.05$). Tek başına BMT uygulamasının hücrelerde sağ kalım üzerine anlamlı bir etkisi olmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 1. Bumetanid'in PTZ kaynaklı hücre hasarından sonra HT-22 hücrelerinde sağ kalım üzerindeki etkisi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. ***, $p < 0.001$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; #, $p < 0.05$, PTZ ile tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında.

BMT'nin nöroprotektif etkisinde oksidatif stres üzerindeki olası olumlu etkisini belirlemek için tedavi sonrası hücresel oksidan ve antioksidan durum analiz edilmiştir. PTZ uygulanan bütün gruplarda TAS düzeyindeki azalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Bununla birlikte, 2 μ M BMT hem tek başına uygulandığında hem de ön tedavi olarak uygulandıktan sonra PTZ'ye maruz kalan gruplardaki TAS düzeyleri, yalnızca PTZ uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Diğer taraftan PTZ uygulanması hücresel oksidatif stres parametrelerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırırken ($p < 0.01$), BMT uygulaması TOS düzeylerindeki PTZ kaynaklı artışı anlamlı bir şekilde sınırlamıştır ($p < 0.05$). (Şekil 2).



Şekil 2. BMT'nin PTZ kaynaklı hücre hasarından sonra HT-22 hücrelerinde oksidatif stres parametreleri TAS ve TOS düzeyleri üzerindeki etkisi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ PTZ ile tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında.

TARTIŞMA

Bu çalışmada BMT ön tedavisinin HT-22 hücrelerinde PTZ ile indüklenen hücre hasarına karşı olası nöroprotektif etkisi bazı oksidatif stres belirteçlerine olan etkisi üzerinden araştırılmıştır. Sonuçlarımız BMT'nin tek başına uygulandığında hücre sağ kalımı üzerinde herhangi bir etki göstermediğini, ancak BMT'nin özellikle 2 µM dozuyla yapılan ön tedavinin PTZ'ye maruz kalan HT-22 hücrelerinde ölüm oranını azalttığını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca koruyucu olduğu bu dozda tek başına BMT tedavisinin hücresel oksidan stres düzeyini azaltırken, antioksidan düzeyi artırdığı ve PTZ ile birlikte uygulandığında ise oksidatif stres üzerine olumlu etkisinin sınırlı kaldığı gözlenmiştir. Oksidatif stres, epilepside önemli olan etkenlerden biridir. Epileptik nöbetler sırasında artan nöronal metabolik talep ve hücre içi iyonik dengesizlikler, reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin aşırı üretimi ile sonuçlanmakta, bu durum beyin antioksidan savunma sistemlerini yetersiz bırakmaktadır. Gelişen oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, proteinlerin oksidatif modifikasyonu ve DNA bütünlüğünün bozulması yoluyla nöronal hasarı artırmakta ve nöbet aktivitesinin ilerlemesini ve şiddetlenmesini kolaylaştırmaktadır (Geronzi vd., 2018). Bu sebeple oksidatif stresi engelleyerek veya azaltarak nöroprotektif etki sağlamak epilepside uygun bir tedavi stratejisi olabilir. Literatürde antioksidanların kullanımının hem eksitotoksisteyi iyileştirerek nöbet oluşumunu engellemede hem de ROS üretimini engelleyerek nörotoksisteyi önlemede potansiyel bir yaklaşım olabileceği gösterilmiştir (Yand vd., 2020).

PTZ, GABA-A reseptörlerini non-kompetitif şekilde antagonize ederek nöronal inhibisyonu azaltan ve böylelikle epileptiform aktiviteyi tetikleyen bir pro-konvülzan ajandır (Morimoto vd., 2004). GABAerjik inhibisyonun bozulması, nöronal ağlarda hiperexsitabiliteye, artmış aksiyon potansiyeli frekansına ve hücre içi Ca²⁺ yüklenmesine yol açar. Bu süreç de mitokondriyal elektron transport zincirinde fonksiyonel bozulma ile sonuçlanarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimini tetikler. Bu mekanizma hem in vivo PTZ epilepsi modellerinde hem de in vitro nöronal hücre kültürlerinde oksidatif stres belirteçlerindeki artışla tutarlıdır (Samokhina ve Samokhin, 2018; Taskiran vd., 2020). HT-22 hücreleri, fare hipokampal nöronlarından üretilmiş bir hücre hattıdır. HT-22 hücreleri fonksiyonel iyonotropik glutamat reseptörlerinden (NMDA, AMPA, Kainat) yoksundur. Bu özellikleri sebebiyle, hücre ölümünün klasik eksitotoksiste (reseptör aracılı kalsiyum aşırı yüklenmesi) yerine, sistin/glutamat antiporter inhibisyonu sonucu oluşan glutasyon (GSH) tükenmesi ve buna bağlı oksidatif stres yoluyla gerçekleşmesini sağlar. Bu nedenle HT-22 modeli, PTZ gibi pro-konvülzan ajanların neden olduğu hücresel hasarın oksidatif bileşenini incelemek için literatürde altın standart olarak kabul edilen en uygun in vitro modellerden biridir (Tan, Wood, ve Maher, 1998).

BMT, Na⁺-K⁺-2Cl⁻ kotransporter-1 (NKCC1) inhibitörü olarak hücre içine klorür girişini azaltır ve GABA-A reseptör aracılı sinyalleşmenin hiperpolarizan yönde kalmasını destekler (Dzhala vd., 2005). NKCC1/KCC2 dengesizliğinin, epileptik hiperexsitabilitenin temel upstream mekanizmalarından biri olduğu iyi bilinmektedir (Li vd., 2024). Bu bağlamda BMT, epileptiform aktiviteyi doğrudan baskılayan klasik antiepileptiklerden farklı olarak, iyonik homeostazı düzenleyerek patofizyolojik sürecin daha erken bir basamağına müdahale eder. BMT'nin doğrudan antioksidan özelliklere sahip olduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmamaktadır. Bununla birlikte, NKCC1 inhibisyonu yoluyla nöronal ateşleme sıklığının azalması, NMDA reseptör aracılı Ca²⁺ girişinin sınırlandırılması ve mitokondriyal stresin hafifletilmesi sonucunda ROS üretiminin sekonder olarak azalması biyolojik olarak tutarlı bir mekanizma sunmaktadır (Abruzzo, Panisi ve Marini, 2021). Bu durum, bumetanid'in oksidatif stres belirteçleri üzerindeki etkisinin dolaylı ve downstream sonuçlar üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir. PTZ ile indüklenen epileptiform aktivitenin, yalnızca nöronal değil aynı zamanda inflamatuvar yolları da aktive ettiği bilinmektedir (Namulodi vd., 2025). NKCC1 aktivitesinin mikrogial aktivasyon, NF-κB sinyalleşmesi ve pro-inflamatuvar sitokin salınımı ile ilişkili olduğu; bu süreçlerin de oksidatif stres yükünü artırdığı bildirilmiştir (Gong vd., 2021). Bu açıdan bakıldığında bumetanid, yalnızca nöronal eksitabiliteyi değil, aynı zamanda oksidatif stresle ilişkili inflamatuvar döngüleri de dolaylı olarak baskılayabilir.

BMT ön tedavisinin, HT-22 hücrelerinde PTZ ile indüklenen hücresel hasar üzerindeki etkisi oksidatif stres belirteçleri bağlamında analiz edildiği çalışmamızda, 2 µM dozda BMT'nin bazal oksidatif stresi düşürdüğü ve antioksidan kapasiteyi artırdığı gözlenmiş; buna karşın PTZ ile kombine edildiğinde oksidatif stres üzerindeki düzenleyici etkisinin daha sınırlı olduğu gözlenmiştir. Çalışmamız, PTZ'nin HT-22 hücrelerindeki oksidatif stres profiline (TAS ve TOS seviyelerine) direkt etkisini ölçmüştür. BMT'nin bu profildeki PTZ ile indüklenen ROS artışını azalttığını, total antioksidan seviyeyi koruduğunu ve hücre canlılığını artırdığını göstermiştir. PTZ'nin oksidatif stres oluşturduğu deneysel epilepsi literatürü, HT-22 hücrelerinin oksidatif duyarlılığı ve NKCC1 inhibisyonunun epileptiform aktiviteyi baskılayan etkilerine dair dolaylı kanıtların bütüncül değerlendirilmesine dayanarak yorum yapmaktadır. Bizim çalışmamız BMT ön tedavisinin HT-22 hücrelerinde PTZ ile indüklenen hücre hasarına karşı olası nöroprotektif etkisini bazı oksidatif stres belirteçlerine olan etkisi üzerinden doğrudan inceleyen ilk özgül çalışma olmasıyla öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, çalışmamızda oksidatif durum, toplam antioksidan kapasite ve toplam oksidan düzey ölçümleri üzerinden değerlendirildiğinden ve reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), GSH/GSSG oranı veya spesifik antioksidan enzim aktiviteleri gibi daha ayrıntılı biyokimyasal belirteçlerin analiz edilmemiş olduğundan mekanistik yorumların

kapsamını sınırlamaktadır. Ayrıca, literatürde epileptiform hasarla ilişkili olduğu bildirilen NF- κ B gibi inflamatuvar sinyal yollarının çalışmamızda değerlendirilmemiş olması, BMT'nin hücresel düzeydeki etki mekanizmasının daha ayrıntılı açıklanmasını kısıtlamaktadır. Bu yüzden, gelecekte yapılacak çalışmaların daha spesifik oksidatif ve moleküler parametreleri içermesi, elde edilen bulguların mekanistik temelini daha net ortaya konmasına katkı sağlayacaktır.

SONUÇ

Sonuç olarak, BMT ön tedavisinin PTZ ile indüklenen HT-22 hücre hasarında olası nöroprotektif etkisinin, doğrudan antioksidan bir mekanizmadan ziyade, klorür homeostazını düzenleyerek nöronal hipereksitabiliteyi azaltması ve buna bağlı sekonder oksidatif stres yanıtını baskılaması ile açıklanacağını düşünmekteyiz. Bu yaklaşım, epilepsi ve epileptiform hasarın yalnızca sonuçlarını değil, upstream patofizyolojik belirleyicilerini hedef alan tamamlayıcı bir nöroprotektif strateji olarak değerlendirilebilir. Bunun yanında, BMT'nin etkisinin klorür homeostazı ile ilişkisini doğrulamak amacıyla NKCC1/KCC2 ekspresyon analizlerinin yapılması ve nöronal hipereksitabilitenin doğrudan değerlendirilmesi için elektrofizyolojik yaklaşımların kullanıldığı yeni çalışmalar gerekmektedir. Ayrıca, oksidatif stresin daha kapsamlı karakterizasyonu için ek biyokimyasal belirteçler eklenerek, bulgularımızı in vivo epilepsi modellerinde doğrulanmasının translaşyonel açıdan önemli olacaktır.

ETİK KURUL BEYANI

Bu çalışma sekonder hücre hattında (HT-22 Mouse Hippocampal Neuronal Cell Line) gerçekleştirildiği için Etik Kurul izin belgesi gerekmemektedir.

ÇATIŞMA BEYANI

Çalışmada çıkar çatışması bildirilmemektedir.

FİNANSAL DESTEK BEYANI

Bu çalışma, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 2023 yılı 1. dönem kapsamında 1919B012305670 numaralı başvurusuyla destek almaya hak kazanmıştır.

KAYNAKÇA

1. Abruzzo, P. M., Panisi, C., & Marini, M. (2021). The Alteration of Chloride Homeostasis/GABAergic Signaling in Brain Disorders: Could Oxidative Stress Play a Role?. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(8), 1316. <https://doi.org/10.3390/antiox10081316>
2. Barnard, S. N., Chen, Z., Holmes, M., Kanner, A. M., Hegde, M., Kuzniecky, R., Lowenstein, D., French, J. A., & Human Epilepsy Project (1) Investigators (2025). Treatment

- Response to Antiseizure Medications in People With Newly Diagnosed Focal Epilepsy. *JAMA neurology*, 82(10), 1022–1030. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2025.2949>.
3. Blaesse, P., Airaksinen, M. S., Rivera, C., & Kaila, K. (2009). Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*, 61(6), 820–838. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.003>.
4. Dalic, L. J., Warren, A. E. L., Young, J. C., Thevathasan, W., Roten, A., Bulluss, K. J., & Archer, J. S. (2020). Cortex leads the thalamic centromedian nucleus in generalized epileptic discharges in Lennox-Gastaut syndrome. *Epilepsia*, 61(10), 2214–2223. <https://doi.org/10.1111/epi.16657>.
5. Dzhala, V. I., Talos, D. M., Sdrulla, D. A., Brumback, A. C., Mathews, G. C., Benke, T. A., Delpire, E., Jensen, F. E., & Staley, K. J. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature medicine*, 11(11), 1205–1213. <https://doi.org/10.1038/nm1301>
6. 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>
7. Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
8. Geronzi, U., Lotti, F., & Grosso, S. (2018). Oxidative stress in epilepsy. *Expert review of neurotherapeutics*, 18(5), 427–434. <https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1465410>.
9. Gong, Y., Wu, M., Shen, J., Tang, J., Li, J., Xu, J., Dang, B., & Chen, G. (2021). Inhibition of the NKCC1/NF- κ B Signaling Pathway Decreases Inflammation and Improves Brain Edema and Nerve Cell Apoptosis in an SBI Rat Model. *Frontiers in molecular neuroscience*, 14, 641993. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.641993>
10. Joha, Z., Başgöz, N., Özgür, A., & Taşkıran, A. Ş. (2025). Bromelain protects against PTZ-induced glial damage and inflammation: An in vitro and in silico study. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 83(3), 3215–3223. <https://doi.org/10.1007/s12013-025-01703-8>.
11. Joha, Z., & Taşkıran, A. Ş. (2023). Hidrojen Peroksit ile İndüklenen C6 Hücrelerinde Oksidatif Stres Kaynaklı Apoptosis ve İnflamatuvar Artışına Karşı Astaksantin Koruyucu Etkisi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 11(9), 1686–1692. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i9.1686-1692.6281>
12. Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>.
13. Lam P, Newland J, Faull RLM, Kwakowsky A. Cation-Chloride Cotransporters KCC2 and NKCC1 as Therapeutic Targets in Neurological and Neuropsychiatric Disorders. *Molecules*. 2023;28(3):1344. <https://doi.org/10.3390/molecules28031344>.
14. Li, T., Deng, J., Qin, J., & Chu, X. P. (2024). Editorial: Neuromodulation for pharmacoresistant epilepsy: from bench to bed. *Frontiers in neurology*, 15, 1354897. <https://doi.org/10.3389/fneur.2024.1354897>.
15. Liu, R., Wang, J., Liang, S., Zhang, G., & Yang, X. (2020). Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. *Frontiers in neurology*, 10, 1407. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01407>.
16. Monteiro, Á. B., Alves, A. F., Ribeiro Portela, A. C., Oliveira

- Pires, H. F., Pessoa de Melo, M., Medeiros Vilar Barbosa, N. M., & Bezerra Felipe, C. F. (2024). Pentylentetrazole: A review. *Neurochemistry international*, 180, 105841. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105841>.
17. Morimoto, K., Fahnstock, M., & Racine, R. J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in neurobiology*, 73(1), 1–60. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.03.009>
 18. Namulodi, S., Torun, I. E., Bayiroglu, F., Kaya, M. S., & Kilinc, E. (2025). Adropin ameliorates behavioral seizures and the relevant neuroinflammation, oxidative stress, and neural damage in a rat model of pentylentetrazole-induced seizure potentially by reducing the activation of NF- κ B/I κ B- α signaling pathway. *Metabolic brain disease*, 40(5), 222. <https://doi.org/10.1007/s11011-025-01654-2>
 19. Rao, S., Farhat, A., Rakshashbuvankar, A., Athikarisamy, S., Ghosh, S., & Nagarajan, L. (2023). Effects of bumetanide on neonatal seizures: A systematic review of animal and human studies. *Seizure*, 111, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2023.09.007>
 20. Raol, Y. H., & Brooks-Kayal, A. R. (2012). Experimental models of seizures and epilepsies. *Progress in molecular biology and translational science*, 105, 57–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00003-2>.
 21. Samokhina, E., & Samokhin, A. (2018). Neuropathological profile of the pentylentetrazol (PTZ) kindling model. *The International journal of neuroscience*, 128(11), 1086–1096. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1481064>
 22. Tan, S., Wood, M., & Maher, P. (1998). Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *Journal of neurochemistry*, 71(1), 95–105. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71010095.x>
 23. Taskiran, A. S., Ozdemir, E., Gumus, E., & Ergul, M. (2020). The effects of salmon calcitonin on epileptic seizures, epileptogenesis, and postseizure hippocampal neuronal damage in pentylentetrazole-induced epilepsy model in rats. *Epilepsy & behavior: E&B*, 113, 107501. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107501>
 24. Taskiran, A., & Yildiz Asdemir, T. (2023). Investigation of the Effect of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil on Pentylentetrazole-induced Neuronal Damage in HT-22 Cell Line. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 11(s1), 2499–2504. <https://orcid.org/0000-0002-5810-8415>
 25. Yang, N., Guan, Q. W., Chen, F. H., Xia, Q. X., Yin, X. X., Zhou, H. H., & Mao, X. Y. (2020). Antioxidants Targeting Mitochondrial Oxidative Stress: Promising Neuroprotectants for Epilepsy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 6687185. <https://doi.org/10.1155/2020/6687185>
 26. Yulak, F., Joha, Z., Öztürk, A., İnan, Z. D. Ş., & Taşkıran, A. Ş. (2025). Enoxaparin protects C6 glioma cells from glutamate-induced cytotoxicity by reducing oxidative stress and apoptosis. *Molecular Neurobiology*, 62(4), 4631–4640. <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04587-6>.
 27. Zhang, S., Meor Azlan, N. F., Josiah, S. S., Zhou, J., Zhou, X., Jie, L., Zhang, Y., Dai, C., Liang, D., Li, P., Li, Z., Wang, Z., Wang, Y., Ding, K., Wang, Y., & Zhang, J. (2023). The role of SLC12A family of cation-chloride cotransporters and drug discovery methodologies. *Journal of pharmaceutical analysis*, 13(12), 1471–1495. [doi: 10.1016/j.jpha.2023.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.09.002).