



Pregabalinin Glutamat Eksitotoksitesine Karşı Nöroprotektif Etkinliğinde Oksidatif ve Nitrozatif Yolların Rolü

The Role of Oxidative and Nitrosative Pathways in the Neuroprotective Effect of Pregabalin Against Glutamate Excitotoxicity

Ahmet Şevki TAŞKIRAN¹ , Ayşegül ÖZTÜRK^{2*} , Muhammed Atif İNCE²

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Terapi ve Rehabilitasyon Bölümü, Sivas, Türkiye

*Corresponding author: fztaysegul@yahoo.com

ÖZ

Amaç: Bu çalışma pregabalinin nitrik oksit ve oksidatif stres yolları üzerinden glutamat ile indüklenen sitotoksitede üzerindeki nöroprotektif etkisini araştırmak için tasarlandı. **Gereç ve Yöntem:** Deneyde C6 glioma hücre hattı kullanılmıştır. Pregabalinin glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra glial hücre ölümü üzerindeki etkisini değerlendirmek için dört grup oluşturuldu. Kontrol grubu herhangi bir işlem görmedi. Glutamat grubundaki hücreler 24 saat 10 mM glutamat ile muamele edildi. Pregabalin grubundaki hücreler, 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (3,75; 7,5; 15; 30 ve 60µM) pregabalin ile muamele edildi. Pregabalin+glutamat grubundaki hücreler, 1 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (3,75; 7,5; 15; 30 ve 60µM) pregabalin ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 24 saat boyunca 10mM glutamata maruz bırakıldı. Hücre canlılığı, XTT tahlili ile değerlendirildi. Hücrelerdeki toplam antioksidan ve oksidan seviyesi (TAS-TOS), indüklenebilir nitrik oksit (iNOS), nitrik oksit (NO) ve nöronal nitrik oksit (nNOS) seviyeleri ticari kitlerle ölçüldü. **Bulgular:** 30 ve 60 µM konsantrasyondaki pregabalin, glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra C6 hücrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde artırdı (p<0,01). Pregabalin (30µM)+glutamat, tedavi edilmemiş glutamat grubuna (p<0,05) kıyasla C6 hücrelerinde TOS seviyelerini önemli ölçüde azaltırken, TAS seviyesini artırmıştır (p<0,05). Ayrıca pregabalin, glutamatın indüklediği sitotoksitede sonrasında C6 hücrelerinde iNOS ve NO seviyesini azaltırken (p>0,05) nNOS düzeyini değiştirmemiştir (p>0,05). **Sonuç:** Pregabalin, sitotoksitede üzerinde koruyucu ve antioksidan özelliklere sahiptir. Eğer in vivo ve vitro daha fazla araştırma bu iddiayı desteklerse Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar için etkili bir takviye olabilir.

Anahtar Kelimeler: Glutamat Eksitotoksitesi, Pregabalin, C6 Glioma, Oksidatif Stres, Nitrozatif Stres

ABSTRACT

Introduction: This study was designed to investigate the neuroprotective effect of pregabalin on glutamate-induced cytotoxicity via nitric oxide and oxidative stress pathways. **Material Method:** C6 glioma cell line was used in the experiment. Four groups were created to evaluate the effect of pregabalin on glial cell death after glutamate-induced cytotoxicity. Control group did not receive any treatment. Cells in the glutamate group were treated with 10 mM glutamate for 24 hours. Cells in the pregabalin group were treated with pregabalin at various concentrations (3.75, 7.5, 15, 30, and 60 µM) for 24 hours. Cells in the pregabalin+glutamate group were pretreated with pregabalin at various concentrations (3.75, 7.5, 15, 30, and 60 µM) for 1 h and then exposed to 10 mM glutamate for 24 h. Cell viability was assessed by XTT assay. Total antioxidant and oxidant levels (TAS-TOS), inducible nitric oxide (iNOS), nitric oxide (NO), and neuronal nitric oxide (nNOS) levels in cells were measured with commercial kits. **Results:** Pregabalin at 30 and 60 µM concentrations significantly increased cell viability in C6 cells after glutamate-induced cytotoxicity (p<0,01). Pregabalin (30µM)+glutamate significantly decreased TOS levels in C6 cells compared to the untreated glutamate group (p<0,05), while it increased TAS level (p<0,05). In addition, pregabalin decreased iNOS and NO levels in C6 cells after glutamate-induced cytotoxicity (p>0,05) but did not change nNOS levels (p>0,05). **Conclusion:** Pregabalin has protective and antioxidant properties on cytotoxicity. If further in vivo and in vitro research supports this claim, it may be an effective supplement for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's.

Keywords: Glutamate Excitotoxicity, Pregabalin, C6 Glioma, Oxidative Stress, Nitrosative Stress

GİRİŞ

Glutamat, merkezi sinir sisteminin (MSS) temel uyarıcı nörotransmitteridir. Nöronal büyüme, gelişim, sinyalizasyon ve sinaptik plastisite gibi çeşitli metabolik işlev ve süreçlerde yer alır(1). Glutamat bu etkilerini hem ligand kapılı iyon kanallarını (iyonotropik glutamat reseptörleri) hem de G-proteinine bağlı reseptör sınıfını (metabotropik glutamat reseptörleri) aktive ederek gösterir (2). Beyindeki glutamat konsantrasyonu hücre içinde milimolar (6-7 mmol/kg) düzeyde iken, hücre dışı glutamat konsantrasyonu, eksitator amino asit taşıyıcılarının (EAAT), nöron ve astrositlere glutamat geri alımı/aktarımı ile mikromolar düzeyde/aralıkta tutulur(3,4). Hücre dışı glutamat konsantrasyonunda artış meydana geldiğinde, iyonotropik glutamat reseptörleri aşırı aktive hale gelerek hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) iyon miktarını yükseltir(5). Hücre içinde artan Ca^{2+} konsantrasyonu, kalsiyum homeostazını bozarak nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) regülasyonu, mitokondri disfonksiyonu, oksidatif fosforilasyonun deregülasyonu ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine yol açan bir dizi sinyal yolunu başlatır. Bu süreç glutamata bağlı eksitotoksite olarak adlandırılır. Hücre içinde artan Ca^{2+} konsantrasyonu, kalsiyum homeostazını bozarak nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) regülasyonu, mitokondri disfonksiyonu, oksidatif fosforilasyonun deregülasyonu ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine yol açan bir dizi sinyal yolunu başlatır. Bununla birlikte, glutamat toksisitesi sırasında artan Ca^{2+} seviyeleri ve mitokondri disfonksiyonu, nitrik oksit (NO) üretimini tetikleyerek peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumuna yol açar. Bu süreç oksidatif ve nitrozatif stresin bir arada rol oynadığı bir döngü oluşturur ve hücre hasarı şiddetlendirir. Bu mekanizmalar, glutamata bağlı eksitotoksite olarak adlandırılır ve nöronal hasarı tetikleyerek hücre ölümüne neden olur (6,7) Eksitotoksite nöronal hasarı tetikleyerek hücre ölümüne yol açar. Bu durum amiotrofik lateral skleroz, Alzheimer hastalığı ve Huntington hastalığı gibi çok sayıda nörodejeneratif hastalığın ortaya çıkmasında rol oynamaktadır.

Pregabalin (PGB), potansiyel antikonvülsan olarak geliştirilen GABA analogudur. Ancak yapılan araştırmalar ilacın GABA iletimi üzerinde çok az etkiye sahip olduğu daha çok voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları (VGCC) ile etkileştiğini bildirmiştir(8). Pregabalin aşırı uyarılmış nöronların Ca^{2+} kanallarının $\alpha 2\delta$ alt ünitesine kuvvetli bir şekilde bağlanır. Ardından depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını ve böylelikle substans P, noradrenalin ve glutamat gibi birçok uyarıcı nörotransmitterin salınımını azaltır(9,10). Yapılan çalışmalarda pregabalinin nörolojik sonuçları iyileştirebileceğini, nöron ve oligodendrositlerin apoptozunu azaltabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda pregabalin tedavisi ile astrositlerin proliferasyonunun azaldığı ve bunun sonucunda da mikroglia ve astrositlerin daha az çoğaldığı tespit edilmiştir(11). Bu literatür bilgilerine dayanarak pregabalinin sinir sistemi üzerine olumlu etkileri farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Ancak glutamat eksitotoksitesi ile ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma, pregabalinin glial hücrelerde glutamatın neden olduğu toksite üzerindeki etkilerini ve oksidatif-nitrozatif stres süreçlerine müdahale potansiyelini araştırmayı amaçlamaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Kültürü

ATCC' den temin edilmiş olan C6 glioma hücreleri steril koşullar altında 37°C ve %5 CO₂'li ortamda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sıgır serumu içeren DMEM: F12 (1:1) hücre kültür besiyeri ortamında çoğaltılmıştır. Hücrelerin yoğunluğu %80-90 ulaştığında pasajlandı. Pasajlama işlemi üç defa yapıp hücreler 96'lı kuyucuklu plakada, her kuyucuğa 15×10^3 hücre bulunacak şekilde ekim yapıldı. C6 glioma hücrelerinde glutamat toksitesini için önceki çalışmalarda belirlenen 10 mM doz ve 24 saat inkübasyon süresi kullanılacaktır(7). Pregabalin için kullanılacak dozlar: 60; 30; 15; 7,5; 3,75 µg/ml olarak belirlenmiştir (12).

XTT Hücre Canlılık Testi

Pregabalinin glutamat toksitesini sonrası hücre canlılığı üzerine etkisi XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) testi ile belirlenmiştir. Sitotoksite için öncelikle her kuyuda 15×10^3 hücre olacak şekilde hücre alınıp steril 96 kuyucuklu

mikro plakaya ekildi ve hücrelerin yapışması için bir gece bekletildi. Ertesi gün hücreler üzerindeki besi yeri uzaklaştırıldı, kuyucuklar PBS ile yıkandı. Pregabalinin farklı konsantrasyonları hücreler üzerine uygulandıktan 1 saat sonra glutamat (10 mM) uygulandı 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. 24 saatin sonunda besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler üç defa PBS ile yıkandı. Ardından tüm kuyucuklara 100 µl şeffaf (renksiz) DMEM ve üzerine 50 µl XTT solüsyonu eklenerek CO₂'li etüvde 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda absorbans değeri mikroparka okuyucuda 450 nm'de okutulurken, kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilip %Hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanılarak hesaplandı(13).

Hücre Homojenatlarının Hazırlanması

Tüm gruptaki hücreler steril tüplere alındı. Ardından, 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Hücreler, PBS (pH: 7.4) ile yaklaşık 1 milyon/ml hücre konsantrasyonuna seyreltilerek süspanse edildi(14). Hücrelerin iç bileşenlerinin dışarı çıkması için üç defa donma-çözülme döngüsü ile hasara uğratıldı. Sonrasında 10 dakika 4000 rpm'de 4°C santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar toplanarak biyokimyasal analize tabi tutuldu. Örneklerdeki toplam protein seviyeleri, Bradford protein analiz kiti (SERVA, Heidelberg, Almanya) ile belirlendi(15).

Total Antioksidan (TAS), Total Oksidan (TOS), İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS), Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS), ve Nitrik Oksit (NO) Seviyelerinin Ölçümü

Hücrelere işlem sonrası pregabalinin oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkilerini değerlendirmek için TAS, TOS, iNOS, nNOS ve NO ölçümü ticari kitler ile kullanılmıştır. Uygulanacak prosedür üretici firmanın talimatlarına göre belirlenmiştir.

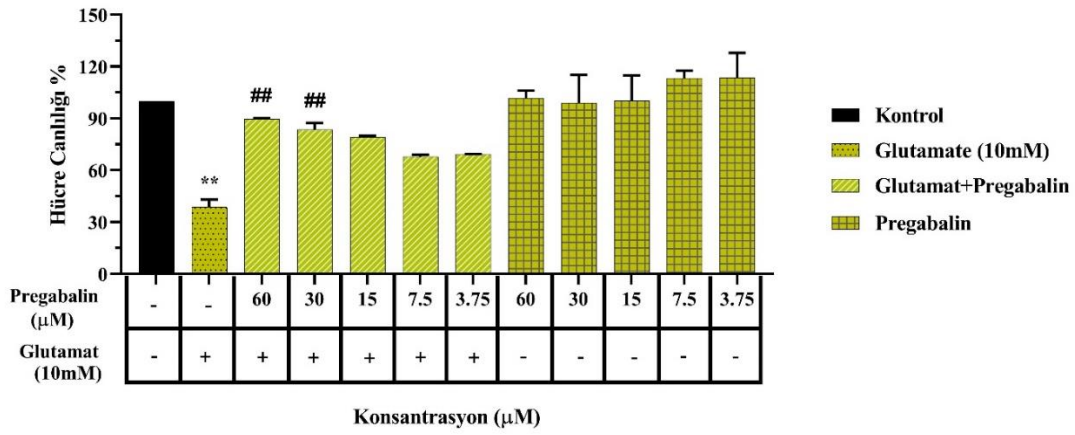
Biyoistatistiksel Analiz

Elde edilen veriler, ortalamanın (SEM) ortalama ± standart hatası olarak belirtildi. Analizler Windows 23.0 SPSS sürümü ile gerçekleştirilmiştir. Tek yönlü bir varyans analizi (ANOVA) kullanılarak veriler değerlendirildi. Gruplar arasındaki farkı tespit etmek amacıyla post hoc Tukey testi kullanıldı. Anlamlılık p<0,05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Pregabalinin Glutamatın İndüklediği C6 Hücre Sitotoksitesini Üzerindeki Etkisi

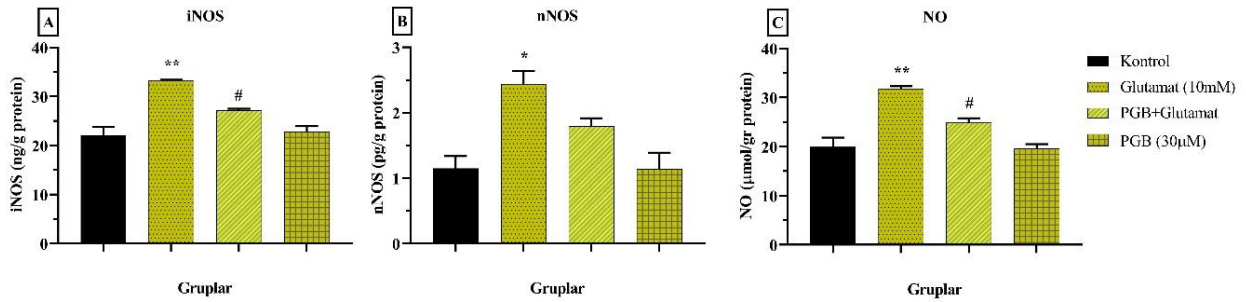
C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksitesine karşı pregabalinin koruyucu etkileri XTT hücre proliferasyonu testi kullanılarak değerlendirildi. Bu çalışmada, artan pregabalin konsantrasyonlarının (3,75–60µM) hem kontrol hem de glutamatın indüklediği C6 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri araştırıldı. Hücrelere başlangıçta 1 saat boyunca artan konsantrasyonlarda (3,75; 7,5; 15; 30 ve 60µM) pregabalin uygulandı ve ardından sonraki 24 saat boyunca 10mM glutamat ile muamele edildi. Şekil 1, C6 hücrelerinin 24 saat süreyle glutamat uygulanmasının tedavi edilmemiş kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında hücre sağkalımını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (p<0,05; Şekil 1). Ayrıca, pregabalinin 60 ve 30µM konsantrasyonları, glutamat ile indüklenen C6 hücreleri ile karşılaştırıldığında hücre sağkalımını artırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 1: Pregabalinin, glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra C6 hücrelerinde hücre sağkalımı üzerindeki etkisi. Veriler, ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ tedavi edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ glutamat ile tedavi edilene kıyasla.

Pregabalinin Glutamatın İndüklediği C6 Hücrelerinde İnos, Nnos ve NO Seviyelerine Etkisi

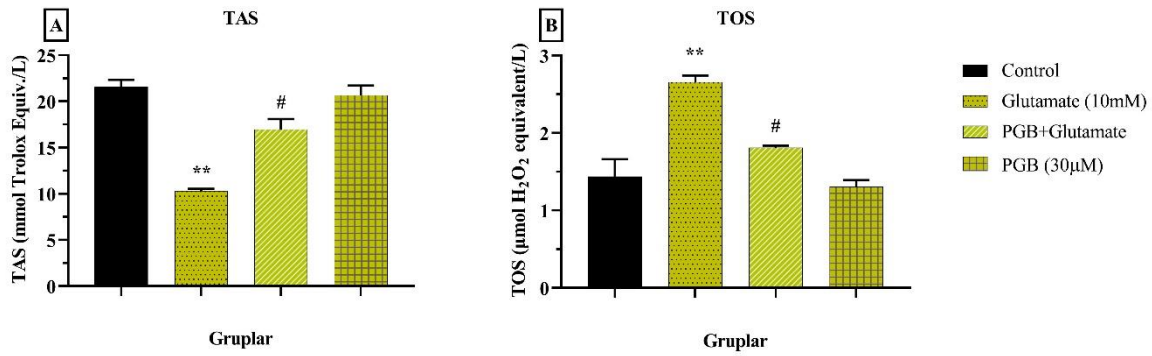
ELISA testleri, C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra pregabalinin iNOS, nNOS ve NO parametreleri üzerindeki olası etkisini belirlemek için kullanıldı. C6 hücreleri, bir saat boyunca 30 μ M pregabalin konsantrasyonu ile muamele edildikten sonra glutamat (10 mM) varlığında veya yokluğunda 24 saat inkübe edildi. Glutamat uygulanan hücreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iNOS, nNOS ve NO seviyeleri önemli ölçüde artmıştır ($p<0,05$; Şekil 2A, B ve C). Öte yandan 30 μ M pregabalin ile ön işleme tabi tutulan hücreler, glutamat grubundaki hücelere kıyasla C6 hücrelerinde iNOS ve NO seviyelerini önemli ölçüde düşürürken ($p<0,001$; Şekil 2A ve C) nNOS üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir ($p>0,05$; Şekil 2B).



Şekil 2: C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra 30 μ M pregabalinin iNOS, nNOS ve NO seviyeleri üzerindeki etkisi. Veriler, ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ tedavi edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ glutamat ile tedavi edilene kıyasla (NO: Nitrik oksit, iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz, PGB: Pregabalin).

Pregabalinin Glutamatın İndüklediği C6 Hücrelerinde TAS ve TOS Seviyelerine Etkisi

Hücreler, 1 saat boyunca tek doz (30 μ M) pregabalin ile muamele edildi ve ardından sonraki 24 saat boyunca 10mM glutamat varlığında veya yokluğunda inkübe edildi. Şekil 3'te gösterildiği gibi, glutamat tedavisinin, tedavi edilmemiş kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında C6 hücrelerinin TAS seviyesini düşürmüştür ($p<0,01$; Şekil 3A). Bununla birlikte pregabalin (30 μ M)+glutamat grubu, glutamat uygulanan hücelere kıyasla TAS seviyesini artırmıştır ($p<0,05$; Şekil 3A). Ayrıca, C6 hücrelerinin glutamat ile 24 saat önceden inkübasyonu, kontrol ile karşılaştırıldığında TOS seviyelerini önemli ölçüde yükseltti ($p<0,01$; Şekil 3B). Öte yandan, 30 μ M konsantrasyondaki pregabalin, glutamatla tedavi edilen hücrelerle karşılaştırıldığında C6 hücrelerinde TOS seviyelerini önemli artırdı ($p<0,05$; Şekil 3B). Bununla birlikte, tek başına 30 μ M konsantrasyondaki pregabalin, kontrol ile karşılaştırıldığında C6 hücrelerinde TAS ve TOS seviyelerinde önemli bir değişikliği neden olmamıştır ($p>0,05$; Şekil 3A ve B).



Şekil 3: C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra 30 µM pregabalinin TAS ve TOS seviyeleri üzerindeki etkisi. Veriler, ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. *p<0,05; **p<0,01 tedavi edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; #p<0,05; ## p<0,01 glutamat ile tedavi edilene kıyasla (TAS: Total antioksidan seviyesi, TOS: Total oksidan seviyesi, PGB: Pregabalin).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada glioblastoma (C6) hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksititeye karşı pregabalinin etkisi değerlendirilmiştir. Pregabalin ile ön tedavi, C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra hücre canlılığını artırdı ve hücre ölümünü azalttı. Ayrıca, pregabalin ön işlemi, C6 hücrelerinde iNOS ve NO seviyelerini azaltmış, nNOS seviyesinde ise değişiklik oluşturmamıştır. Ayrıca, pregabalin ön işlemi, C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra TAS seviyesini artırırken TOS seviyesini baskılamıştır.

Önceki çalışmalar pregabalinin kalsiyum kanallarının $\alpha_2\delta$ alt birimine bağlanarak baskılaması sonucu noradrenalin, serotonin, dopamin, p-maddesi ve glutamat dahil olmak üzere birçok nörotransmitterin salınımını azalttığını göstermektedir(16–18). Bu sebeple pregabalinin birçok nörodejeneratif hastalıkta artan glutamat seviyesini baskılayarak nöroprotektif etkileri olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Kumar ve ark. pregabalin tedavisinin sıçanlarda siyatik sinir hasarı ile oluşturulan nöropatik ağrıda spinal kord dorsal boynuzundaki glutamat ve aspartat salınımını baskılayarak ağrıyı azalttığını öne sürmüşlerdir(19). Ha ve ark., pregabalinin spinal kord yaralanması sonrası fonksiyonel iyileşmeyi indüklediğini, mikrogliya aktivasyonunu, nöronal ve glial apoptozu azalttığını bildirmişlerdir(20). Ayrıca pregabalinin nöroprotektif etkilerinin, nöropeptit salınımını modüle etmesinden kaynaklı bir etkinin sonucu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Benzer olarak bizim sonuçlarımız da pregabalin ön tedavisinin glial hücrelerde glutamat toksitesine karşı etkili olduğu ve hücre canlılığını artırdığı bulunmuştur.

Nitrik oksit (NO), merkezi sinir sisteminde önemli bir nöromodülatördür. Nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin L-argininamino asidi L-sitrulin'e çevrilmesiyle NO üretilmektedir(21). NOS' un bilinen üç farklı izoformudur. Bunlar, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), nöronal Nitrik oksit sentaz (nNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)' dir. eNOS ve nNOS, normal koşullarda fonksiyonel iken, iNOS' un daha çok patofizyolojik koşullarda fonksiyonel olduğu gösterilmiştir(22,23).

nNOS, nöronlarda yaygın olarak eksprese edilmektedir ve C6 hücrelerinin onu eksprese ettiği bulunmuştur(24,25). nNOS indüksiyonu nöronlarda NO artışına neden olur, bu da çözünür guanilat siklaz (sGC) / guanozin monofosfat (GMP) yolunun aktive olmasına neden olur. cGMP, nöronlarda glutamat salınımını tetikleyen ikincil bir habercidir(26). Ek olarak, nNOS/NO'nun glutamatın neden olduğu sitotoksitede rolü vardır(6,7,23). MSS'deki inflamatuvar sürecin ayırt edici özelliklerinden biri, aktif glia tarafından iNOS'un ifadesidir. Glutamat, sırayla iNOS ekspresyonunu tetikleyebilen proinflamatuvar sitokinleri indüklemektedir(27,28). Memari ve ark., yaptıkları çalışmada, pregabalinin iNOS düzeylerini azaltarak nitrik oksit (NO) üretimini düşürdüğünü ve bunun sonucunda diyabetik periferik nöropatik ağrının (DPNP) iyileştiğini göstermiştir. Sonuç olarak, pregabalinin ağrı kesici etkilerinin iNOS ve NO yoluyla gerçekleştiğini bulmuşlardır. Pregabalinin

DPNP üzerindeki palyatif etkisi, iNOS inhibisyonu aracılığıyla sinir sistemi dejenerasyonunu koruyabileceğini ve bu etkiyi daha iyi anlamak için ek hücre, hayvan ve insan çalışmalarının gerekli olduğunu belirtmişlerdir(29). Bizim çalışmamızda, glutamatın indüklediği sitotoksitesite sonrası hücrelerde iNOS, nNOS ve NO düzeylerindeki artış ortaya çıkarılmıştır. Öte yandan, pregabalin, C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksitesiteden sonra yüksek iNOS ve NO seviyelerini azaltırken nNOS seviyesini değiştirmemiştir. Bu sonuçlar pregabalinin glutamat toksisitesine karşı koruyucu olduğunu ve bu etkide iNOS ve NO yolunun etkili olduğu ancak bu etkiyi nNOS üzerinden gerçekleştirilmemektedir.

Oksidanlar ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak bilinir. Bu dengesizlik, dokulara zarar veren ve organizmanın fizyolojik işlevini bozan aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur(30). Ayrıca araştırmalar, oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıkların ve MSS bozukluklarının gelişiminde anahtar bir faktör olduğunu göstermektedir(31,32). Aşçı ve ark., serebral iskemi ve reperfüzyon sonrası uygulanan pregabalinin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiler gösterdiğini ve nöroprotektif bir faktör olarak potansiyel kullanımını desteklediğini belirtmişlerdir(9). Pregabalin oksidatif stresin biyobelirteçlerinden olan, lipid peroksidasyonu (TBARS) ve GSH-PX ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini azalttığını bulmuşlardır.

Bu çalışmada glutamatın neden olduğu sitotoksitesitenin hücrelerde TOS seviyesinde artışa ve TAS seviyesinde ise azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Ancak, pregabalin uygulaması, C6 hücrelerinde glutamat kaynaklı oksidatif hasarı azaltarak belirgin antioksidan etkiler göstermiştir. Pregabalin, TAS seviyelerini artırırken TOS seviyelerini düşürmüş ve böylece oksidatif stresin etkilerini hafifletmiştir.

Elde edilen veriler, pregabalinin glutamat kaynaklı toksisiteye karşı nöroprotektif bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin anti-apoptotik, anti-inflamatuvar ve antioksidan özelliklerinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, pregabalinin etki mekanizmasının daha derinlemesine anlaşılmasının, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için daha güçlü ve etkili analogların geliştirilmesine olanak sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu çalışmada sadece C6 hücre hattı kullanılmış olması, sonuçların in vivo sistemlere genellenmesini sınırlamaktadır. Ayrıca, pregabalin konsantrasyonu ve uygulama süresinin sınırlı tutulması ile glutamat toksisitesine karşı diğer potansiyel mekanizmaların yeterince incelenmemesi, çalışmanın önemli kısıtlamaları arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, oksidatif stres belirteçlerinin daha spesifik şekilde değerlendirilememesi ve çalışmanın klinik anlamda sınırlı bir öngörü gücüne sahip olması da dikkat edilmesi gereken noktalar arasındadır.

Teşekkür: Bu çalışma TUBİTAK 2209-A Öğrenci projesi kapsamında yapılmıştır. Çalışmada gerekli olanakları sağladığı için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi'ne (CÜTFAM) teşekkür ederiz.

Etik Beyanı: Bu çalışmada, “Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi” kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin “Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler” başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

KAYNAKÇA

1. Çetindağ Çiltaş A, Gündoğdu S, Yulak F. Levettiracetam Protects Against Glutamate-Induced Excitotoxicity in SH-SY5Y Cell Line. International Journal of Nature and Life Sciences. 2022 Dec 1;6(2):142–50.
2. Vega IE, Aurelio Freire MM, Vickers JC, Lewerenz J, Maher P, Lewerenz J. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? Frontiers in Neuroscience | www.frontiersin.org [Internet]. 2015 [cited 2023 Aug 24];9. Available from: www.frontiersin.org
3. Filiz AK, Öztürk A. The Effect of Carbamazepine Against Glutamate-induced Cytotoxicity in the C6 Cell Line. International Journal of Scientific and Technological Research. 2021 Sep;
4. Ortasoz AM, Ozdemir E, Taskiran AS, Ozturk A. Sinaptic acid alleviates glutamate-induced excitotoxicity by inhibiting neuroinflammation and endoplasmic reticulum stress pathway in C6 glioma cells. Toxicology in Vitro. 2025 Mar;103:105977.
5. Yulak F, Joha Z, Öztürk A, İnan ZDŞ, Taşkıran AŞ. Enoxaparin Protects C6 Glioma Cells from Glutamate-Induced Cytotoxicity by Reducing Oxidative Stress and Apoptosis. Mol Neurobiol. 2024 Oct 29;

6. Li R, Kristian T, Yang S, Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, et al. Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. 2015 [cited 2023 Aug 24]; Available from: www.frontiersin.org
7. Taskiran AS, Merve Ergul . The effect of salmon calcitonin against glutamate-induced cytotoxicity in the C6 cell line and the roles the inflammatory and nitric oxide pathways play. *Metab Brain Dis* [Internet]. [cited 2023 Aug 24];1:3. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00793-6>
8. Cunningham MO, Woodhall GL, Thompson SE, Dooley DJ, Jones RSG. Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *European Journal of Neuroscience* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2023 Aug 24];20(6):1566–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1460-9568.2004.03625.x>
9. Aşçı S, Demirci S, Aşçı H, Doğuç DK, Onaran İ. Neuroprotective effects of pregabalin on cerebral ischemia and reperfusion. *Balkan Med J*. 2016 Mar 1;33(2):221–7.
10. Kavoussi R. Pregabalin: From molecule to medicine. *European Neuropsychopharmacology*. 2006 Jul;16(SUPPL. 2).
11. Ha KY, Lee JS, Kim KW. Degeneration of sacroiliac joint after instrumented lumbar or lumbosacral fusion: A prospective cohort study over five-year follow-up. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2008 May [cited 2023 Aug 24];33(11):1192–8. Available from: https://journals.lww.com/spinejournal/fulltext/2008/05150/degeneration_of_sacroiliac_joint_after.7.aspx
12. Zhang Z, Jiang J, He Y, Cai J, Xie J, Wu M, et al. Pregabalin mitigates microglial activation and neuronal injury by inhibiting HMGB1 signaling pathway in radiation-induced brain injury. *J Neuroinflammation*. 2022 Sep 21;19(1):231.
13. Filiz AK, Joha Z, Yulak F. Mechanism of anti-cancer effect of β -glucan on SH-SY5Y cell line. *Bangladesh J Pharmacol*. 2021 Oct 1;16(4):122–8.
14. Joha Z, Yulak F, Öztürk A, Şahin B, Yıldırım Ş. The Anticancer Effect of Cannabinoid 2 Agonist L-759,633 on C6 and SH-SY5Y Cell Lines. *Turkish Journal of Science and Health*. 2021 Aug 19;
15. Gömeç M, İpek G, Öztürk A, Şahin İnan D. Effect of Wheat Germ Oil on Wound Healing: An In Vitro Study in Fibroblast Cells. *Turkish Journal of Science and Health*. 2022 Sep 17;
16. Fink K, Dooley DJ, Meder WP, Suman-Chauhan N, Duffy S, Clusmann H, et al. Inhibition of neuronal Ca²⁺ influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology* [Internet]. 2002 [cited 2023 Aug 24];42:229–36. Available from: www.elsevier.com/locate/neuropharm
17. Errante LD, Petroff OAC, Ognen D, Petroff AC. Acute effects of gabapentin and pregabalin on rat forebrain cellular GABA, glutamate, and glutamine concentrations. *Seizure*. 2003;12:300–6.
18. David Luo Z, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, et al. Upregulation of Dorsal Root Ganglion 2 Calcium Channel Subunit and Its Correlation with Allodynia in Spinal Nerve-Injured Rats. 2001;
19. Kumar N, Laferriere A, Yu JSC, Leavitt A, Coderre TJ. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J Neurochem*. 2010 Apr;113(2):552–61.
20. Ha KY, Kim YH, Rhyu KW, Kwon SE. Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats.
21. Filiz AK, Karabulut S. Involvement of nitric oxide pathway in the acute anticonvulsant effect of salmon calcitonin in rats. *Epilepsy Res*. 2022 Feb 1;180.
22. Bahremand A, Ziai P, Khodadad TK, Payandemehr B, Rahimian R, Ghasemi A, et al. Agmatine enhances the anticonvulsant effect of lithium chloride on pentylenetetrazole-induced seizures in mice: Involvement of L-arginine/nitric oxide pathway. 2010;
23. Dirik H, Joha Z. Investigation of the effect of sugammadex on glutamate-induced neurotoxicity in C6 cell line and the roles played by nitric oxide and oxidative stress pathways. 2023 [cited 2023 Aug 24]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/fcp.12890>
24. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. 2009;20:223–30.
25. Gallorini M, Maccallini C, Ammazalorso A, Amoia P, De Filippis B, Fantacuzzi M, et al. Molecular Sciences The Selective Acetamidine-Based iNOS Inhibitor CM544 Reduces Glioma Cell Proliferation by Enhancing PARP-1 Cleavage In Vitro. [cited 2023 Aug 24]; Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
26. Speigel I, Osman V, Hemmings HC. Volatile anesthetics inhibit presynaptic cGMP signaling to depress presynaptic excitability in rat hippocampal neurons. [cited 2023 Aug 25]; Available from: <https://doi.org/10.1101/2022.01.03.474845>
27. Cárdenas A, Moro MA, Hurtado O, Leza JC, Lorenzo P, Castrillo A, et al. Implication of Glutamate in the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase After Oxygen and Glucose Deprivation in Rat Forebrain Slices. *J Neurochem* [Internet]. 2000 [cited 2023 Aug 25];74:2041–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-4159.2000.0742041.x>
28. Moro MA, Cárdenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium*. 2004;36(3–4):265–75.
29. Memari M, Sadatamini M, Khazaei-Poul Y, Joharchi K. Does Pregabalin change serum levels of iNOS and NO in diabetic patients with neuropathic pain? A quasi-experimental study. 2020.
30. Karademir M, Öztürk A, Yulak F, Özkaraca M, Taskiran AS. Unveiling the Protective Potential of Sugammadex against PTZ-Induced Epileptic Seizures in Mice: A Comprehensive Study on Oxidative Stress, Apoptosis, and Autophagy. *Neurochemical Journal*. 2024 Jun 27;18(2):338–47.

31. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine* 2004 10:7 [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2023 Aug 25];10(7):S18–25. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn1434>
32. Şahin B, Karabulut S. Cumhuriyet Medical Journal Sugammadex Causes C6 Glial Cell Death and Exacerbates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Cumhuriyet Medical Journal*. 2022;44(1):22–7.